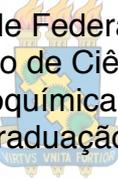


Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica



**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DA OXIDASE TERMINAL DA
PLASTOQUINONA (PTOX) EM *Zea mays***

FORTALEZA
2008

FRANCISCO YURI MAIA DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DA OXIDASE TERMINAL DA
PLASTOQUINONA (PTOX) EM *Zea mays* L.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo

FORTALEZA
2008

FRANCISCO YURI MAIA DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DA OXIDASE TERMINAL DA
PLASTOQUINONA (PTOX) EM *Zea mays* L.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em :

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Enéas Gomes Filho
Universidade Federal do Ceará-UFC

Dr. José Hélio Costa
Prodoc/CAPES

À minha família
e à família que escolhi, meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar tenho a obrigação de agradecer a todo o apóio da minha família, mesmo quando eles não entendem algo ou não estão a par de tudo o que se passa no mundo científico continuam me ajudando a sobreviver e a conquistar uma carreira própria. Sem o apóio deles nada disso teria acontecido. Agradeço também a minha mãe e ao meu pai por todos os ensinamentos para a vida que tanto me ajudam nesse caminho que estou tentando trilhar, o do mundo científico.

Em segundo lugar, mas não menos importante, agradeço a orientadora, amiga e segunda mãe, Profa. Dirce, que foi o meu primeiro contato com a pesquisa e tanto me apóia, ajuda, suporta, escuta e depois de oito anos de trabalho juntos ainda tem paciência para explicar tudo várias vezes. Além de também me passar valores morais e éticos tão escassos no mundo científico atual e tão necessários para a sociedade humana.

Gostaria aqui de lembrar e agradecer muitíssimo à Profa. Elena Graciela Orellano, que possibilitou um intercâmbio científico através do Programa de “pasantias” AMSUD-Pasteur, me convidando a passar 3 meses em seu laboratório na Argentina aprendendo técnicas de isolamento de cloroplastos, experimentos com cloroplastos no oxígrafo e técnicas de Biologia Molecular. Além, é claro de um pouco de espanhol para o convívio diário. Nessa experiência de um mestrado sanduíche, a Profa. Elena, me fez crescer como pessoa e como futuro pesquisador proporcionando a convivência com diferentes pessoas e culturas. Ainda na Argentina não posso esquecer do Prof. Oscar Roveri, que estava sempre pronto para ajudar a entender protocolos de fluorescência de clorofila, técnicas antigas e novas e por ser um modelo de pesquisador tão raro e necessário nos dias atuais.

Neste momento eu me dou a liberdade de agradecer imensamente a amiga Andrea, grande colega do laboratório de Biofísica da Universidade Nacional de Rosário e que além do trabalho me ajudou com todo o entretenimento possível para que eu lembrasse o mínimo do Brasil e das pessoas queridas que estavam longe fazendo assim esse período distante menos saudosista. Junto com ela lembro-me de todos os colegas, sempre prestativos, da Biofísica ou dos laboratórios de Biologia Molecular: Angie, Javier Gonzalez, Martín Ré, Silvana Petrocelli e María Laura Tondo além da Profa. Estela Valle que abriu seu laboratório para os experimentos de Biologia Molecular com frutos de tomate.

Graças a ajuda de muitas pessoas do laboratório eu consegui concluir essa etapa, aqui agradeço ao Prof. Hélio por todas as dicas e pela minha iniciação na Bioinformática. Pelo seu empenho na pesquisa e por toda a ajuda durante o trabalho e redação desta dissertação. Em relação ao laboratório agradeço aos colegas pelo ambiente de trabalho produtivo e amigável, dentre eles, Camila Freitas, Mirelle Vasconcelos, Welves, João Henrique, Deborah Moura, Edson Garantizado e Malu. Dos amigos do tempo de iniciação científica e co-orientadores até hoje agradeço à Erika e Luciana por todos os conselhos e dicas.

Dentre as companhias mais importantes e que acompanharam todo o trabalho do começo ao fim, Alana e Neuza, além de sempre estarem presentes, ainda têm um conselho um caminho ou uma mão amiga na hora mais necessária. Obrigado por tudo no passado e o que o futuro nos reserva. Agora um agradecimento especial à Wal que conheço desde o início da faculdade, trilhamos caminhos muito parecidos e até hoje estamos juntos compartilhando as alegrias e as dificuldades do caminho escolhido e ajudando um ao outro nessa carreira.

Agradecimentos sempre serão insuficientes mas ainda lembro de outros companheiros de Bioquímica e que sempre ajudam em uma necessidade, Janne Keila e Gislayne Karla. Além de outros que não estão mais no departamento como a Profa. Denize e Profa. Maria da Guia.

Numa volta ao passado lembro de uma companhia constante, que nesse momento está muito distante, mas que mesmo assim me ajuda e me aconselha sempre que preciso, Gina Gláucia, uma alemã quase de nascença, amiga desde os tempos de escola.

Agradeço o Prof. Enéas Gomes por aceitar o convite para participar da banca dessa dissertação além de seus conselhos mais do que pertinentes.

Agradeço ainda pelo apoio financeiro à FUNCAP, pela bolsa de mestrado concedida para o desenvolvimento desse trabalho além do CNPq que financia toda a pesquisa em nosso laboratório.

“Os homens apressam-se mais a retribuir
um dano do que um benefício,
porque a gratidão é um peso
e a vingança, um prazer.”

Tacitus

RESUMO

O cloroplasto é uma organela característica dos organismos fotossintetizantes sendo seu papel primordial na geração de energia a partir de gás carbônico e água. Essa organela pode ter seu funcionamento comprometido quando submetida a estresses ambientais devido a fragilidade e complexidade do sistema. Para evitar perdas provocadas pelo estresse existem vários mecanismos de adaptação e regulação das reações que ocorrem no cloroplasto. Recentemente caracterizou-se mais um desses prováveis mecanismos que foi chamado de clororespiração. A clororespiração foi esclarecida com a descoberta de uma enzima similar a oxidase alternativa da mitocôndria que chamou-se de oxidase terminal do plastídeo (PTOX). A função dessa respiração do cloroplasto permanece incerta, mas uma das hipóteses mais aceitas é que o funcionamento da clororespiração poderia prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio através da reciclagem dos intermediários redutores do cloroplasto. No presente trabalho foi caracterizado a presença de dois genes que codificam para a oxidase terminal do plastídeo em plantas de *Zea mays*. Estudou-se também a expressão diferencial de ambos genes da PTOX em resposta ou estresse hídrico, além da caracterização da clororespiração através da atividade da NADH desidrogenase plastidial (NDH) em gel de poliacrilamida. A caracterização molecular dos genes da PTOX mostrou homologia de 60% quando comparadas as sequências dos genes e de 79% quando comparadas as pré-proteínas traduzidas. Os genes dessa proteína têm estruturas similares, sendo compostos por oito introns e 9 éxons. Um estudo das regiões dos promotores dos genes mostrou que existiam elementos comuns porém a presença de elementos diferentes como, o elementos cis MBS que é responsável à seca, poderia revelar uma regulação diferencial dos genes. A resposta diferencial foi confirmada através de RT-PCR semiquantitativo. O gene chamado de *ptox1* teve sua expressão estável, podendo ser considerado um gene constitutivo, enquanto que o gene chamado de *ptox2* teve um aumento da expressão proporcional ao estresse aplicado tanto em folhas como em raízes de plantas de milho. A análise da atividade da NDH em gel (zimograma) revelou a presença dessa enzima em cloroplastos de milho confirmando a presença das enzimas da clororespiração. O estudo filogenético de sequências de cDNA de bancos de dados mostraram que milho e sorgo pertencentes ao grupo das monocotiledôneas, são espécies muito próximas e que compartilham dois genes ortólogos da PTOX identificados como *ptox1* e *ptox2*. Concluiu-se pela primeira vez a presença de dois genes da PTOX no genoma do milho, uma monocotiledônea de metabolismo C4. Os genes foram denominados de *ptox1* e *ptox2*. Eles foram encontrados em raízes e folhas e apenas o gene da *ptox2* pareceu ser induzido em resposta ao estresse osmótico.

ABSTRACT

The chloroplast is an organelle characteristic of photosynthetic organisms and their role in generating energy from carbon dioxide and water. This organelle may be functionally compromised when subjected to environmental stress due to the fragility and complexity of the system. To avoid losses caused by stresses plants have evolved various coping mechanisms, as well as, regulation of the reactions that occur in the chloroplast. Most recently it was characterized one of these mechanisms that was called chlororespiration. The chlororespiration was brought to light with the discovery of an enzyme, similar to the alternative oxidase of mitochondria, that was called the plastid terminal oxidase (PTOX). The function of this chloroplast respiration remains uncertain, but one of the most accepted hypothesis is that the operation of chlororespiration could prevent the formation of reactive oxygen species by recycling the reducing intermediates of the chloroplast. The present study characterized the presence of two genes encoding the plastid terminal oxidase in plants of *Zea mays*., and its differential expression in response to water stress. It was also characterized the chlororespiration through the activity of plastidial NADH dehydrogenase (NDH) in polyacrylamide gel. The molecular characterization of PTOX genes showed 60% homology when compared sequences of genes, but 79% when compared to pre-translated proteins. The genes of this protein have similar structures, being composed of nine exons and eight introns. A study of regions of the promoters of the genes showed that there were common elements, but the presence of different elements such as the cis elements that MBS responsive to drought, could reveal a differential regulation of genes. The differential response was confirmed by semiquantitative RT-PCR. The gene called *ptox1* had its expression level stable and could be considered a constitutive gene, while the gene called *ptox2* had an increased expression proportional to the applied stress in both leaves and roots of maize plants. The analysis of NDH activity gel (zymograms) revealed the presence of this enzyme in maize chloroplasts suggesting the existence of the chlororespiratory pathway. The phylogenetic analysis of cDNA sequences from NCBI databases showed that maize and sorghum, being closely related species, share two genes identified as orthologs of PTOX (*ptox1* and *ptox2*). It was confirmed for the first time the presence of two PTOX genes in the genome of maize, a C4-metabolism monocotyledon and its differential expression under drought stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Diagrama ilustrando o ciclo de desenvolvimento dos plastídeos e a interconversão dos vários tipos de plastídeos. As linhas sólidas são os passos normais no desenvolvimento dos cloroplastos. Já as linhas pontilhadas evidenciam a interconversão dos plastídeos que ocorrem em determinadas situações ambientais ou desenvolvimentais.	18
Figura 2:	(a) Desenho esquemático de um cloroplasto em corte transversal evidenciando a membrana externa (Outer membrane), a membrana interna (Inner membrane) e os tilacóides. (b) Micrografia eletrônica de transmissão mostrando um cloroplasto e os tilacóides arranjados em pilhas (Grana) e o estroma.	20
Figura 3:	Equação geral da fotossíntese, onde (CH ₂ O) representa o carboidrato gerado pela reação de redução.	21
Figura 4:	Integração dos fotossistemas I e II nos cloroplastos. O esquema em “Z” mostra o caminho da transferência de elétrons partindo da oxidação da água até a redução do NADP ⁺ . A linha pontilhada entre Fd e Cyt <i>B₆F</i> mostra a fotofosforilação cíclica ao redor do PSI (Lehninger et al., 2005).	22
Figura 5:	Representação esquemática da cloro-respiração (setas finas) na membrana de tilacóides envolvendo o complexo NDH, que provavelmente é eletrogênico, a PTOX e uma possível interação com a cadeia transportadora de elétrons (Kuntz, 2004).	24
Figura 6:	Organização esquemática estrutural do complexo da Ndh em membranas de tilacóides incluindo as subunidades codificadas pelo genoma do cloroplasto (NDH-A/NDH-K) e as subunidades codificadas pelo genoma nuclear NQO1, NQO2 and NQO3 (Casano et al., 2004).	27
Figura 7:	Modelos correntes para a cloro-respiração. Baseado na localização do complexo NDH e da PTOX. (A) Em cloroplasto de plantas superiores, a cloro-respiração envolve a NDH1 e a PTOX. Caminhos alternativos para redução das plastoquinonas como a NDH2 e a FQR também são mostrados. (B) Em espécies que não possuem genes da NDH plastidiais a cloro-respiração envolveria a PTOX a NDH2 e uma FQR putativa. Em ambos casos, caminhos alternativos para a oxidação das plastoquinonas também estão presentes, mas não são mostrados na figura (Peltier & Cournac, 2002).	29

- Figura 8: Um árvore filogenética gerada a partir de várias espécies eucarióticas e procarióticas demonstrando a separação dos clados de AOX e PTOX. Análise filogenética feita usando 99 resíduos de aminoácidos compreendendo do primeiro ao terceiro motivo de ligação de ferro de AOX e PTOX (Por exemplo: amino acids 182–291 da AOX1a de *A. thaliana*, 135–244 da PTOX de *A. thaliana*) (McDonald and Vanlerberghe, 2006). 30
- Figura 9: Estrutura em detalhe da PTOX. A PTOX é proposta como sendo uma proteína da interface da membrana com um centro de ligação de dois átomos de ferro composto por dois motivos EXXH nas hélices-2 e -4, e dois resíduos de Glu na hélice-1 e -3. A inserção do exon 8 é indicado pela linha em negrito (Fu et al., 2005). 32
- Figura 10: O Caminho de Biossíntese natural dos carotenóides pode ser organizado numa hierarquia tipo árvore. A biossíntese de todos os carotenóides naturais começa pela formação de cadeias com 30 ou 40 carbonos. Essas estruturas são então saturadas, ciclicizadas, oxidadas e modificadas por várias ações enzimáticas subsequentes. Está mostrada na figura muitas das transformações comuns. Carotenóides comuns formados no começo da cadeia, como licopeno, são modificados em diferentes organismos dependendo da enzima presente. As múltiplas rotas originam-se de intermediários comuns a vários produtos finais resultando em caminhos com muitas ramificações (Umeno et al., 2005). 33
- Figura 11: Visão geral da biossíntese de carotenóides nos plastídeos. PSY, sintase do fitoeno; PDS, desaturase do fitoeno; ZDS, desaturase do ζ-caroteno; PTOX, oxidase terminal da plastoquinona; CRISTO, isomerase do carotenóide; LCY-B, β-ciclase do licopeno; LCY-E, ε-ciclase do licopeno; CRTR-B, hidroxilase do β-caroteno; CRTR-E, hidroxilase do ε-caroteno; ZEP, epoxidase da zeaxantina; VDE, de-epoxidase da violoxantina; NXS, sintase da neoxantina; NCED, dioxigenase do 9-*cis*-epoxicarotenóide. (Simkin et al, 2007). 34
- Figura 12: Alinhamento das seqüências dos genes PTOX1 e PTOX 2 usando a ferramenta da web para bioinformática ClustalW do European Bioinformatics Institute do European Molecular Biology Laboratory 46
- Figura 13: Alinhamento da região 5' não traduzida (5'-UTR) dos genes da PTOX através do programa ClustalW do European Bioinformatics Institute do European Molecular Biology Laboratory 47

Figura 14:	Alinhamento da região 3' não traduzida (3'-UTR) dos genes da PTOX através do programa ClustalW do European Bioinformatics Institute do European Molecular Biology Laboratory	47
Figura 15:	Alinhamento das pré-proteínas da PTOX deduzidas através do programa ClustalW.	48
Figura 16:	Estrutura de introns e exons dos genes <i>ptox1</i> (3461pb) e <i>ptox2</i> (3821pb). As regiões 5' e 3' não traduzidas estão indicadas com as cores vermelha e azul respectivamente. Os exons estão representados como linhas grossas e os introns como linhas finas.	49
Figura 17:	Seqüências dos cDNAs dos genes completos da PTOX de milho evidenciando a zona de desenho dos iniciadores específicos para cada um deles.	50
Figura 18:	Eletroforese dos RNAs extraídos de folhas (poços 1, 3 e 5) e raízes (poços 2, 4, e 6) de milho. Acima a banda do RNA 25s, abaixo a banda do RNA 16s e nas raias 1, 3, e 5 a banda adicional típica de RNA extraído de folhas.	50
Figura 19:	Bandas obtidas através de RT-PCR dos genes <i>ptox1</i> (poços 1,2 e 3) e <i>ptox2</i> (poços 5,6 e 7) de raízes de milho em condições controle (poços 1 e 5), 50g/L de PEG 6000 (poços 2 e 6) e 100g/L de PEG 6000 (poços 3 e 7).No poço 4 está o marcador de peso molecular.	51
Figura 20:	Bandas obtidas através de RT-PCR dos genes <i>ptox1</i> (poços 1,2 e 3) e <i>ptox2</i> (poços 5,6 e 7) de folhas de milho em condições controle (raias 1 e 5), 50g/L de PEG 6000 (poços 2 e 6) e 100g/L de PEG 6000 (poços 3 e 7).No poço 4 está o marcador de peso molecular.	51
Figura 21:	Análise dos promotores realizada através da ferramenta on line para bioinformática PlantCARE,uma base de dados de elementos regulatórios do tipo cis de plantas e ferramentas para análise <i>in silico</i> de seqüências de promotores.	53
Figura 22:	Medidas polarográficas de tilacoides de milho. (A) reação de Hill e (B) Reação de Mehler. A liberação ou consumo de O ₂ está expressa em nmoles de O ₂ /mg Chl/Min.	54
Figura 23:	Eletroforese em gel de poliacrilamida nativo mostrando as bandas com atividade de redução do NADH. Foram aplicados 50µg de proteínas de tilacóides em todas as três raias.	55
Figura 24:	Árvore de relações filogenéticas dos genes da PTOX de diferentes espécies de plantas.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PSI - Fotossistema I

PSII - Fotossistema II

NDH - Complexo da NADH desidrogenase

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida

NAD⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Oxidada

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida

NADP⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidada

PTOX - Oxidase Terminal da Plastoquinona

AOX - Oxidase Alternativa

SOD - Dismutase do Superóxido

APX - Peroxidase do Ascorbato

ATP - Adenosina trifosfato

NPQ - Decaimento da Fluorescência da Clorofila Não-Fotoquímico

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

RNA - Ácido Ribonucléico

cDNA - DNA complementar

DOC - Deoxicolato

NBT - Nitrotetrazolium Blue

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIACIONES E SIGLAS	13
1 - INTRODUÇÃO	16
1.1 O Milho (<i>Zea mays</i> L.)	16
1.2 Plastídeos	18
1.3 Cloroplastos e Fotossíntese	20
1.3.1 Cadeia Transportadores de Elétrons	21
1.3.2 A Cloro respiração	23
1.3.3 O Complexo NDH do Plastídeo	26
1.3.4 A Oxidase Temrinal dos Plastídeos	30
1.3.5 Biossíntese de Carotenóides	33
1.3.6 Controle da Expressão Gênica de Proteínas Plastidiais	36
1.4 Estresses Abióticos e Metabolismo Energético	36
1.4.1 Estresse Osmótico	37
1.5 A Bioinfortática	37
2 Objetivos	39
3 Materiais e Métodos	40
3.1 Material Vegetal	40
3.2 Germinação de Sementes	40
3.3 Aplicação do Estresse Osmótico	40
3.4 Isolamento de Cloroplastos	41
3.5 Dosagem de Clorofila	41
3.6 Medidas Polarográficas	42
3.7 Determinação de Proteínas	42
3.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Nativo e Atividade da NADH Desidrogenase	43
3.9 Extração de RNA Total	43

3.10	Quantificação e Pureza de RNA Total	43
3.11	Expressão dos Genes da PTOX	44
3.12	Análises de Bioinformática dos Genes da PTOX	44
4	Resultados	46
4.1	Análise dos genes da PTOX do milho por Bioinformática	46
4.2	Análise da expressão dos genes da PTOX do milho sob condições de estresse	49
4.3	Análise da região dos promotores dos genes <i>ptox1</i> e <i>ptox2</i>	52
4.4	Ensaio polarográfico e detecção da atividade da PTOX em tilacóides isolados de folhas de plantas de milho	53
4.5	Atividade da NADH Desidrogenase em gel nativo de poliacrilamida a partir de tilacóides isolados	55
4.6	Relações filogenéticas dos genes da PTOX	56
4.7	Padrões de expressão da PTOX em milho	57
5	Discussão	58
6	Conclusão	64
7	Referências Bibliográficas	65

1 INTRODUÇÃO

A fotossíntese e a respiração são os principais processos bioenergéticos dos organismos vivos coexistindo dentro das células de plantas e assim, o entendimento do metabolismo energético é de fundamental importância na compreensão do ajustamento das plantas às condições adversas.

1.1 O Milho (*Zea mays* L.)

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal extensivamente utilizado como alimento humano ou ração animal, devido às suas qualidades nutricionais. De acordo com a classificação botânica o milho pertence à ordem *Gramineae*, família *Graminaceae*, sub-família *Panicoideae*, tribu *Maydeae*, gênero *Zea*, espécie *Zea mays*. Existem várias espécies e variedades de milho, todas pertencentes ao gênero *Zea* o qual é considerado monotípico e constituído por uma única espécie, ou seja, *Zea mays* L.

O milho é uma planta de metabolismo C4 que é característico das monotiledôneas da família das gramíneas que habitam regiões quentes e secas. Tais plantas desenvolveram um mecanismo para se proteger contra o efeito desperdiçador de energia que é a fotorrespiração. O passo no qual ocorre a assimilação de CO₂ em um produto de três átomos de carbono (3-fosfoglicerato), típico de plantas de metabolismo C3, é precedido de várias etapas, havendo a fixação temporária de CO₂ em um composto de quatro átomos de carbonos (malato), daí a denominação de plantas C4. A fotossíntese em plantas C4 envolve dois tipos de células adjacentes: mesofilicas, responsáveis pela fotofosforilação cíclica e envoltórias do feixe vascular, responsáveis pela fixação de CO₂ propriamente dita. Essa separação espacial de duas rotas metabólicas interdependentes só é possível devido ao mecanismo de concentração de CO₂ nas células da bainha através de sua liberação pela quebra de uma moléculas de ácido orgânico com quatro carbonos e a transferência de poder redutor das células do mesófilo (Buchanan et al., 2000).

O crescimento e o desenvolvimento da planta do milho são dependentes de calor e de umidade adequados para o alcance de índices de produção elevados. Devido ao grande número de variedades já existentes e ainda ao aprimoramento

dos métodos de melhoramento, através da Genética, viabilizando o aparecimento de novas variedades e de novos híbridos, esse cereal pode ser cultivado em larga faixa do globo terrestre com grandes variações climáticas, apesar de sua origem tropical.

A história do milho é um dos tópicos mais debatidos na arqueologia do novo mundo. Estudos genéticos e moleculares indicam que a domesticação do milho ocorreu no sudeste do México e o cultivo do milho se espalhou pelo golfo do México pelo menos 7.000 anos atrás (Pohl et al., 2007).

O cultivo do milho geralmente é mecanizado, beneficiando-se de técnicas modernas de plantio e de colheita. Os Estados Unidos são o maior produtor mundial de milho e, em 2004, a produção chegou a 600 milhões de toneladas em todo o mundo. Esse elevado índice de produção reflete também o vasto cultivo do milho em diversas regiões do mundo. O Brasil ocupa posição de destaque como produtor e exportador sendo os estados de São Paulo e Paraná líderes na sua produção.

Atualmente somente cerca de 5% da produção brasileira é destinada ao consumo humano e mesmo assim, grande parte de maneira indireta, como matéria prima, na composição de outros produtos. Tal fato, se deve principalmente à falta de informação sobre o milho e à ausência de uma maior divulgação de suas qualidades nutricionais, bem como aos hábitos alimentares da população brasileira, que privilegia outros grãos.

O principal destaque da safra brasileira de grãos em 2007 foi o milho, com um crescimento de quase 9,2 milhões de toneladas (21,5%) em relação ao ano de 2006. Os produtores brasileiros ampliaram em 11,5% a área cultivada, em função da demanda externa, o que rendeu aumento de divisas. O aquecimento dos preços do milho no mercado externo deveu-se ao fato de os Estados Unidos, maior produtor e exportador mundial, destinar parte da sua produção para a fabricação de etanol, com o objetivo de diminuir a dependência do petróleo, que tem atingido preços elevados (IBGE, 2003).

Esses dados indicam o interesse crescente do aumento das safras de milho.

O interesse do aumento das safras do milho, aliado sobretudo, ao fato do milho ser uma planta de metabolismo C4 nos incentivou a utilizar essa cultura como modelo experimental para a compreensão do metabolismo energético através da

caracterização de uma proteína desacopladora localizada no cloroplasto, a oxidase terminal da plastoquinona (PTOX).

1.2 Plastídeos

Os plastídeos são organelas encontradas somente em células de plantas e de algas. Eles são responsáveis pela fotossíntese, pela armazenagem de vários produtos e pela síntese de moléculas-chaves requeridas para a arquitetura básica e funcionamento das células vegetais (Buchanan et al., 2000).

Os plastídeos são derivados de endossimbiose procariótica e, durante o processo de simbiogênese, muitos dos genes do organismo simbiote foram perdidos ou transferidos para o núcleo da célula hospedeira. O genoma do plastídeo de plantas superiores conservou em torno de 87 proteínas (Peltier & Cournac, 2002). Entretanto, essas são apenas uma fração do total de proteínas requeridas para a biogênese e o funcionamento do cloroplasto (Aluru & Rodermel, 2004).

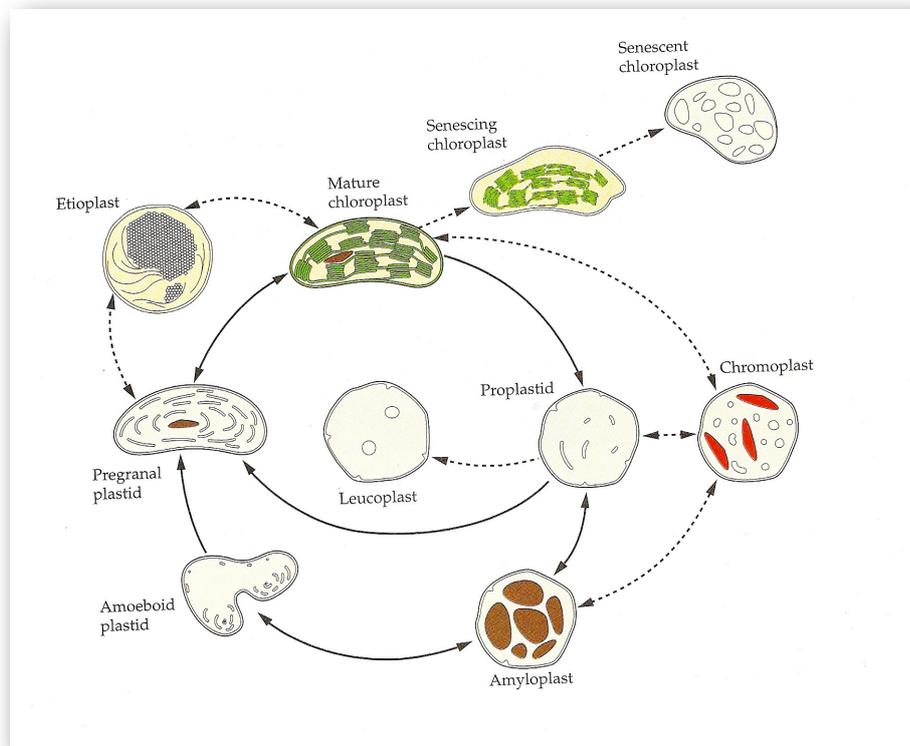


Figura 1: Diagrama ilustrando o ciclo de desenvolvimento dos plastídeos e a interconversão dos vários tipos de plastídeos. As linhas sólidas são os passos normais no desenvolvimento dos cloroplastos. Já as linhas pontilhadas evidenciam a interconversão dos plastídeos que ocorrem em determinadas situações ambientais ou desenvolvimentais (Buchanan et al., 2000).

Foi proposto um modelo para interrelacionar a biogênese e a diferenciação dos vários tipos de plastídeos (Tilney-Basset, 1989). Nesse modelo são identificados sete estágios na via de desenvolvimento dos plastídeos: proplastídeo, amiloplasto e plastídeo amebóide, que são agrupados nos primeiros estágios de desenvolvimento como proplastídeos não-verdes, os leucoplastos e os etioplastos. O cloroplasto fotossinteticamente ativo é um estágio maduro que dá lugar, com o envelhecimento, a cloroplastos senescentes. Ainda existem outros tipos de plastídeos como os cromoplastos dos frutos e das flores (Figura 1).

Proplastídeos: São os precursores dos outros tipos de plastídeos e estão presentes sempre em regiões meristemáticas jovens. O interior dos proplastídeos é uniforme, denso e com grânulos finos contendo muito menos ribossomos que plastídeos mais diferenciados como os plastídeos amebóides, etioplastos ou cloroplastos.

Plastídeo Amebóide: Estas formas estão presentes nos primeiros estágios de desenvolvimento. Esses plastídeos passam por uma série de formas amebóides intermediárias à medida que se desenvolvem para tomar a forma lenticular característica do cloroplasto. A transição de cloroplasto para cromoplasto também implica a passagem por formas amebóides.

Amiloplastos: São plastídeos despigmentados que lembram os proplastídeos mas com grânulos de amido. São organelas muito comuns em órgãos de reserva como os tubérculos de batata.

Leucoplastos: São plastídeos sem cor que estão diretamente envolvidos na síntese de monoterpenos que são os compostos voláteis dos óleos essenciais.

Cloroplastos: São os plastídeos verdes e fotossintetizantes responsáveis pela captura da luz. Geralmente são hemiesféricos ou com formato de lentes mas podem tomar formas diferentes em musgos e algas.

Etioplastos: São característicos de folhas estioladas, eles estão presentes quando o desenvolvimento de proplastídeos em formas mais diferenciadas é barrado pela ausência de luz. Ocorre a formação de corpos prolamelares, os quais são semicristalinos e compostos por membranas tubulares.

Cromoplastos: É o termo usado para os plastídeos que contêm carotenóides responsáveis pela cor das flores de muitos frutos maduros, algumas

raízes e folhas senescentes. Esses plastídeos possuem formas variáveis e caracterizam-se pela falta de clorofila *a* e *b*.

1.3 Cloroplasto e Fotossíntese

Nos eucariotos as reações biofísicas e bioquímicas da fotossíntese ocorrem em um plastídeo especializado, o cloroplasto. Os cloroplastos de plantas superiores apresentam um sistema de membranas duplas consistindo de uma membrana externa e de uma membrana interna. A membrana interna conhecida como membrana do tilacóide encerra o compartimento interno. Esse compartimento contém vesículas ou sacos achatados denominados de tilacóides, os quais usualmente são arranjados em pilhas chamadas grana. A membrana interna circunda uma fase aquosa chama *grana*. Os pigmentos fotossintetizantes e os complexos enzimáticos que promovem as reações luminosas e a síntese de ATP estão embebidos nas membranas dos tilacóides e o estroma contém as enzimas requeridas para as reações de assimilação do carbono (Figura 2).

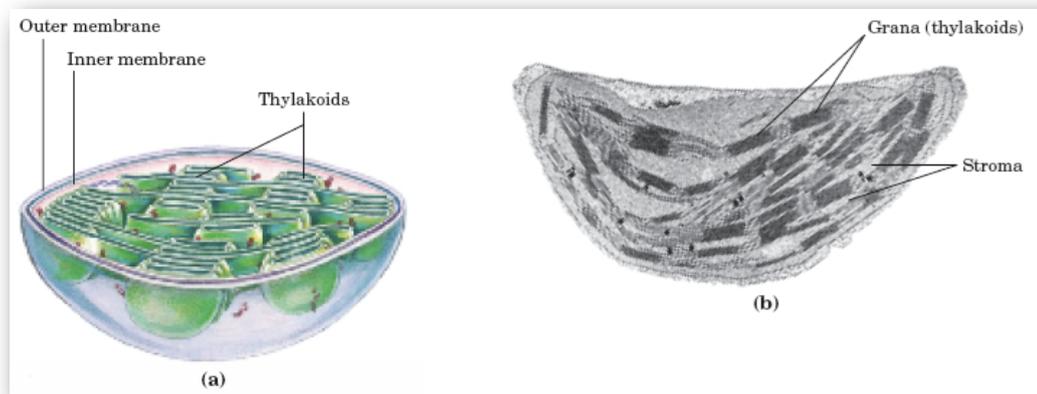


Figura 2: (a) Desenho esquemático de um cloroplasto em corte transversal evidenciando a membrana externa (Outer membrane), a membrana interna (Inner membrane) e os tilacóides. (b) Micrografia eletrônica de transmissão mostrando um cloroplasto com os tilacóides arranjados em pilhas (Grana) e o estroma (Nelson & Cox, 2005).

Os organismos fotossintetizantes captam a energia solar e sintetizam ATP e NADPH, os quais são usados como fonte de energia para sintetizar carboidratos a partir de CO_2 e H_2O liberando O_2 para atmosfera (Figura 3).

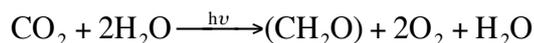


Figura 3: Equação geral da fotossíntese, onde (CH₂O) representa o carboidrato gerado pela reação de redução.

A produção de oxigênio pelas plantas foi documentada pela primeira vez por Priestley, em 1771, quando ele observou que uma vela em combustão, em câmara de vidro, não se apagava na presença de uma planta. Em 1779, Jan Ingenhousz, documentou que a luz era indispensável para a produção de oxigênio pelas plantas (Taiz & Zeiger, 2002).

Muito mais tarde, os cloroplastos e os tilacóides foram identificados como sendo o sítio de produção de oxigênio nos fototróficos, partindo-se da água, mas nenhum consumo de oxigênio foi considerado como ocorrendo nos cloroplastos. Em 1937, Robert Hill, descobriu que quando extrato de folhas contendo cloroplastos era iluminado produzia O₂ e reduzia um aceptor não biológico denominado reagente de Hill. Posteriormente Severo Ochoa mostrou que o NADP⁺ era o aceptor biológico no cloroplasto (Taiz & Zeiger, 2002).

Em 1951, Mehler descobriu o consumo de oxigênio em presença de luz partindo-se do O₂ para H₂O₂ nos tilacóides através da detecção da formação de acetaldeído em presença de etanol e catalase (Asada, 1999).

1.3.1 Cadeia Transportadora de Elétrons

O cloroplasto, como a mitocôndria, apresenta uma cadeia transportadora de elétrons a qual também está acoplada à síntese de ATP. Durante a fotossíntese, dois fotossistemas (PSII e PSI) acoplados através da referida cadeia transportadora de elétrons, chamado esquema “Z” da fotossíntese (Figura 4), transformam luz em energia química, na forma de ATP e NADPH, a qual é usada para a fixação de CO₂ e outras reações de assimilação (Cournac et al., 2000).

A figura 4 mostra que a excitação dos fotossistemas II e I e posterior oxidação dos mesmos conduzem à produção de O₂ a partir da água e a produção de NADPH+H⁺ gerando também um gradiente de prótons que leva à formação de ATP. A transferência de elétrons entre PSII e PSI, a partir de um centro fotoquímico excitado (P680*), é um processo espontâneo, isto é, a favor de um potencial elétrico

envolvendo os seguintes intermediários: feofitina, plastoquinona A e B, complexo do citocromo *b₆f* e plastocianina. Igualmente, a transferência de elétrons de PSI, a partir do centro fotoquímico excitado (P700*), para o NADP⁺ é espontânea e envolve os seguintes intermediários: um complexo de proteínas Fe-S, a ferredoxina e uma ferredoxina NADP⁺ oxidoreductase. Embora a luz seja elemento essencial para a realização da fotossíntese, a maquinaria fotossintética é susceptível a danos induzidos pela luz. Tais danos são causados pela geração inevitável de intermediários reativos ou espécies reativas de oxigênio.

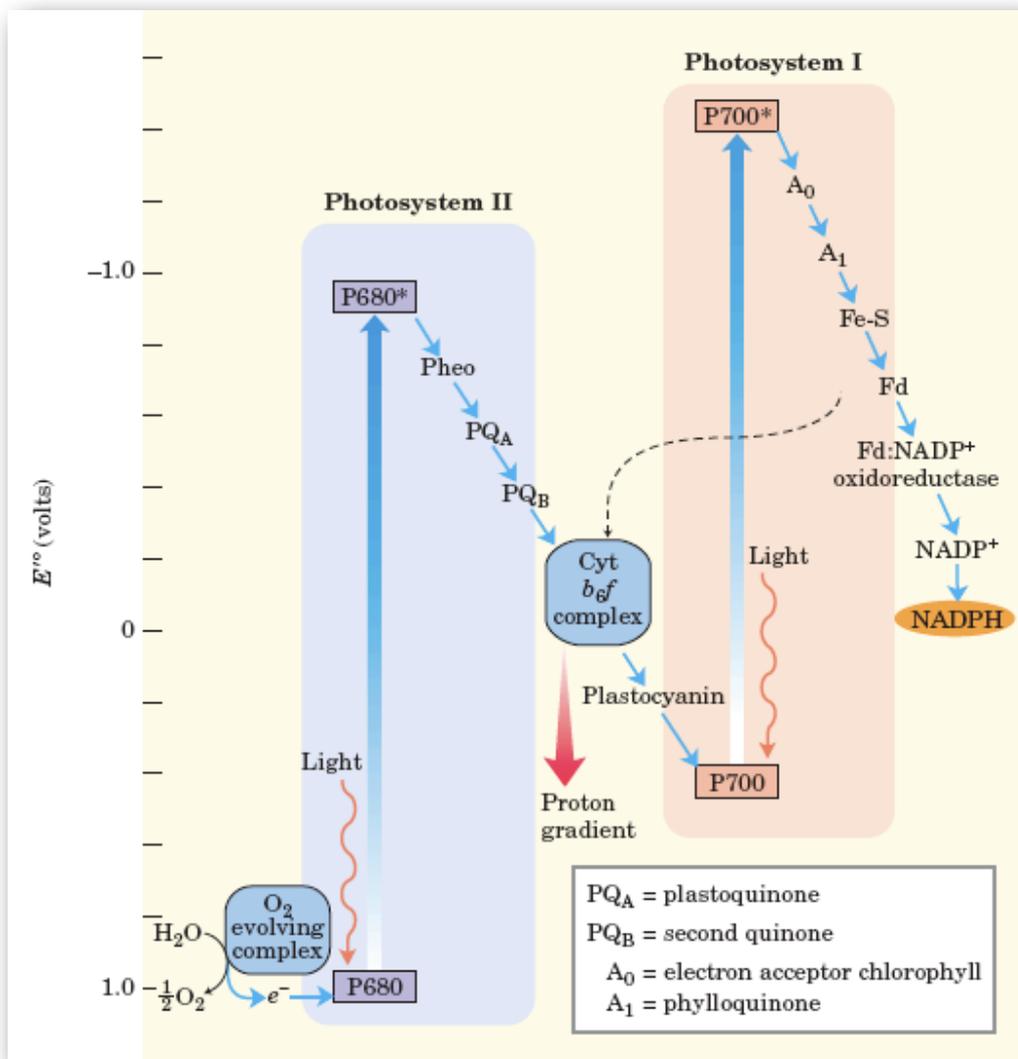


Figura 4: Integração dos fotossistemas I e II nos cloroplastos. O esquema em “Z” mostra o caminho da transferência de elétrons partindo da oxidação da água até a redução do NADP⁺. A linha pontilhada entre Fd e Cyt *b₆f* mostra a fotofosforilação cíclica ao redor do PSI (Nelson & Cox, 2005).

A variação da intensidade luminosa, bem como estresses ambientais, tais como frio, seca, altas temperaturas, salinidade e deficiência de nutrientes, que são limitantes da fixação de CO₂, podem favorecer a absorção de mais energia luminosa gerando danos induzidos pela própria luz. Assim, as plantas desenvolveram numerosos mecanismos fotoprotetores, envolvendo antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos, dentre outros (Niyogi, 2000).

Caminhos alternativos de elétrons podem servir como um desvio ajudando a prevenir a redução exacerbada das vias envolvidas com o então chamado esquema “Z”, evitando assim, a formação da clorofila tripleto e a superredução do PSII. Envolvidos com essa proteção, pode-se citar o sistema tiorredoxina, a fotorrespiração, as enzimas superóxido dismutase (SOD) e a peroxidase do ascorbato (APX) (Niyogi, 2000). As enzimas SOD e APX são essenciais na estratégia de proteção das plantas através de mecanismos de ajustamento dos tilacóides como o ciclo água-água em resposta a alta intensidade luminosa (Kanervo et al.; 2005). Outros mecanismos são o transporte cíclico de elétrons em torno de PSI e a clororrespiração, isto é, a respiração não fotoquímica nos cloroplastos, a qual está envolvida na fotoproteção através da oxidação dos redutores do estroma (Bennoun, 2001; Peltier & Cournac, 2002).

1.3.2 A Clororrespiração

Fotossíntese e respiração, os dois principais processos bioenergéticos dos organismos vivos, coexistem nas células vegetais. Enquanto a cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese é claramente restrita aos cloroplastos, a cadeia de transporte de elétrons da respiração celular, antes pensada como sendo restrita à mitocôndria, está presente também nos cloroplastos (Bennoun, 1982 & Peltier et al., 1987). Essa respiração do cloroplasto, chamada de clororrespiração para diferenciar da mitorrespiração (Bennoun, 1982), provavelmente tem sua origem nas cianobactérias endossimbióticas ancestrais do cloroplasto (Scherer, 1990).

A primeira evidência da redução não-fotoquímica da plastoquinona veio de estudos sobre o metabolismo do H₂ em microalgas. Gaffron & Rubin, em 1942, observaram que algas verdes unicelulares, como *Scenedesmus obliquus* ou *Chlamydomonas*, em condições anaeróbicas, catalisavam a redução do CO₂ usando

H₂ como doador de elétrons, ou produziam H₂. Essas reações requeriam a atividade do PSI e um período de adaptação sob condições anaeróbicas para que fosse iniciada a biossíntese e/ou ativação de uma hidrogenase responsável pela catálise de uma reação reversível. A produção de H₂, bem como a redução de CO₂ dependente de H₂ são processos insensíveis ao herbicida 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia (DCMU), evidenciando assim que os elétrons são originários de uma fonte diferente do PSII. No entanto, essas reações são sensíveis a 2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-*p*-benzoquinona (DBMIB), um análogo de quinonas, inibidor do citocromo *b₆f*, mostrando nesse caso o envolvimento das plastoquinonas (Godde & Trebst, 1980; Gfeller & Gibbs, 1985; Maione & Gibbs, 1986).

A cloro-respiração é definida como sendo o transporte de elétrons de moléculas redutoras endógenas (NADH ou NADPH) para o “pool” de quinonas, o qual é transferido para o O₂, através de uma oxidase terminal semelhante a oxidase alternativa da mitocôndria (Figura 5)(Kuntz, 2004).

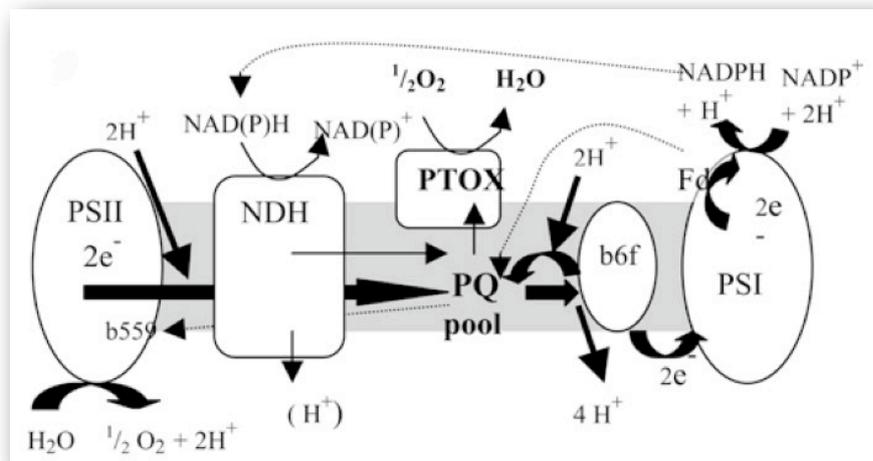


Figura 5: Representação esquemática da cloro-respiração (setas finas) na membrana de tilacóides envolvendo o complexo NDH, que provavelmente é eletrogênico, a PTOX e uma possível interação com a cadeia transportadora de elétrons (Kuntz, 2004).

Por muito tempo especulou-se a possível existência da PTOX mas somente em 1999 ela foi isolada e caracterizada através de uma linhagem de *Arabidopsis* mutante (Carol et al, 1999; Wu et al, 1999). Assim, apenas mais recentemente é que se dispõe de evidências moleculares que dão suporte à cloro-respiração (Peltier & Cournac, 2002). A linhagem de *Arabidopsis* mutante,

chamada de “*IMMUTANS*”, apresentava um fenótipo denominado “variegate”, com poucos setores despigmentados em condições de pouca e média luminosidade. Entretanto, quando as plantas eram expostas a altas taxas de luminosidade ficavam quase totalmente despigmentadas, mostrando uma resposta fraca ou inadequada ao estresse fotooxidativo. Foi identificado que tal fenótipo ocorria devido ao acúmulo de fitoeno, o primeiro precursor da síntese de carotenóides (Carol & Kuntz, 2001).

Assim reitera-se o conceito de cloroespiração como um caminho alternativo de elétrons envolvendo a redução da plastoquinona (PQ) pela ação da NDH e a oxidação da PQ reduzida pela oxidase terminal (PTOX) com redução do oxigênio a água (Nixon, 2000; Bennoun, 2001; Aluru & Rodermel, 2004).

Sabe-se que, em condições especiais de saturação da cadeia transportadora de elétrons nos cloroplastos (esquema “Z”), funciona um transporte cíclico de elétrons com a finalidade de controlar a captação de luz através de um mecanismo não fotoquímico de decaimento de fluorescência da clorofila (NPQ) (Johnson, 2005).

A ação conjunta do complexo NDH e PTOX poderá otimizar a eficiência do transporte cíclico de elétrons através do balanceamento do estado redox dos carreadores de elétrons entre os fotossistemas. Em condições de estresse, outros papéis desses componentes devem sobrepor à função no balanço de energia evitando super-redução de aceptores de elétrons de PSI, eliminando espécies reativas de oxigênio (ROS) e assim protegendo o PSI de fotoinibição (Rumeau, 2007).

É interesse de distintos grupos de pesquisa quantificar o fluxo de elétrons através da cloroespiração (Bennoun, 1982; Peltier et al., 1987; Büchel & Garab, 1995; Feild et al., 1998). Contudo, tais estimativas devem ser avaliadas com muito cuidado vez que parte dos experimentos são baseados em medidas relativas de PQ, doadores de elétrons do estroma e O₂, os quais são alvo de alterações quando há variações na respiração mitocondrial (Feild et al., 1998).

Outras abordagens foram tentadas através da utilização de inibidores da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. O uso de cianeto não teve efeito na cloroespiração mas o propil-galato, inibidor da AOX mitocondrial, inibiu a quinol oxidase da cloroespiração em células de *Chlamydomonas* (Cournac et al., 2000; & Josse et al., 2000). Nessas células, a taxa de consumo de O₂ da cloroespiração foi

estimada em aproximadamente $50 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ clorofila, o que representa aproximadamente 2% da taxa do fluxo de elétrons máximo da fotossíntese (Cournac et al., 2002). Outra forma de avaliar a importância da cloro-respiração é determinando-se a abundância relativa dos complexos da cloro-respiração na membrana dos tilacóides. Em plantas C3 sob condições ótimas de desenvolvimento, a NDH é um componente minoritário da membrana do tilacóide, representando aproximadamente 0,2% do total das proteínas presentes. (Sazanov et al., 1996). Então, quando comparada com a fotossíntese a cloro-respiração parece ser um processo quantitativamente menor nos cloroplastos das plantas superiores (Peltier & Cournac, 2002).

1.3.3 O Complexo NDH do Plastídeo

Como já foi explicitado, em adição ao esquema “Z” da fotossíntese, que produz oxigênio, os cloroplastos das plantas superiores contêm carreadores de elétrons responsáveis por uma cadeia de transporte de elétrons respiratória que é consumidora de oxigênio e que põe em evidência o papel da NDH (Nixon, 2000; Peltier & Cournac, 2002).

A identificação de um complexo de desidrogenase do NAD(P)H nas membranas de tilacóides remonta de 1986, com a caracterização de genes plastídiais codificando para genes homólogos às subunidades do complexo I da mitocôndria (Shinozaki et al., 1986, Ohyama et al., 1988). Tal complexo foi purificado e parcialmente caracterizado (Berger et al., 1993; Guedeney et al., 1996; Burrows et al., 1998; Sazanov. et al., 1998).

Estudos de plantas de tabaco transgênico com genes da NDH inativados implicaram no desaparecimento da cloro-respiração, pondo em evidência o papel primordial desse complexo na redução não fotoquímica da plastoquinona (Burrows et al., 1998; Kofler et al., 1998; Shikanai et al., 1998; Horvath et al., 2000). Além do envolvimento deste complexo na cloro-respiração, ele também está envolvido no transporte cíclico de elétrons no PS I e parece que, em plantas de metabolismo C3, tal transporte cíclico regula o ΔpH (Burrows et al., 1998; Shikanai et al., 1998; Horvath et al., 2000; Joët et al., 2002). Tais reações permitem um funcionamento ótimo da fotossíntese aumentando o gradiente de pH e suprindo ATP extra para a

fixação de CO₂. Tal função seria importante em condições de estresse ambiental, como seca, onde a demanda por ATP é aumentada (Horvath et al., 2000). Dois esquemas de transporte cíclicos de elétrons ao redor do PS I têm sido descritos, um sensível a antimicina A e outro que envolve o complexo NDH que é insensível a antimicina A (Joët et al., 2001; Munekage et al., 2004). Joët et al. (2002) mostraram que em plantas C3, o transporte de elétrons cíclico mediado pelo PSI é controlado pela concentração de O₂ atmosférico através de mudanças no estado redox dos transportadores de elétrons e/ou por mudanças no estados redox de espécie redutoras do estroma.

Outros estudos mostraram que o NADH era o doador de elétrons preferencial da NDH, nem NADPH ou ferredoxina têm sido reportados como sendo doador de elétrons para a NDH do plastídeo (Burrows et al., 1998; Kofler et al., 1998; Pieulle et al., 2000, Darie et al., 2006).

O complexo NDH é constituído de distintas subunidades codificadas pelo núcleo e pelo genoma do cloroplasto (Rumeau et al., 2007). Com base no genoma do plastídeo, o complexo NDH teria 11 subunidades (NDH-A a -K). Entretanto considerando-se a homologia com o complexo bacteriano prevê-se a existência de subunidades adicionais. Em 2005 Rumeau e colaboradores identificaram mais 3 subunidades (NDH-M, -N e -O) homólogas às de cianobactérias e de plantas superiores que são codificadas pelo genoma nuclear e têm funções essenciais para o plastídeo.

Casano et al. em 2004, através do uso de técnicas bioquímicas de purificação, seqüenciamento e de análise de proteínas, além de técnicas de bioinformática propôs um modelo para o complexo da NDH, como uma proteína integral de membrana com 14 subunidades (Figura 6).

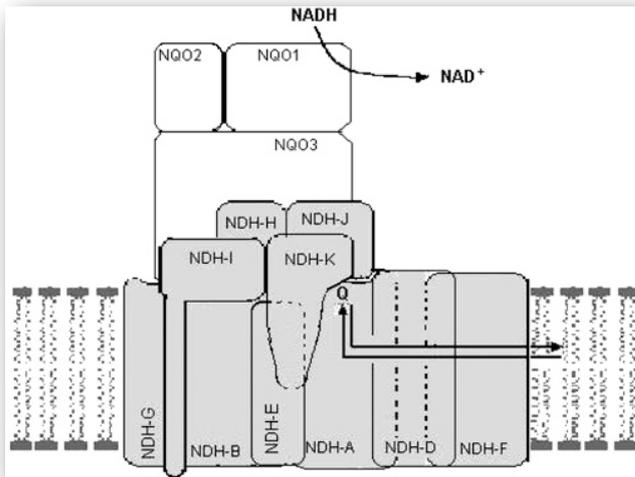


FIGURA 6: Organização esquemática estrutural do complexo da NDH em membranas de tilacóides incluindo as subunidades codificadas pelo genoma do cloroplasto (NDH-A/NDH-K) e as subunidades codificadas pelo genoma nuclear NQO1, NQO2 and NQO3 (Casano et al., 2004).

Em milho, uma planta C₄, cloroplastos do mesofilo contêm altas concentrações de O₂, enquanto que nos cloroplastos da bainha uma alta taxa de anaerobiose é necessária para a fixação eficiente de CO₂. Nos cloroplastos da bainha praticamente não existe PSII funcional (Woo et al., 1970), da mesma forma não existe transporte linear de elétrons. Entretanto, a alta demanda por ATP nos cloroplastos da bainha é suprida por altas taxas do transporte cíclico de elétrons. Levando em conta que a anaerobiose favorece o transporte cíclico de elétrons e que altas concentrações do complexo NDH está presente nas células da bainha, o envolvimento do complexo NDH no transporte cíclico de elétrons devia ser evidente. Todavia, nenhum estudo funcional dos cloroplastos da bainha envolvendo o complexo NDH tem sido levado a cabo. Nos cloroplasto do mesofilo, altas concentrações de O₂ e a presença de *grana* bem desenvolvidos contendo PS II inibe o transporte cíclico de elétrons. Essas altas concentrações de O₂ levam a altas taxas de fotorespiração e altas concentrações de espécies reativas de oxigênio devem ser produzidas, sugerindo o consumo de oxigênio. Esse consumo poderia ser atingido pela redução do “pool” de PQs pelo complexo da NDH, mas ainda não foram feitos estudos com o complexo NDH em cloroplastos do mesofilo também (Darie et al., 2006).

É bastante aceito que o fluxo cíclico de elétrons ao redor do PSI pode prover ATP para alguns caminhos metabólicos especiais, como por exemplo, o mecanismo de aumento da concentração de CO₂ em cianobactérias e em células da bainha de plantas do tipo C₄ onde existe elevada atividade do ciclo de Calvin que demanda ATP (Rumeau et al., 2007)

Em contraste com as plantas superiores, já foi mostrado que algas verdes e algumas algas vermelhas, não possuem os genes para as subunidades da NDH, nem no genoma do plastídeo nem no genoma nuclear. No entanto, a presença de genes plastidiais codificantes para a NDH em algas ancestrais como *Nephroselmis olivacea* ou *Mesostigma viride* é intrigante (Turmel et al., 1999; Lemieux et al., 2000). Em espécies que não possuem os genes para a NDH, como *Chlamydomonas*, foi encontrado a presença de outro complexo plastidial que oxida o NADH. Esse complexo foi caracterizado como sendo sensível à rotenona e tal fato foi aceito como sendo uma evidência do processo da cloro-respiração. Essa NDH sensível à rotenona foi chamada de NDH2 para diferenciá-la da NDH1 de plantas superiores (Figura 7) (Godde & Trebst, 1980; Godde, 1982; Maione & Gibbs, 1986).

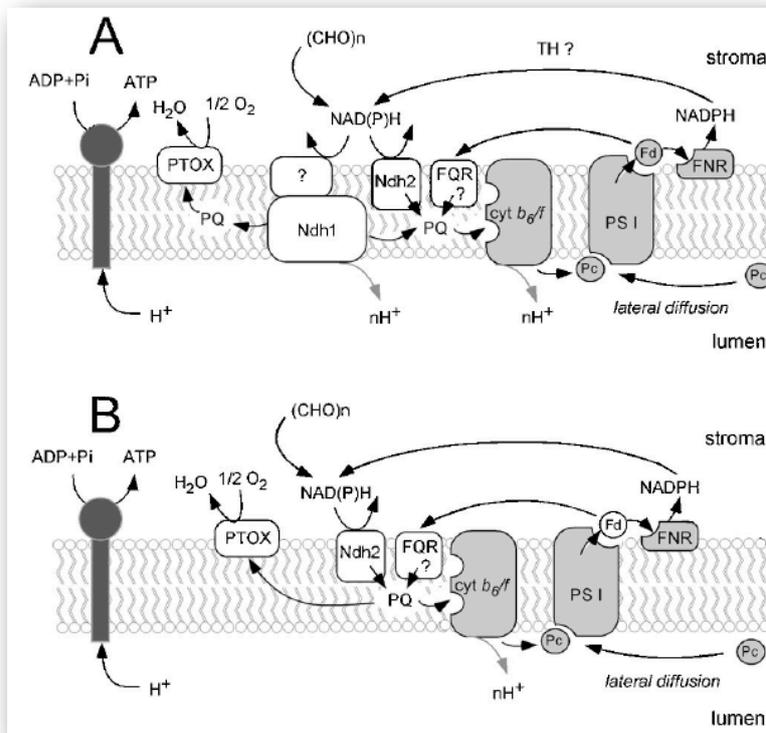


Figura 7: Modelos correntes para a cloro-respiração. Baseado na localização do complexo NDH e da PTOX. (A) Em cloroplasto de plantas superiores, a cloro-respiração envolve a NDH1 e a PTOX. Caminhos alternativos para redução das plastoquinonas como a NDH2 e a FQR também são mostrados. (B) Em espécies que não possuem genes da NDH plastidiais a cloro-respiração envolveria a PTOX a NDH2 e uma FQR putativa. Em ambos casos, caminhos alternativos para a oxidação das plastoquinonas também estão presentes, mas não são mostrados na figura (Peltier & Cournac, 2002).

Outra função que foi atribuída ao complexo da NDH vem da observação da existência de altas quantidades das subunidades do complexo NDH nos etioplastos (Fischer et al., 1997; Guera et al., 2000; Lennon et al. 2003). Essa observação levou a construção da hipótese de que os componentes da cloro-respiração poderiam energizar a membrana dos plastídeos e favorecer a síntese e/ou inserção dos complexos fotossintéticos durante o processo de desenvolvimento de cloroplastos. Entretanto, a ausência de fenótipos óbvios

relacionados ao desenvolvimento dos cloroplastos, em mutantes deficientes do complexo da NDH, sugere que esse papel não é essencial (Rumeau et al., 2007)

Hoje em dia, uma função bastante aceita para a cloro-respiração é o seu papel em atenuar o estresse em virtude do aumento de sua atividade e da quantidade de proteína do complexo NDH em resposta ao estresse fotooxidativo. Essa conclusão é reforçada pelo fato de que mutantes deficientes para o complexo NDH mostraram alta sensibilidade ao estresse fotooxidativo. Assim, a cloro-respiração poderia ser reconhecida como um mecanismo que otimizaria o transporte cíclico de elétrons da fotossíntese, sob diferentes condições ambientais, diminuindo as espécies reativas de oxigênio constantemente geradas pelo estresse fotoquímico (Casano et al., 2004).

1.3.4 A Oxidase Terminal do Plastídeo

Proteínas do tipo carboxiladas di-ferro (grupo ao qual pertencem a AOX e a PTOX) são muito antigas, pois estão presentes em todos os reinos (incluindo *Archaeobacteria*) e tanto nos aeróbios como nos anaeróbios (Gomes et al., 2001). Outros membros dessa classe de proteínas incluem, redutases de ribonucleotídeos, ferritinas, bacterioferritinas, Δ^9 -dessaturases, mono-oxigenases do metano e rubreritinas. Uma combinação de análises estruturais e de sequências mostrou que essa classe de proteínas é caracterizada pela presença de um centro di-ferro não-heme (no qual os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação do metal são altamente conservados) contido dentro de uma conformação de quatro α -hélices estruturalmente conservadas (McDonald & Vanlerberghe, 2006)

A PTOX é codificada por um gene nuclear e sintetizada como uma proteína precursora contendo uma extensão N-terminal a qual é proteoliticamente degradada depois de importada para o cloroplasto (Carol et al., 1999). As sequências da AOX e da PTOX estão relacionadas e ambas apresentam na extremidade C-terminal um sítio ligante de Ferro (Figura 8)(Carol & Kuntz, 2001). O papel metabólico e fisiológico dessas duas oxidases dissipadoras de energia ainda é alvo de intensa investigação (McDonald & Vanlerberghe, 2006).

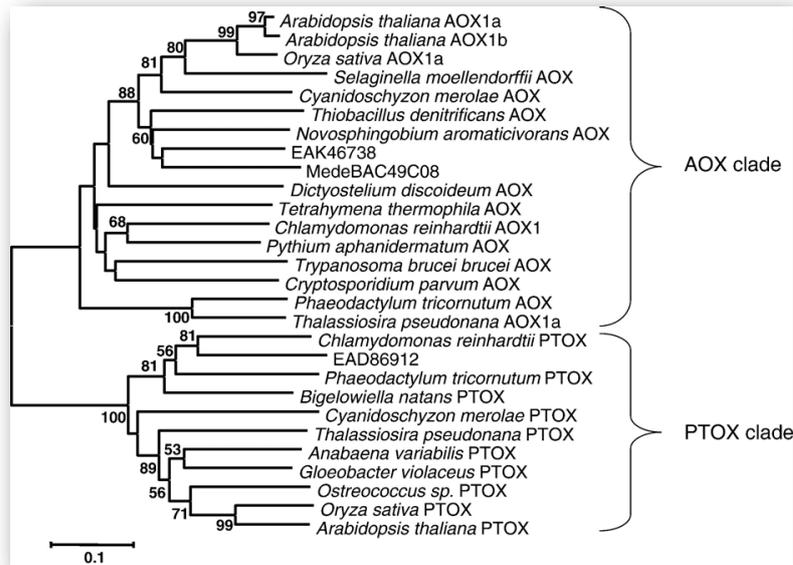


Figura 8: Um árvore filogenética gerada a partir de várias espécies eucarióticas e procarióticas demonstrando a separação dos clados de AOX e PTOX. Análise filogenética feita usando 99 resíduos de aminoácidos compreendendo do primeiro ao terceiro motivo de ligação de ferro de AOX e PTOX (Por exemplo: aminoácidos 182–291 da AOX1a de *A. thaliana*, 135–244 da PTOX de *A. thaliana*) (McDonald and Vanlerberghe, 2006).

A PTOX mostra uma similaridade limitada com a oxidase alternativa da mitocôndria (AOX). Análises filogenéticas entre AOX e PTOX mostraram que elas estão agrupadas em famílias separadas (Carol & Kuntz, 2001). Genes da *ptox* são encontrados em monocots (Kong et al. 2003) e na alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Chen & Melis 2002). Um gene homólogo ao da *ptox* também está presente no ameboflagelado *Bigelowiella natans* (Archibald et al. 2003), que é o resultado de um segundo evento endossimbiótico. Interessantemente, genes homólogos ao da *ptox* são encontrados na cianobactéria *Anabaena* sp. PCC7120 (Kaneko et al., 2001) e no proclorofito *Prochlorococcus marinus* str. MED4 (Rocap et al. 2003), como também no *Gloeobacter violaceus* PCC7421, uma cianobactéria que não tem cloroplastos (Nakamura et al. 2003). Essas observações sugerem uma origem procariótica para a *ptox* (Kuntz, 2004).

Dados anteriores de experimentos com “light shift” indicam que a PTOX é expressa cedo no desenvolvimento do cotilédone (Röbbelen 1968, Wetzal et al. 1994). Durante essa fase responsiva à luz o fenótipo dos cotilédones é irreversivelmente determinado dependendo da luz do ambiente. O padrão de “manchas brancas” e a localização da PTOX nos cloroplastos também indicam que a PTOX é ativa em folhas. Isso foi confirmado através de experimento com promotores da PTOX e o gene repórter GUS. Esses experimentos, além disso, têm revelado que a expressão da PTOX não parece restrita à tecidos verdes, parece sim, ubiqüitária em tecidos e órgãos de *Arabidopsis* durante todo o desenvolvimento (Aluru et al.

2001). Tais experimentos têm seus resultados confirmados utilizando-se outras técnicas, como análises de Northern Blot usando-se RNA de vários tecidos. A acumulação de altos níveis dos transcritos da PTOX nos tecidos concomitantemente com o acúmulo de fitoeno, corrobora com a idéia de que a PTOX está envolvida na biossíntese de carotenóides. Evidências posteriores mostraram que os níveis de transcritos em frutos de tomate e de pimentão foram aumentados durante a maturação (Josse et al. 2000). Entretanto, essa expressão ubiqüitária da PTOX levantou a questão de qual seria sua função em tecidos não verdes, especialmente raízes que não acumulam quantidades apreciáveis de carotenóides (Aluru & Rodermel, 2004).

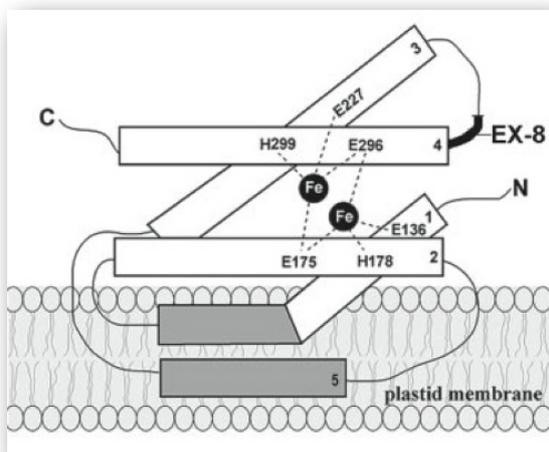


Figura 9: Estrutura em detalhe da PTOX. A PTOX é proposta como sendo uma proteína da interface da membrana com um centro de ligação de dois átomos de ferro composto por dois motivos EXXH nas hélices-2 e -4, e dois resíduos de Glu na hélice-1 e -3. A inserção do exon 8 é indicado pela linha em negrito (Fu et al., 2005).

adição às quatro alfa-hélices envolvidas no sítio ativo, a AOX e a PTOX têm uma quinta hélice menor. Essa hélice e parte da hélice-1 são tidas como embebidas na membrana mas não atravessando-a. Ambas são proteínas que estão na interface da membrana (Figura 8) (Fu et al., 2005).

Josse et al. 2003, clonaram a PTOX de *Arabidopsis* em *E. coli*, tendo assim a expressão heteróloga dessa proteína. Experimentos realizados com membranas isoladas confirmaram que a PTOX funciona como um acceptor terminal de elétrons oriundos da NADH desidrogenase bacteriana, através do “pool” de

A comparação de seqüências, revelou que a AOX e a PTOX são proteínas di-ferro não-heme carboxiladas. Estudos também comparativos relacionados com a estrutura cristalina de proteínas da mesma classe em bactérias indicaram que o centro de ligação dos átomos de ferro na PTOX estão coordenados com quatro resíduos carboxilados e dois resíduos de histidina nas quatro hélices (Figura 9). O modelo proposto foi confirmado através de espectroscopia EPR, bem como através de mutagênese em cinco dos seis ligantes propostos para o ferro usando-se o modelo procariótico para avaliar sua função. Em

quinonas. Confirmou-se também a preferência da PTOX por plastoquinona, sendo ela incapaz de oxidar outras quinonas como a vitamina K e o ubiquinol. No mesmo experimento testou-se também a inibição da atividade da PTOX através da utilização de análogos de quinonas como: propilgalol, ácido gálico, n-propil-galato e n-octil-galato. Esse último revelou-se como o mais eficiente sendo a dose requerida para inibir 50% da reação apenas $0,4 \mu\text{M}$. Convém salientar, que o propil-galato, inibidor de alta afinidade da AOX, também inibiu a PTOX que, no entanto, requer concentração mais elevada ($100 \mu\text{M}$) para inibir 50% de sua atividade.

1.3.5 Biossíntese de Carotenóides

Os carotenóides são moléculas de cadeia longa e insaturada, derivados diretamente do fitoeno, passando por vários passos de desidrogenação sendo os dois primeiros dependentes de moléculas de plastoquinol (plastoquinona reduzida). A PTOX atua como cofator importante na biossíntese dos carotenóides, embora ainda não esteja completamente elucidada tal função.

Os carotenóides representam um grupo de mais de 750 estruturas e são encontrados em bactérias, fungos, algas e plantas. Nas plantas superiores, estes pigmentos têm numerosas funções dentre as quais se pode ressaltar seu papel como pigmento acessório, no aparelho fotossintético, participando do processo de coleta de luz bem como do processo de fotoproteção (Figura 10)(Niyogi, 2000; Li et al., 2008).

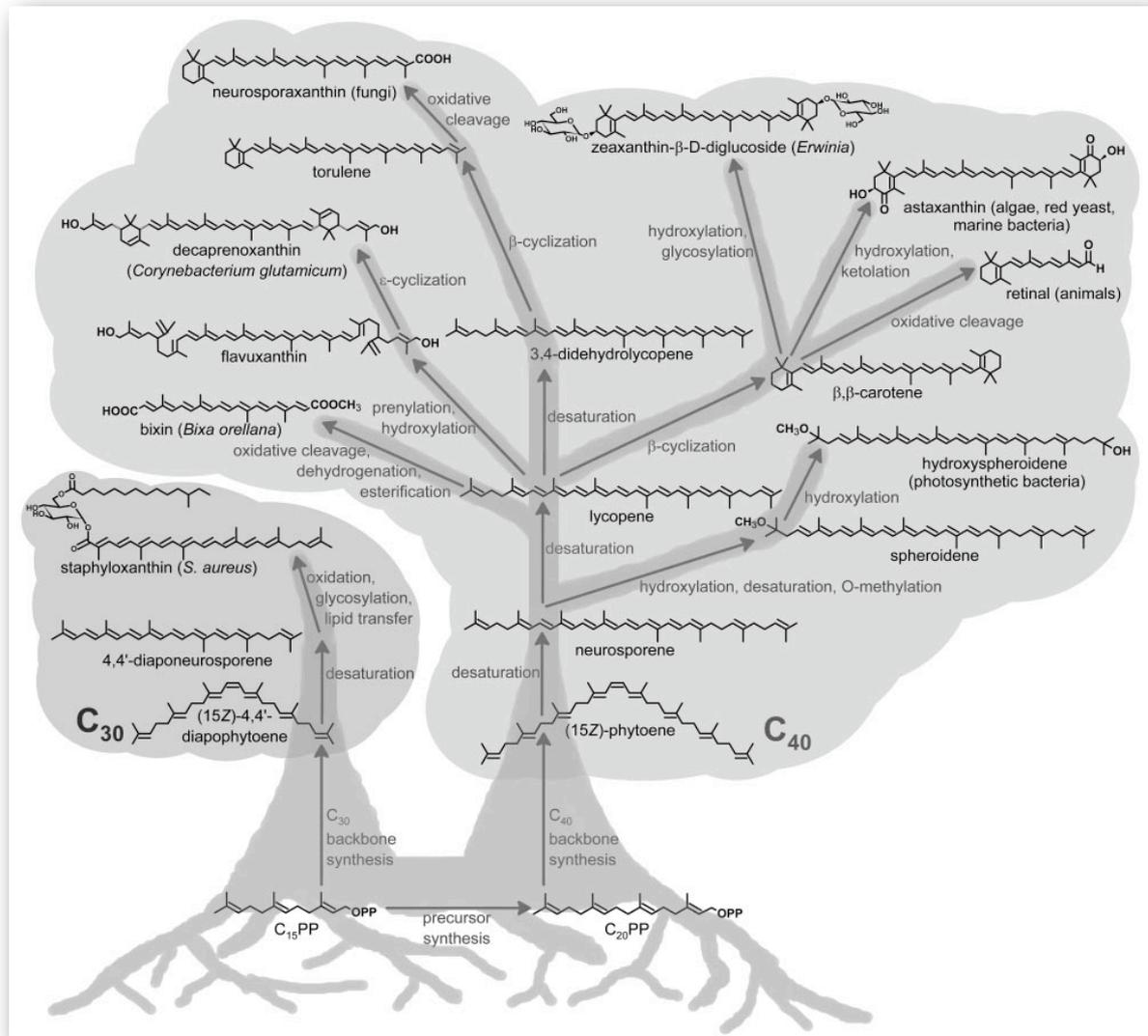


Figura 10: O caminho de biossíntese natural dos carotenóides pode ser organizado numa hierarquia tipo árvore. A biossíntese de todos os carotenóides naturais começa pela formação de cadeias com 30 ou 40 carbonos. Essas estruturas são então saturadas, ciclicizadas, oxidadas e modificadas por várias ações enzimáticas subsequentes. Está mostrada na figura muitas das transformações comuns. Carotenóides comuns formados no começo da cadeia, como licopeno, são modificados em diferentes organismos dependendo da enzima presente. As múltiplas rotas originam-se de intermediários comuns a vários produtos finais resultando em caminhos com muitas ramificações (Umeno et al., 2005).

As etapas sucessivas das reações biossintéticas dos carotenóides em plantas e cianobactérias são semelhantes nos seus primeiros estágios. Sabe-se que as cianobactérias são o progenitor ancestral do plastídeo (McFadden, 2001). As reações no cloroplasto, que vão desde a formação do precursor dos isoprenóides o isopentenildifosfato (unidade de 5 carbonos) e do dimetialil difosfato até o intermediário de 40 carbonos, denominado licopeno (molécula linear), são

catalisados por enzimas semelhantes àquelas encontradas nas bactérias (Sandmann, 2002;).

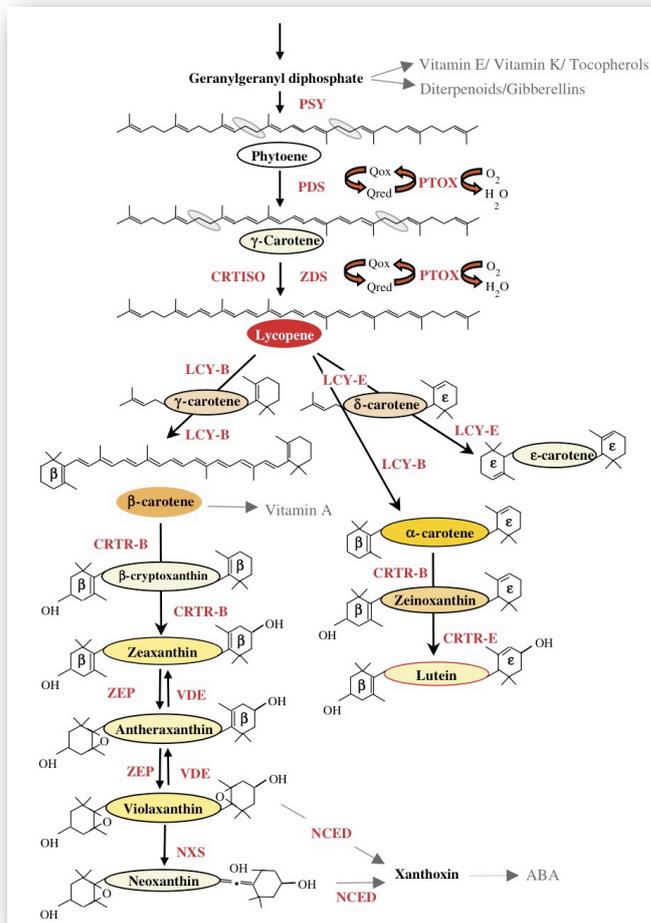


Figura 11: Visão geral da biossíntese de carotenóides nos plastídeos. PSY, sintase do fitoeno; PDS, desaturase do fitoeno; ZDS, desaturase do ζ-caroteno; PTOX, oxidase terminal da plastoquinona; CRTISO, isomerase do carotenóide; LCY-B, β-ciclase do licopeno; LCY-E, ε-ciclase do licopeno; CRTR-B, hidroxilase do β-caroteno; CRTR-E, hidroxilase do ε-caroteno; ZEP, epoxidase da zeaxantina; VDE, de-epoxidase da violoxantina; NXS, sintase da neoxantina; NCED, dioxigenase do 9-*cis*-epoxicarotenóide. (Simkin et al, 2007).

O primeiro passo da via de produção dos carotenóides nos plastídeos regula a velocidade das reações seguintes e é mediado pela enzima sintase do fitoeno (PSY) a qual é codificada no genoma nuclear (Li et al., 2007). A sintase do fitoeno catalisa a reação de formação do 15-*cis*-fitoeno tendo duas moléculas de geranylgeranyl pirofosfato como precursoras. Já está devidamente esclarecido que a sintase do fitoeno regula o fluxo das reações de síntese dos carotenóides e grande parte da regulação é transcricional. Na família das gramíneas, que inclui o milho (*Zea mays*), o sorgo (*Sorghum bicolor*), e o arroz (*Oryza sativa*), foram encontrados três genes parálogos para os genes da sintase do fitoeno (Figura 11)(Gallagher et al., 2004; Li et al., 2008).

A função fotoprotetora dos carotenóides para os fotossistemas é tão crítica que um bloqueio na sua biossíntese, induzida por uma mutação, como na

mutação “*Ghost*” do tomate (Josse et al, 2000) ou induzida por herbicidas como norfluazon (Simkin et al, 2000) resulta em despigmentação severa causada pela luz (Sandmann & Böger, 1989, Simkin et al, 2007).

A tolerância a estresses de altas temperaturas e à luz é mediada pelos carotenóides, que são substâncias antioxidantes, protegendo as membranas celulares da peroxidação lipídica (Davison, 2002; Havaux et al., 2007; Johnson et al, 2007). Eles também são precursores de outros produtos como o apocarotenóide o ácido abscísico (ABA), que regula o crescimento, o desenvolvimento do embrião, a dormência e as respostas à estresses (Nambara & Marion-Poll, 2005), assim como outros apocarotenóides como a estrigolactona. Apesar desse apocarotenóide não ter papel específico na sinalização interna e externa das plantas, revela-se como essencial para a produtividade das mesmas (Booker et al., 2004 & Akiyama & Hayashi, 2006).

Presentes na dieta humana os carotenóides contribuem para o alcance de condições adequadas para uma boa saúde. Como exemplo pode-se citar o β -caroteno, que é um precursor da vitamina A (Fraser & Bramley, 2004). Contudo, os mecanismos de indução e de regulação de sua síntese são complexos e não estão claramente compreendidos, sobretudo nas plantas de valor agrônomo como as da família Poaceae (família das gramíneas, como o milho).

1.3.6 Controle da Expressão Gênica de proteínas plastidiais

Muito pouco é sabido sobre os possíveis mecanismos de regulação da síntese de diferentes proteínas codificadas pelo núcleo que participam da clororespiração e da cadeia de transporte de elétrons ao redor do PSI. Um possível mecanismo de regulação traducional ou pós-traducional tem sido proposto para o aumento da PTOX em plastídeos mutantes sem o PSII (Baena-Gonzalez et al. 2001).

1.4 Estresses Abióticos e Metabolismo Energético

O declínio da produção agrícola de distintas culturas pode estar associado a estresses abióticos, relacionados com temperaturas elevadas, secas e aumento da salinidade do solo (IBGE, 2003).

A variação da intensidade luminosa bem como outros fatores como frio, seca, salinidade e deficiência de nutrientes que limitam a fixação de CO₂ podem favorecer a absorção de mais energia luminosa gerando danos induzidos pela própria luz. Assim, as plantas desenvolveram numerosos mecanismos fotoprotetores como moléculas antioxidantes e enzimas dentre outros (Niyogi, 2000).

Já é largamente sabido que vários tipos de estresses, entre eles os abióticos como a seca, a salinidade e a luminosidade, promovem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). As espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto, o superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxil (OH⁻), são continuamente gerados como subprodutos da fotossíntese através da transferência de energia ou componentes transportadores de elétrons reduzidos associados com o PSI ou o PSII, e reações ligadas ao caminho fotorrespiratório nos cloroplastos (Mittler, 2002). As ROS, potencialmente, podem reagir com a maioria das macromoléculas como DNA, lipídeo e proteínas resultando em dano celular (Asada, 1999 & Li et al., 2008).

Já se sabe também da importância das membranas celulares como sítios primários de injúrias causadas por estresse hídrico/salino/oxidativo e das proteínas transportadores de íons, sobretudo as das membranas plasmática e vacuolar (tonoplasto), que exercem papéis importantes na homeostase, na nutrição e na osmorregulação celular (Hasegawa et al, 2000; Serrano & Rodriguez-Navarro, 2000). Contudo, as atividades das bombas membranares de prótons, envolvidas no influxo de íons para o citoplasma e para o vacúolo, são reguladas pela disponibilidade de energia na forma de ATP. Assim, o entendimento do metabolismo energético é de fundamental importância na compreensão do ajustamento das plantas à condições adversas e o cloroplasto revela-se como uma organela alvo.

1.4.1 Estresse Osmótico

A seca é um dos mais importantes fatores ambientais que limitam o crescimento e o desenvolvimento das plantas e conseqüentemente a sua produção. As plantas podem responder e adaptar-se ao estresse hídrico alterando seu metabolismo celular e invocando vários mecanismos de defesa (Bohnert & Jensen, 1996). A sobrevivência sob condições de estresse depende da habilidade da planta de perceber o estímulo, gerar e transmitir os sinais iniciando várias mudanças químicas e fisiológicas. (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Jiang & Zhang, 2002).

Para responder ao estresse causado pela seca as plantas têm desenvolvido a capacidade de sinalização rápida da percepção do estresse disparando o acúmulo de grande número de mRNA recém sintetizados e polipeptídeos (Ingram & Bartel, 1996; Urao et al., 1999; Urao et al., 2000). A rápida reorganização do genoma diante de situações de estresse ambiental tem sido claramente documentada e a expressão de numerosos genes em resposta à seca também tem sido descrito (Caruso et al., 2007).

1.5 A Bioinformática

A Bioinformática é uma ciência interdisciplinar que está na interface entre a Biologia e a Ciência Computacional. Uma das metas da bioinformática é decodificar a informação contida nos bancos de dados e sugerir um novo ponto de vista para o que já foi estudado em Bioquímica, Biologia Molecular e Genética. Ela é a aplicação da tecnologia computacional no gerenciamento e análises de dados biológicos.

Um superbanco de dados foi criado pela associação do EMBL (European Molecular Biology Laboratory), do DDBJ (DNA Data Bank of Japan) e do GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Juntos eles trocam informações diariamente e formam um banco de dados compreensivo que tem acesso público a seqüências de mais de 205.000 espécies (Benson et al., 2006). Durante os últimos anos, o banco de dados tem duplicado de tamanho a cada 18 meses e, atualmente, conta com mais de 51 bilhões de bases nucleotídicas. Além de

agregarem outros serviços como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), bancos de EST (Expressed Sequenced Tags), bancos de seqüências genômicas e de ferramentas para varredura de genomas lá depositados (Benson et al., 2006)

Outra ferramenta bastante importante em análises de bioinformática, foi desenvolvida há algum tempo e sofre atualizações constantes, é o ClustalW. Ele é o método mais utilizado para alinhar e comparar seqüências de aminoácidos ou nucleotídeos. Usando métodos estatísticos ele agrupa as seqüências mais próximas. Há outros métodos para alinhamentos que também permitem ao usuário editar e modificar manualmente os resultados (Thompson et al., 1997 & Larkin et al., 2007).

Ao longo dos anos, outras ferramentas e bancos de dados mais específicos têm sido desenvolvidos para preencher lacunas deixadas pelas grandes ferramentas. Um exemplo disso é o banco de dados de elementos cis de plantas ("PlantCARE") que tem um vasto banco de dados e pode identificar seqüências de elementos cis de plantas em regiões promotoras de genes auxiliando no desenvolvimento de estratégias de pesquisa mais específicas (Lescot et al, 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar a proteína desacopladora de cloroplastos (PTOX) de *Zea mays* e sua participação nos mecanismos de defesa da planta ao estresse osmótico.

2.2 Objetivos Específicos

Caracterizar os genes da PTOX de *Zea mays*;

Analisar e caracterizar os promotores dos genes da PTOX de *Zea mays*;

Isolar cloroplastos e tilacóides de *Zea mays*;

Caracterizar a atividade da PTOX em tilacóides de *Zea mays* em condições controle e de estresse osmótico através de ensaios polarográficos;

Identificar a atividade da NDH em tilacóides de *Zea mays*;

Analisar semi-quantitativamente a expressão dos genes da PTOX de *Zea mays* sob condições controle e de estresse osmótico por RT-PCR;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Sementes de milho (*Zea mays*) foram fornecidas pelo banco de sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

3.2 Semeadura e Condições de Cultivo

As sementes foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante 5 minutos. Após várias lavagens, as sementes foram embebidas com água destilada durante 2 horas e semeadas em folhas umedecidas de papel de filtro acondicionados em depósitos contendo solução nutritiva de Hoagland contendo: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1,44 g/L, KNO_3 0,25 g/L, KH_2PO_4 0,25 g/L e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,246 g/L com micro nutrientes (FeEDTA 65,7 mg/L, H_3BO_3 2,86 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,84 mg/L, $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Mo} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,286 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,22 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,079 mg/L e $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0476 mg/L) diluída para 50%, durante 7 dias a 25°C no escuro. Em seguida, as plântulas foram transferidas para um sistema de hidroponia contendo solução nutritiva de Hoagland a 100% e transportadas para a casa de vegetação

3.3 Aplicação do Estresse Osmótico

Aos 14 dia da semeadura, as plântulas foram divididas em 3 grupos. Um grupo que transferido para uma nova solução nutritiva Hoagland a 100% (Controle) e os outros dois grupos restantes foram submetidos a estresse osmótico através de transplante para solução nutritiva de Hoagland a 100% com Polietilenoglicol 6000 em duas concentração de 50 g/L e 100 g/L.

As amostras foram coletadas após 6 horas de estresse, para o isolamento do RNA total. Após 48 horas, foram coletadas folhas para extração de cloroplastos e verificação das atividades da NDH e da PTOX.

3.4 Isolamento de Cloroplastos

O isolamento de cloroplastos foi feito através de centrifugações diferenciais segundo o método descrito por Casazza et al, 2001. Primeiramente, as folhas das plantas de milho foram destacadas do caule com um bisturi e colocadas em gelo e no escuro por 30 min. Em seguida, foram trituradas em um liquidificador, com três pulsos, a velocidade máxima, em meio de homogeneização composto por sorbitol 0,4 M, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, NaHCO₃ 10 mM, Tricina/NaOH 20 mM (pH 8,4), BSA 0,5%, ácido L-ascórbico 0,88 mg/mL e glutatona reduzida 3 mM, sendo os três últimos adicionados no momento da preparação.

O homogenato foi centrifugado a 2600 ×g por 3 min a 4°C, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspense em um tampão constituído de: sorbitol 0,3 M, EDTA 2,5 mM, MgCl₂ 5 mM, NaHCO₃ 10 mM, HEPES 20 mM (pH 7,6) e BSA 0,5%. O material ressuspense foi centrifugado a 2600 ×g por 3 min a 4°C sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspense em um tampão hipotônico que continha EDTA 2,5 mM, MgCl₂ 5m M, NaHCO₃ 10 mM, HEPES 20 mM e BSA 0,5%. Após centrifugação do homogenato a 2600 ×g por 3 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e seguiu-se outra lavagem com tampão de ressuspensão. Após esses procedimentos os cloroplastos estavam prontos para serem usados para medidas no oxígrafo ou em outros protocolos que se seguem.

3.5 Dosagem de Clorofila

A dosagem de clorofila foi realizada de acordo com o método descrito em Whatley et al. (1963). Após o isolamento dos cloroplastos, uma alíquota de 25µL foi diluída em acetona 80% sob vigorosa agitação. A amostra foi filtrada em papel de filtro e usada para leitura em espectrofotômetro a 652nm. A concentração de clorofila foi dada pela seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de Clorofila } \mu\text{g}/\mu\text{L} = 5,6 \times \text{Abs}_{652}$$

3.6 Medidas polarográficas

O transporte fotossintético de elétrons foi determinado medindo-se a produção ou consumo de oxigênio com um eletrodo do tipo Clark conectado a um oxígrafo YSI 5300 acoplado a um computador. Foi registrado a concentração de oxigênio dissolvido no meio de reação em função do tempo. A câmara de reação (1,9 mL) teve sua temperatura estabilizada a 25 °C e o meio de reação foi mantido sob agitação contínua através de um agitador magnético. O meio de reação era constituído por sorbitol 0,1 M, MgCl₂ 5 mM, NaCl 10 mM, KCl 20 mM, Tricina 30 mM (pH 8,0) e BSA 0,5 %. A concentração de oxigênio dissolvido em equilíbrio com o ar a 25 °C foi de 230 µmol/mL.

Reação de Hill

O transporte fotossintético de elétrons entre a água e o Fe(CN)₆⁻³ foi determinado medindo-se a produção de oxigênio como detalhado anteriormente adicionando-se ao meio de reação 2 mM de ADP, 2 mM de Pi, 1,5 mM Fe(CN)₆⁻³ e tilacóides correspondentes a 80 µg de clorofila em volume final de 1,9mL.

Fotorredução do Metil Viologênio

O transporte fotossintético de elétrons entre a água e o metil viologênio foi determinado medindo-se o consumo de oxigênio como detalhado acima adicionando-se ao meio de reação 100 µM de metil viologênio, 500 µM de azida sódica e tilacóides correspondentes a 80 µg de clorofila em volume final de 1,9 mL.

3.7 Determinação de Proteínas

A determinação de proteínas foi realizada após a precipitação dos cloroplastos isolados, seguindo o método de Ausbel et al. (1999). Este método consistiu em precipitar as proteínas com ácido tricloroacético na concentração de 72% e DOC 0,15% seguindo-se de centrifugação a 3000 ×g durante 15 min. As proteínas precipitadas foram ressuspensas em água milli-Q e seguiu-se o protocolo de dosagem de proteínas pelo reagente do Folin-Ciocalteu com absorbância medida em 750nm. Foi usado como padrão para a determinação de proteínas a

albumina sérica bovina (BSA) que também foi submetida a precipitação e ressuspensão como as amostras de tilacóides.

3.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Nativo e Atividade da NADH Desidrogenase

As proteínas foram separadas por PAGE nativa, em ausência de qualquer agente redutor, utilizando-se gel de separação na concentração de 7% e gel de concentração a 3% de acordo com o método de Laemmli (1970). Foram aplicadas amostras contendo 50µg de proteínas de tilacóides em cada poço da eletroforese que foi levada a cabo numa corrente de 20 mA por duas horas. Após a corrida, os géis foram colocados em recipientes para revelação e incubados por 30 minutos à temperatura de 37 °C com tampão contendo NADH 1 mM, NBT 0,5 mg/mL, EDTA 0,5mM, Triton-X 100 0,1% e Tris-HCl 200 mM pH 7,5 (Quiles et al., 1996)

3.9 Extração de RNA Total

A extração de RNA total de diferentes tecidos de milho foi feita usando-se o “PureLink™ Plant RNA” da Invitrogen, de acordo com as recomendações do fabricante. Os RNAs foram submetidos à digestão com DNase para minimizar a contaminação por DNA, reduzindo problemas na reação de transcrição reversa.

3.10 Quantificação e Pureza do RNA Total

O RNA total de diferentes tecidos vegetais foi quantificado através de leitura espectrofotométrica a 260nm ($D.O_{260} = 1,00$ corresponde a uma concentração de 40 µg/mL de RNA total). A qualidade (grau de pureza) do RNA total foi avaliada por meio da relação $D.O_{260}/D.O_{280}$ e do grau de degradação do mesmo através de eletroforese em gel de agarose 1,5 %.

3.11 Expressão dos Genes da PTOX

A expressão dos genes foi analisada através de RT-PCR (transcrição reversa e amplificação do cDNA através de reação em cadeia da DNA polimerase) usando iniciadores específicos para cada gene. As reações de RT-PCR foram realizadas a partir de 1µg de RNA total usando-se a transcriptase reversa “ImProm-II™ Reverse Transcription System” da Promega de acordo com as recomendações do fabricante e com iniciadores oligo-dT₁₈. Os cDNAs de fita simples foram então submetidos a ciclos sucessivos de PCR em condições não saturantes com iniciadores específicos para cada gene da PTOX obtidos a partir das seqüências depositadas no banco de genes (*ptox1* AC190835.2 e *ptox2* AC177827.1)

3.12 Análises de Bioinformática dos genes da PTOX

BLAST

Com o uso da ferramenta do NCBI “Basic Local Alignment Search Tool”, ferramenta de alinhamento básico local (BLAST), que faz uso de algoritmos e matrizes matemáticas para pesquisar e alinhar similaridades entre seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, foram feitas buscas sucessivas no banco de genes.

Usando-se o gene da PTOX anotado de *Arabidopsis thaliana* foram levadas a cabo sucessivas pesquisas em banco de dados específicos de plantas à procura de seqüências similares para milho, já que o genoma do milho encontra-se em fase de finalização.

ClustalW2

ClustalW2 é um programa geral com vários propósitos que alinha múltiplas seqüências divergentes levando a resultados com significância biológica. Este programa encontra-se disponível para uso on line e é capaz de calcular o melhor alinhamento, a identidade, e as similaridades e as diferenças entre seqüências de DNA ou proteínas e está na versão 2 (Larkin et al., 2007). Esta ferramenta foi usada para todos os alinhamentos desenvolvidos e os cálculos de similaridade entre os genes da PTOX de milho, extremidades 5' e 3' não traduzidas e seqüências de proteínas.

Relações filogenéticas

Com base nos resultados obtidos através do alinhamento de 23 seqüências da proteína PTOX de plantas pelo algoritmo do ClustalW2, entre elas sorgo e arroz, espécies filogeneticamente próximas ao milho, foram levadas a cabo análises de filogenia usando-se o programa MEGA 4.

Foi usado o programa MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) através do método estatístico de “Bootstrap”, um teste comum usado em análises filogenéticas, para estimar os ramos de uma árvore, tendo como padrão o algoritmo de “Neighbour-joining”, baseado nas seqüências de proteína ou de DNA e conhecimento das distâncias entre os taxa, possibilitando o desenho de árvores evolutivas (Kumar et al., 2008).

Análise da região promotora

As regiões promotoras dos dois genes foram determinadas como sendo até 1000pb anteriores ao sítio de início da transcrição. Delimitada as regiões, ambas foram submetidas a busca de seqüências de elementos cis similares já anotados em bancos de dados. Usou-se a ferramenta on line “PlantCARE” (Plant Cis Acting Regulatory Elements) (Lescot et al, 2002) no endereço: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>. Esta ferramenta detém um vasto banco de dados de elementos cis de regiões promotoras que regulam a expressão dos genes de plantas.

4 RESULTADOS

4.1 Análise dos genes da PTOX do milho por Bioinformática

Usando o gene da PTOX de *Arabidopsis thaliana* como referência, foram feitas pesquisas sucessivas no banco de genes do NCBI, através do uso da ferramenta BLAST, em busca do gene da PTOX de milho. Para a espécie *Zea mays* foram encontrados dois genes que se localizavam em regiões não anotadas do cromossomo II. Os cDNAs deduzidos através de alinhamentos com seqüências de cDNAs de outras espécies mostraram dois genes com tamanhos de 1381pb e 1311 pb que foram chamados de PTOX1 e PTOX2 respectivamente.

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 Ptox1	1381	2 Ptox2	1311	74

Figura 12: Alinhamento das seqüências dos genes PTOX1 e PTOX 2 usando a ferramenta da web para bioinformática ClustalW do European Bioinformatics Institute do European Molecular Biology Laboratory

Os genes *ptox1* e *ptox2* foram alinhados através do programa ClustalW no site: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> e constatou-se 74% de identidade entres eles, como está mostrado na figura 12.

A figura 13 mostra o alinhamento de seqüências correspondentes à região 5' não traduzida (5'-UTR) também através do programa ClustalW. Nessa figura está indicado o códon de iniciação da tradução o qual está sombreado com cor vermelha. A região correspondente à extremidade 5' não traduzida está sombreada em azul e o grau de identidade entre os dois genes nessa região foi baixo revelando apenas 24% de homologia.

O alinhamento das sequencias correspondentes à região 3' não traduzida (3'-UTR) está mostrado na figura 14. O códon de terminação da tradução está sombreado em cor de rosa e a região 3' não traduzida em verde. Através das

mesmas ferramentas de bioinformática (ClustalW) foi estimado o grau de identidade entre essas regiões dos genes *ptox1* e *ptox2* não traduzidas que foi de 60%.

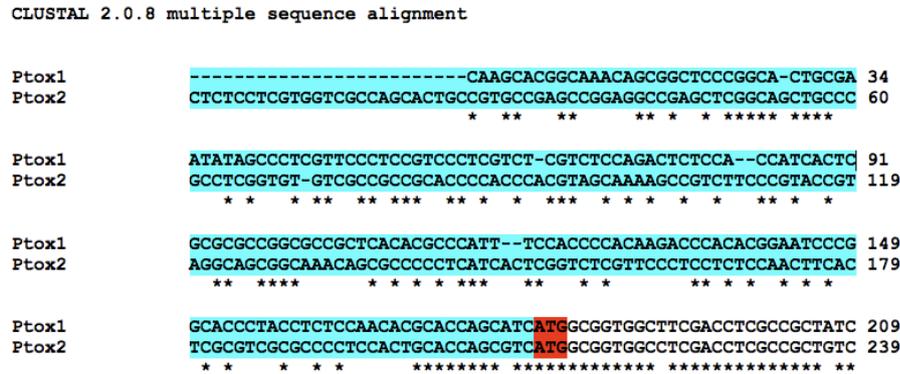


Figura 13: Alinhamento da região 5' não traduzida (5'-UTR) dos genes da PTOX através do programa ClustalW do European Bioinformatics Institute do European Molecular Biology Laboratory



Figura 14: Alinhamento da região 3' não traduzida (3'-UTR) dos genes da PTOX através do programa ClustalW do European Bioinformatics Institute do European Molecular Biology Laboratory

A figura 15 mostra o alinhamento das seqüências das pré-proteínas deduzidas através dos cDNAs já deduzidos também através de alinhamentos de cDNAs de outras espécies. Tal recurso da bioinformática revela que a PTOX1 tem 341 resíduos de aminoácidos e a PTOX2 339. O grau de identidade estimado entre as mesmas através de seus alinhamentos foi de 79%

```

CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment

Ptox1maize      MAVASTSPLS---ATAPSPAPVSGFLALPARRGCATRLGSAAAWRRRLRVEAIWKQEQ 57
Ptox2maize      MAVASTSPLSAKPATAPSPAPGSGLLALGVRRAPAT-----AAWRRRLRVEAIR---TQ 51
*****          *****  **.*. **          *****          *

Ptox1maize      RAEVSVVEEPAPVR--EAAAPLDG--VGADDPMPVPSDESQVNIQSVNIFLTVSII 113
Ptox2maize      RTEVPVEESAPARDAAPLDGNGAGADGSVPSDDSWVVKLEQSFNIFATDSVIMVL 111
*.*.*.*.*.*.*  *****  .**..*****:*****:*****.*:****:*

Ptox1maize      NTVYRDRNYARFFVLETIARVPYFAFISVLHMYETFGWWRADYLVKVFHQSLNEFHLL 173
Ptox2maize      KGVYGDYRFFALETIARVPYFAFISVLHLYATFGWWRADYLVKVFHQSWNEFHLL 171
: ** * * *****.*****:*****.* *****:***** *****

Ptox1maize      IMEELGGNAIWIDCLARFMAFFYFMTVAMYLSPRMAYHFSECVERHAYSTYDKFLK 233
Ptox2maize      IMEELGGDSLWFDCLARFMAFFYFMTVAMYLSPRMAYHFSECVERHAYSTYDEFK 231
*****:.*:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Ptox1maize      HEEELKTLPAPEAALNYLNEDLYLDFEQTRIPCSRPKIDNLYDVFVNIRDEAEHC 293
Ptox2maize      HEEELKRLPAPEAALNYMNEDELYLDFEQASRTPGSRPKIDNLYDVFVNIREDEAEHC 291
***** *****:*****:.* * *****:*****

Ptox1maize      KTMKACQTHGTLRSPHSPNCLEAATECVIPENDCEGIVDCVKKSLTK 341
Ptox2maize      KTMKTCQTHGNLRSPHSTPNCLEDDTECVIPENDCEGIVDCVKKSLTK 339
****:*****.***** ***** *****
    
```

Figura 15: Alinhamento das pré-proteínas da PTOX deduzidas através do programa ClustalW.

A figura 16 mostra a estrutura proposta para os genes da *ptox1* e *ptox2*, deduzida através do uso de ferramentas de bioinformática, revelando a presença de nove exons (linhas grossas) e oito introns (linhas finas) para ambos os genes. As regiões 5' não traduzidas (5'-UTR) e 3' não traduzidas (3'-UTR) estão indicadas pelas cores vermelha e azul respectivamente. Os genes têm tamanhos diferentes e a partir da extremidade 5' em direção a extremidade 3' contata-se que o tamanho relativo dos 3 primeiros exons e dos dois primeiros introns são semelhantes. Os três exons seguintes (4, 5 e 6) de tamanhos equivalentes ocupam uma localização voltada para a extremidade 3' terminal gerando um encurtamento do intron da *ptox2* em relação ao da *ptox1* de aproximadamente 25% sem alterar aparentemente o espaçamento das pequenas regiões de introns entre os respectivos exons (4, 5 e 6). O espaçamento entre os exons 7 e 8 em relação ao bloco de exons anterior (4, 5 e 6) na *ptox2* corresponde a aproximadamente 25%, valor do encurtamento do intron, o que permite que os dois exons (7 e 8) ocupem posições equivalentes entre os dois genes. Já o exon 9, adjacente a extremidade 3' não traduzida, em ambos os genes é que apresenta maior diferença no espaçamento dos espaçamento dos respectivos introns sendo aproximadamente duas vezes maior na *ptox2* compara a *ptox1*. Igualmente, através de ferramentas de bioinformática como, iPSORT (Bannai et al., 2002), ChloroP (Emanuelsson et al., 1999), TargetP (Emanuelsson et al., 2000) e Predotar ([Http://www.inra.fr/predotar](http://www.inra.fr/predotar)), foi analisada em ambas proteínas a presença do peptídeo sinal de endereçamento para o cloroplasto. Todos os resultados foram

positivos para as duas proteínas estudadas (PTOX1 e PTOX2) revelando com pelo menos 93% de certeza a existência da sinalização de endereçamento para o cloroplasto nas mesmas.

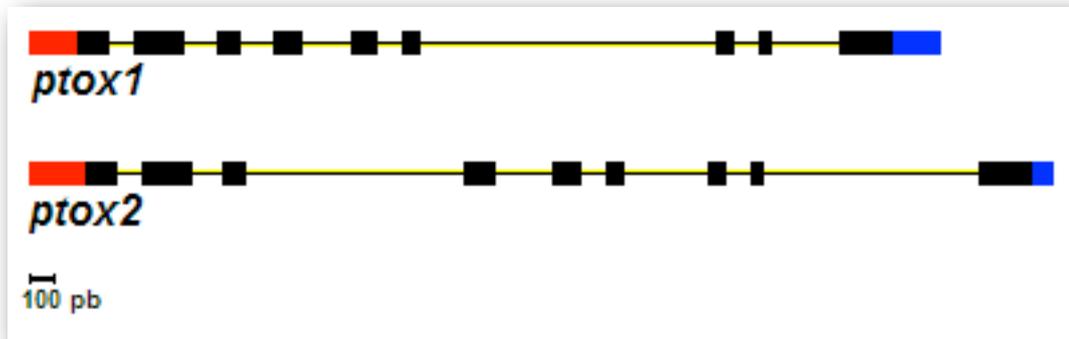


Figura 16: Estrutura de introns e exons dos genes *ptox1* (3461pb) e *ptox2* (3821pb). As regiões 5' e 3' não traduzidas estão indicadas com as cores vermelha e azul respectivamente. Os exons estão representados como linhas grossas e os introns como linhas finas.

4.2 Análise da expressão dos genes da PTOX de milho sob condições de estresse osmótico.

Com base nas seqüências dos cDNAs dos genes completos da *ptox1* e *ptox2*, encontradas nos bancos de dados, foram desenhados “primers” específicos (iniciadores) com tamanhos diferentes para ambos os genes, com introns entres os mesmos, para diferenciar os produtos obtidos por amplificação, a partir de DNA ou mRNA na reação em cadeia da polimerase (PCR) (Figura 17). Essa figura mostra os referidos cDNAs com seus respectivos pares de iniciadores indicado com a cor azul para os da *ptox1* e em cor de rosa para os da *ptox2*. Os fragmentos amplificados pelos iniciadores foram de 598pb e 637pb para *ptox1* e *ptox2*, respectivamente.

```

>PTOX1
ATGGCGGTGGCTTCGACCTCGCCGCTATCCGCCACGGCCCCCTCGCCGCCCGCTCCGGTGTCCGGGTTCCCTCGCTCTCCCGCCCGCCGCGGC
TGCCGAACGCGCCTCGGCTCCGCGCCGCGTGGAGGAGGCTTCGCGTGGAGGCGATCTGGAAGCAGCAGGAGAAAGCAGCGGGCAGAGGTGTCC
GTCGAGGAACCCGCCCCGTCAGGAGGCGCCGCGCCCTGGACGGAGTCGGAGCTGACGACCCATGGTTCTCTCGGACGAGAGCTGG
GTGGTCAGGCTCGAGCAGTCGGTCAACATTTTCCTCACGAATCGGTGATTATACTACTCAATACCGTGTACC GTGATCGGAACTACGCCAGG
TTTTTGTGCTGGAGACGATTGCCAGGGTGCCTGATTTTCGCGTTCATATCGGTGCTTCACATGTATGAAACCTTTGGCTGGTGGAGACGAGCT
GATTATCTAAAAGTTCACCTTTCGCGAGAGCTTGAACGAGTTTCATCATCTCTTGATCATGGAAGAATTGGGTGGCAACGCTATATGGATTGAT
TGTTCCTTGCTCGATTTATGGCGTTTTTTTACTACTTCATGACTGTTGCGATGTACATGTTGAGCCCCAGAAATGGCATATCACTTCTCTGAA
TGTGTGGAGAGACATGCGTACTCCACCTATGATAAGTTCCTCAAGCTCCATGAAGAGGAATTGAAAACACTACCAGCTCCAGAGGCAGCATTG
AACTATTACCTGAATGAGGACCTTACTTATTTGATGAGTTTCAGACAACAAGAATCCATGTTCTAGGAGGCCATAAATAGATAAAGTTGAT
GATGTATTCGTCAATATACGAGATGACGAGGCAGAGCACTGCAAGACAATGAAGGCATGTCAAACACATGGAACTCTTCGGTTCTCCTCACTCA
ATGCCGAACGCTTAGAAGCTGCTACAGAATGTGTAATACCTGAAAACGATTGTGAAGGTATTGTGGACTGTGTCAAAAAGTCCCTTACAAAG
TAA
>PTOX2
ATGGCGGTGGCCTTCGACCTCGCCGCTGTCCGCCAAGCCCGCCACGGCCCCCTTCGCCGCCCGCTCCCGGATCCGGGCTCCTCGCTCTCGCGGTT
CGCCGCGCCCCCGCCACTGCCCGTGGAGGAGGCTCCGCGTGGAGGCGATCAGGACGCAGCGAACGGAGGTGCCCGTCGAGGAGTCCGCCCCC
GCCAGGACGCCGCGCTGCCGCGCCCCGACGAAACGGAGCCGGAGCGGACGGCTCCGTGGTTCTCTCCTCGGACGACAGCTGGGTTGTC
AAGCTCGAGCAGTCGTTCAACATTTTCGCGCACGGATTCCGGTATTATGGTACTCAAGGGCGTGTACGGTGTACGGTACTACGCCAGGTTCTTT
GCGCTGGAGACGATGCGAGGGTGCCTACTTCGCATTATATCGGTGCTTCACTTGTATGCGACCTTTGGATGGTGGAGACGAGCTGATTAC
ATAAAGGTTCACTTTGCGCAGAGCTGGAACGAGTTCCATCACCTCTTGATCATGGAAGAATTGGGTGGCGACTCTTTGTGGTTTACTGTTTT
CTTGCTCGGTTTATGGCATCTTTTACTACTTCATGACTGTTGCAATGTACATGCTGAGCCACGAATGGCATATCACTTTTCCGAATGTGTG
GAGAGACATGCATATTCACCTATGATGAGTTCCTCAAGCTCCATGAAGAGGAATTGAAAAGACTACCAGCTCCAGAGGCAGCATTGAACAT
TACATGAATGAGGACCTTACTTATTCGATGAGTTTCAGGCATCAAGAACTCCAGGTTCTAGGAGGCCATAAATAGATAAAGTTATACGATGTA
TTCGTTAATATACGAGAAGATGAGGCAGAGCACTGCAAGACAATGAAGACCTGTCAAACACATGGAAATCTTCGTTCTCCTCATTCAAACGCCG
AACTGCTTAGAAGATGATACGGAATGTGTAATACCTGAAAACGACTGTGAAGGTATTGTGGACTGTGTCAAAAAGTCCCTTACAAAGTAA
    
```

Figura 17: Seqüências dos cDNAs dos genes completos da PTOX de milho evidenciando a zona de desenho dos iniciadores específicos para cada um deles.

A figura 18 mostra uma eletroforese em gel de agarose para avaliação do grau de integridade e de pureza dos RNAs extraídos de folhas (poços 1, 3 e 5) e de raízes (poços 2, 4 e 6) de milho. As bandas reveladas correspondem às subunidades 25 e 18S do RNA ribossômico, com tamanhos moleculares de aproximadamente 1,6 e 1,2kb respectivamente. As amostras de folhas (1, 3 e 5) revelaram uma banda adicional inferior às bandas 25 e 18S característica de RNA ribossômico de cloroplasto. Todos os RNA extraídos apresentaram elevado grau de pureza e integridade.

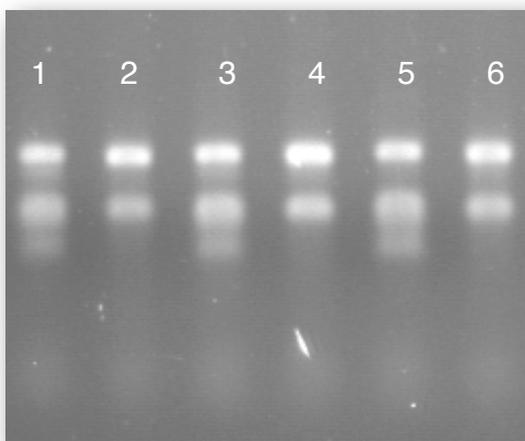


Figura 18: Eletroforese dos RNAs extraídos de folhas (poços 1, 3 e 5) e raízes (poços 2, 4, e 6) de milho. Acima a banda do RNA 25s, abaixo a banda do RNA 16s e nas raias 1, 3, e 5 a banda adicional típica de RNA extraído de folhas.

A figura 19 mostra uma eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados de RT-PCR em raízes de plantas de milho controle e de plantas submetidas a estresse osmótico, com polietilenoglicol 6000, durante seis horas, em duas diferentes concentrações (50g/L e 100g/L) usando “primers” específicos para os genes *ptox1* e *ptox2*. As bandas correspondem aos cDNAs da *ptox1* (poços 1, 2 e 3) e da *ptox2* (poços 5, 6 e 7) e ainda aos marcadores de tamanho molecular (poço 4). A expressão da *ptox1* foi aparentemente a mesma independente da condição testada mas, a da *ptox2* parece induzida quando as plantas foram previamente tratadas com PEG (100 g/L).

A figura 20 mostra a eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados de RT-PCR de folhas de plantas de milho em condições idênticas às da figura 19. As bandas correspondem aos cDNAs da *ptox1* (poços 1, 2 e 3) e da *ptox2* (poços 5, 6 e 7) e ainda aos marcadores de tamanho molecular (poço 4). A expressão da *ptox1* foi aparentemente a mesma independente da condição testada mas, a da *ptox2* parece induzida quando as plantas foram previamente tratadas com PEG 6000 nas duas concentrações. Aparentemente a intensidade das bandas foi proporcional à severidade do estresse aplicado.

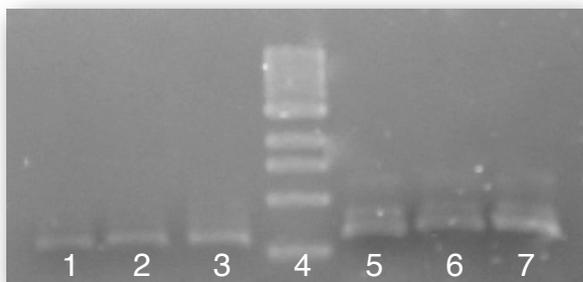


Figura 19: Bandas obtidas através de RT-PCR dos genes *ptox1* (poços 1,2 e 3) e *ptox2* (poços 5,6 e 7) de raízes de milho em condições controle (poços 1 e 5), 50g/L de PEG 6000 (poços 2 e 6) e 100g/L de PEG 6000 (poços 3 e 7).No poço 4 está o marcador de peso molecular.



Figura 20: Bandas obtidas através de RT-PCR dos genes *ptox1* (poços 1,2 e 3) e *ptox2* (poços 5,6 e 7) de folhas de milho em condições controle (raias 1 e 5), 50g/L de PEG 6000 (poços 2 e 6) e 100g/L de PEG 6000 (poços 3 e 7).No poço 4 está o marcador de peso molecular.

4.3 Análise da região dos promotores dos genes *ptox1* e *ptox2*

A avaliação dos promotores dos genes da PTOX foi feita com base em ferramentas de bioinformática em busca de elementos cis, que são reguladores da expressão gênica, bem como a comparação desses elementos entre *ptox1* e *ptox2*.

A região promotora de cada gene foi considerada como sendo até 1000pb antes do sítio de início da transcrição, na direção da extremidade 5'.

A figura 21 mostra a análise das regiões promotoras dos dois genes da PTOX, através do programa "PlantCARE". Tal análise revelou seqüências comuns em ambas regiões promotoras, indicadas dentro de caixas azuis e outras peculiares a cada gene.

Dentre as regiões cis comuns pode-se identificar: ABRE que é um elemento de regulação da expressão pelo ácido abicísico, CAAT-box que é um elemento comum em promotores e o TATA-box que é um elemento central, em torno da região -30 e auxilia a ligação da RNA polimerase. Pode-se identificar ainda elementos cis ligados à expressão induzida por ácido metil-jasmônico como o CGTCA-motif e elementos cis de responsividade à luz como o G-box.

Dentre os elementos específicos de cada gene pode-se identificar o elemento cis MBS, que está presente somente na *ptox2*. Tal elemento está envolvido com a indução da expressão da *ptox2* em resposta à seca através da ligação do MYB.

Os elementos cis comuns indicados na região promotora dos genes da PTOX podem ocorrer em outras espécies de plantas mas, os elementos Unnamed__1 e 3, específicos da *ptox1* e O2-site elemento comum a *ptox1* e a *ptox2* são exclusivos do milho. O elemento O2-site está relacionado com o metabolismo das zeínas.

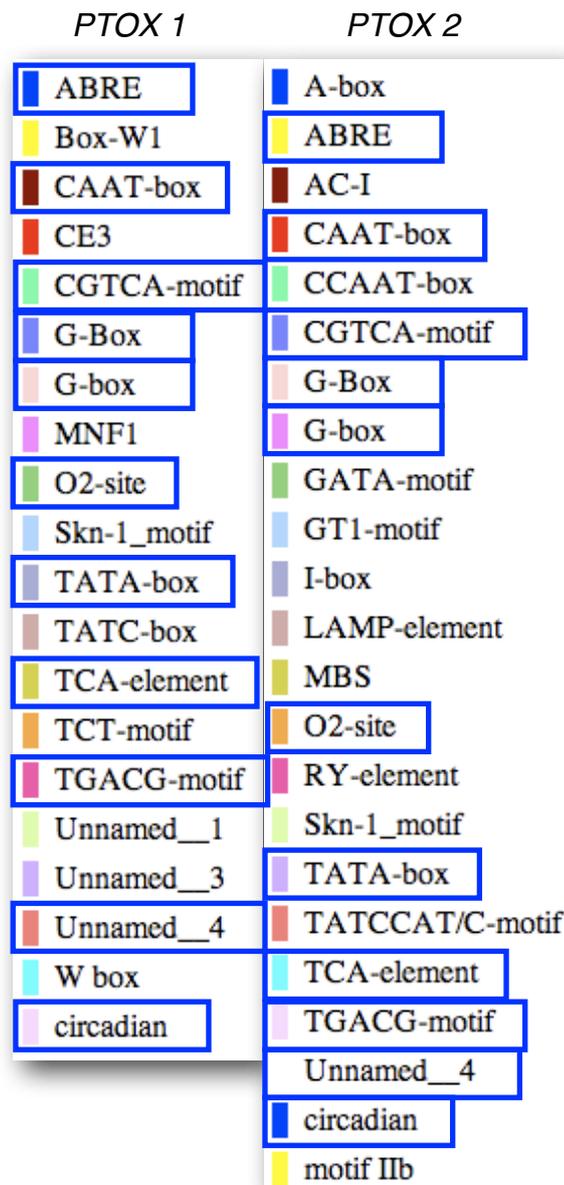


Figura 21: Análise dos promotores realizada através da ferramenta on line para bioinformática PlantCARE, uma base de dados de elementos regulatórios do tipo cis de plantas e ferramentas para análise *in silico* de seqüências de promotores.

4.4 Ensaios polarográficos e detecção da atividade da PTOX em tilacóides isolados de folhas de plantas de milho.

Os tilacóides de folhas de plantas de milho foram isolados e avaliados através de ensaios polarográficos como descrito em material e métodos (itens 3.4 e 3.6)

O funcionamento dos fotossistemas foi avaliado através da utilização de aceptores de elétrons exógenos como ferricianeto de potássio (Figura 22A) e metil viologênio (Paraquat) (Figura 22B). A qualidade da preparação foi estimada através de medidas de liberação ou consumo de O_2 em função das adições de ferricianeto de potássio ou metil vioglogênio em presença de cloreto de amônio ou azida respectivamente (Figuras 22A e B). Na presença de ferricianeto de potássio a atividade dos fotossistemas foi revelada através da liberação de O_2 que foi de $613,5 \text{ nmol } O_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl min}^{-1}$ após incidência de luz. A adição de cloreto de amônio, um desacoplador, induziu aumento da liberação de O_2 o qual alcançou o valor de $1080 \text{ nmol } O_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl min}^{-1}$ (Figura 22A). Assim, faz-se uma estimativa relativa do grau de acoplamento da preparação em função dos valores de O_2 liberado calculado pelas tangentes das retas mostradas no gráfico. O grau de acoplamento é tanto melhor quanto maior o valor de O_2 liberado após a adição do desacoplador (Figura 22A). Já na presença do metil viologênio fez-se uma avaliação do grau de funcionamento dos fotossistemas após adição de luz. O funcionamento dos mesmo gera O_2 que imediatamente é reduzido produzindo peróxido de hidrogênio (espécie reativa de oxigênio) cuja dismutação é inibida pela adição de azida, inibidor da catalase (Figura 22B).

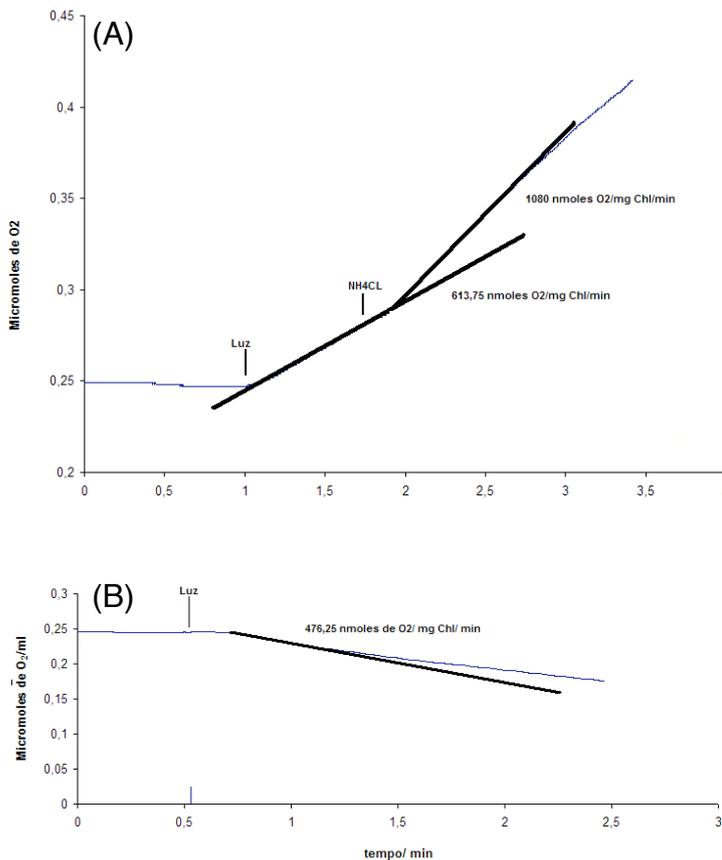


Figura 22: Medidas polarográficas de tilacoides de milho. (A) reação de Hill e (B) Reação de Mehler. A liberação ou consumo de O_2 está expressa em nmoles de $O_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl min}^{-1}$.

Portanto, a padronização da qualidade da fração de tilacóides foi avaliada por distintas medidas polarográficas mostrando que os tilacóides isolados eram de boa qualidade e que a síntese de ATP estava acoplada à cadeia transportadora de elétrons (Figura 22A e B). Apesar da boa qualidade da preparação não foi possível detectar-se a atividade da PTOX.

4.5 Atividade da NADH Desidrogenase em gel nativo de poliacrilamida a partir de tilacóides isolados.

A figura 23 mostra uma eletroforese em gel de poliacrilamida nativo, isto é, em ausência de agente redutor, de amostras de tilacóides, isolados de folhas de plantas controle de milho. A atividade NADH desidrogenásica foi detectada através da oxidação da molécula de NADH pela precipitação do reagente NBT reduzido que se revela através do aparecimento de uma coloração violeta. As bandas correspondentes são características da presença da NDH desidrogenase.

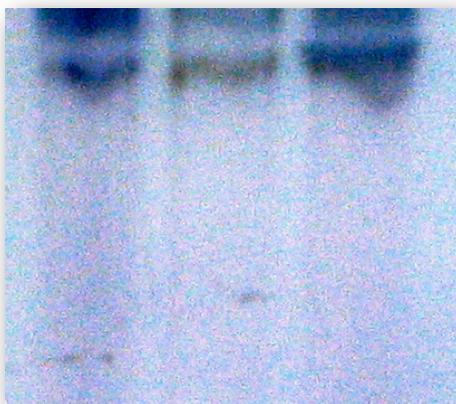


Figura 23: Eletroforese em gel de poliacrilamida nativo mostrando as bandas com atividade de redução do NADH. Foram aplicados $50\mu\text{g}$ de proteínas de tilacóides em todas as três raias.

4.6 Relações filogenéticas dos genes da PTOX

A figura 24 apresenta uma árvore filogenética, contruída através de ferramentas de bioinformática, envolvendo pesquisa exaustiva em banco de genes. Essa árvore identifica os dois grandes grupos de plantas superiores, isto é, dicotiledôneas e monocotiledôneas. Na parte central da árvore identifica-se dois gêneros que estão fora desse dois grandes grupos: Saruma, que pertence a um grupo de angiospermas basais e Pinus, um gênero pertencente às gimnospermas. Tal pesquisa revelou que as dicotiledôneas apresentam um único gene da PTOX com exceção do poplar que apresenta dois. As relações filogenéticas mostram que milho e sorgo pertencentes ao grupo das monocotiledôneas, são espécies muito próximas que compartilham dois genes ortólogos da PTOX identificados como *ptox1* e *ptox2*. A figura destaca essas espécies dentro de círculos de cor vermelha.

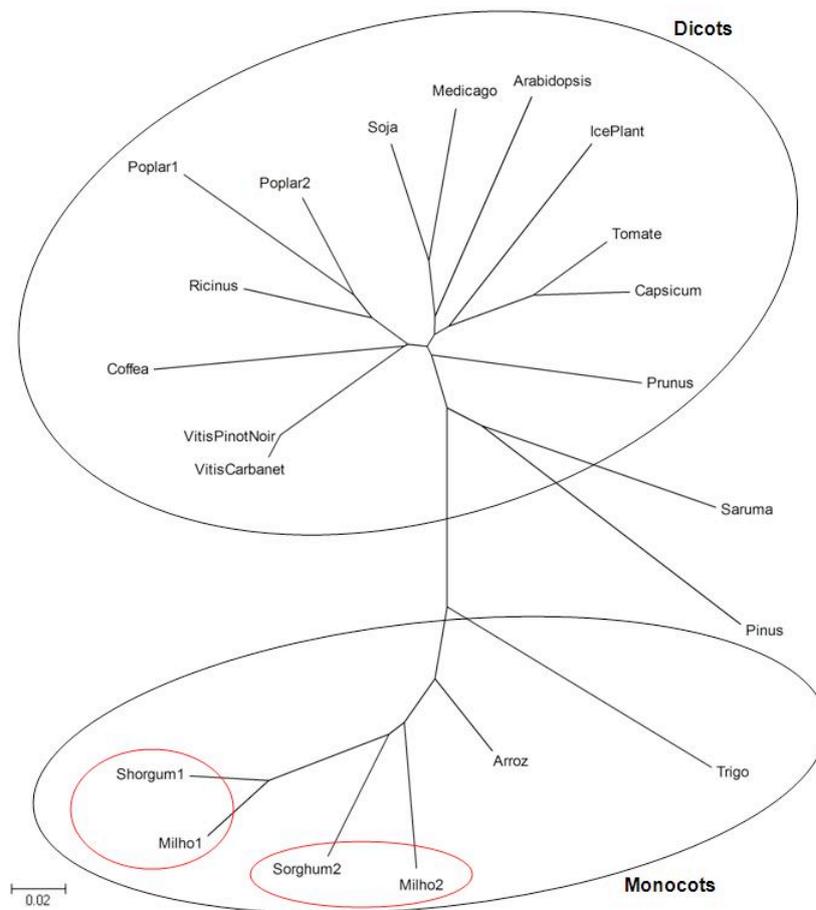


Figura 24: Árvore de relações filogenéticas dos genes da PTOX de diferentes espécies de plantas.

4.7 Padrões de expressão da PTOX no milho

Através do uso das seqüências de cDNAs da PTOX de milho foram feitas pesquisas no banco de genes do NCBI na tentativa de encontrar-se seqüências de cDNA (EST) muito semelhantes, isto é, com grau de homologia superior a 95% que pudesse sugerir um padrão de expressão dessa proteína. Os dados obtidos revelaram que os dois genes da PTOX são expressos em toda a planta através da constatação de bibliotecas de cDNAs de raízes, folhas, meristemas apicais, meristemas de inflorescências, embriões e endosperma de sementes.

5 DISCUSSÃO

A oxidase terminal do plastídeo (PTOX), proteína participante da cadeia transportadora de elétrons da cloro-respiração foi identificada em 1999 por dois distintos grupos de pesquisa (Carol et al, 1999 e Wu et al, 1999). Convém salientar, que até essa data apenas um gene codificante para PTOX estava descrito na literatura (Kuntz, 2004). Os estudos eram restritos a *Arabidopsis*. Considerando dados prévios obtidos através de ferramentas de bioinformática (pesquisa “in silico”) e a ausência de trabalhos científicos que abordassem a pesquisa em questão, na planta do milho, essa espécie foi escolhida como modelo experimental. Tal escolha foi reforçada pelo fato do milho ser uma planta de metabolismo C₄, apresentando assim um mecanismo para minimizar a fotorrespiração, aliada ainda, ao valor socio-econômico crescente dessa cultura em nosso país em busca de maior produção.

Os resultados da pesquisa “in silico” com milho mostraram a existência de dois genes (*ptox1* e *ptox2*) nucleares codificando para a PTOX localizados no cromossomo II. Esses genes têm tamanhos diferentes e apresentam 74% de homologia. As seqüências genômicas encontradas foram então submetidas à pesquisa em banco de dados de expressão para que fosse possível a identificação das diferentes regiões dos genes. Assim, foram identificadas as sequências das regiões 5’ não traduzidas para *ptox1* e *ptox2* os quais foram comparadas e revelaram apenas 24% de homologia (Figura 13). Sabe-se que as proteínas dos plastídeos podem sofrer regulação pós-transcricional como, edição, “splicing” e maturação (Rumeau et al., 2007). Estudos já evidenciaram que a região 5’ não traduzida afeta a expressão de proteínas e a eficiência da tradução de mRNAs endereçados ao cloroplasto (Zou et al., 2003). Igualmente foi demonstrado que a expressão do gene da ubiquitina em plantas de arroz era regulada pela presença de um intron na região 5’ não traduzida (Lu et al., 2008). No tocante à sequência da região 3’ não traduzida também foi constatada baixa homologia (60%) (Figura 14) o que corrobora com a hipótese de que os genes não são alelos. Portanto, nossos resultados indicam uma expressão diferencial e possivelmente uma regulação pós-transcricional em face da baixa homologia entre os dois genes (Figuras 13 e 14).

Por outro lado, quando se compara o alinhamento das seqüências das pré-proteínas PTOX1 (341 resíduos de aminoácidos) e PTOX2 (339 resíduos de

aminoácidos) deduzidas através de cDNAs, encontra-se um grau de identidade relativamente alto entre as duas de 79% (Figura 15). O grau de identidade elevado sugere que as referidas proteínas são homólogas. Essa conclusão é reforçada pela caracterização da estrutura de introns e exons dos genes *ptox1* e *ptox2* (Figura 16). Nessa figura fica demonstrado que a diferença de tamanho e de estrutura gênica reforça a caracterização de dois genes distintos. Essa figura mostra que os dois genes são constituídos por 9 exons separados por 8 introns. Os exons têm aproximadamente tamanhos semelhantes, mas os introns têm tamanhos distintos. Trabalhos recentes sugerem que o tamanho dos genes bem como o tempo de transcrição e não somente os elementos promotores podem ter influência na expressão de genes em plantas (Stenøien, 2007). Já se sabe, que nas plantas, os genes altamente expressos tendem a ter grandes transcritos primários e grandes introns em relação aos genes menos expressos (Stenøien, 2007). No caso dos genes da PTOX constata-se que o da *ptox2* tem um tamanho 10% maior que o da *ptox1* (Figura 16) o que reforça mais ainda a hipótese de uma expressão diferenciada dos genes da oxidase terminal do plastídeo em milho.

Famílias multigênicas já foram descritas para inúmeros genes e em várias espécies. A AOX, uma proteína da mesma classe da PTOX que também encontra-se codificada pelo genoma nuclear, foi descrita há bastante tempo como sendo uma família multigênica. Ela foi mostrada como sendo induzida por estresses ou inibição da cadeia respiratória e várias outras evidências têm sugerido que um sinal da mitocôndria enviado ao núcleo pode induzir a transcrição de genes em situações onde mudanças metabólicas são necessárias (Vanlerberghe and McIntosh, 1997). A sinalização vinda dos plastídeos para ativar genes nucleares também é conhecida (Surpin et al., 2002).

Na figura 17 está indicado o local e a seqüência dos iniciadores usados para estudos de expressão dos genes da PTOX de milho. Os produtos de PCR tinham tamanhos de 598pb e 637pb para *PTOX1* e *PTOX2*, respectivamente. Os dois pares de iniciadores foram construídos em regiões de exons que compreendiam introns para diferenciar os produtos obtidos por amplificação de PCR derivados de mRNA e DNA.

Para os estudo de expressão dos transcritos foram testados dois protocolos de extração de RNA. Apesar de ambos os protocolos terem conduzido a

resultados satisfatórios, foi feita uma escolha com base em minimização de contaminação com DNA. O protocolo selecionado apresentava uma etapa adicional de digestão da amostra com DNase e posterior repurificação. Todos os RNAs extraídos apresentaram elevado grau de pureza e integridade como está mostrado na figura 18.

As quantidades de RNA obtidas foram satisfatórias e uma análise eletroforética revelou elevado grau de pureza e integridades amostras de RNAs extraídas como mostrado na figura 18. obtidos é mostrada na figura 14. Os RNAs não apresentaram degradação aparente e foi dado continuidade ao processo de síntese de cDNA por transcrição reversa para estudos de expressão.

As figuras 19 e 20 mostram uma eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificado de RT-PCR em raízes e folhas de plantas de milho sob condições controle e submetidas a estresse osmótico, respectivamente. A figura 19 da *ptox1* foi aparentemente a mesma independentemente da condição testada, mas a da *ptox2* parece induzida quando as plantas foram previamente tratadas com PEG (100g/L).

A figura 20 revela um padrão de expressão visivelmente aumentado para a *ptox2* em condições de estresse hídrico e é visível também uma correlação com a severidade do mesmo. Esse resultado caracteriza uma expressão diferencial dos genes nos diferentes tecidos e em diferentes intensidades de estresse. A expressão diferencial da PTOX já foi objeto de investigação e Kuntz (2004) relatou dados concernentes à aplicação de distintos estresses como fotooxidativo, salino e tratamentos com ácido abscísico. Contudo, ainda não está elucidado os fatores implicados na regulação diferencial da expressão.

Outros trabalhos nesse mesmo tema mostram que a expressão da PTOX é ubíqua com pouca variação entre os órgãos e tecidos estudados (Aluru et al. 2001; Lennon et al. 2003). Tais dados dão suporte aos resultados encontrados nesse trabalho que mostrou a expressão dos genes *ptox1* e *ptox2* em dois tecidos diferentes da planta de milho e que *ptox2* é expresso diferencialmente em folhas de plantas submetidas a estresse hídrico.

Ainda sobre estresses, em 2007, Rumeau e colaboradores suscitaram uma possível regulação da PTOX quando as plantas estivessem submetidas a estresse osmótico. A PTOX poderia estar diretamente ligada à prevenção da ação

danosa das espécies reativas de oxigênio que seriam geradas sob estresse osmótico severo. Assim a expressão diferencial, de pelo menos, um dos dois genes seria esperada na situação de estresse estudada, o que se confirma com o resultado obtido.

Na figura 21 está mostrado os resultados obtidos quando as seqüências dos promotores de ambos os genes foram submetidas a uma análise, através de recursos de bioinformática, com o uso da ferramenta PlantCARE. Tais dados mostram elementos comuns aos dois genes da PTOX de milho como o CAAT-box e o TATA-box que estão ligados a ativação da expressão de genes. Outros elementos comuns foram o ABRE e o TCA-element, que estão envolvidos na resposta ao ácido abscísico, elementos de resposta a luz e ao ácido metil-jasmônico além de um elemento envolvido no controle circadiano dos genes. Tanto o ácido abscísico como o ácido metil-jasmônico são conhecidos sinalizadores de estresse nas plantas o que sugere uma regulação da expressão dos genes quando esses sinalizadores são liberados.

Interessantemente foi encontrado em ambas regiões promotoras um elemento cis de regulação da expressão desses genes em relação ao metabolismo das zeínas. As zeínas são uma classe bem estudada de proteínas do tipo prolamina de milho que é bastante utilizada na indústria alimentícia (Momany et al., 2005). Além de elementos cis já conhecidos e caracterizados em milho como o Unnamed__1 e 3, específicos da *ptox1*.

Um resultado interessante da análise dos promotores, mostrado também na figura 21, foi a presença de um elemento cis que estaria envolvido na resposta ao estresse provocado pela seca. O elemento cis MBS está envolvido na ligação do MYB. A superfamília do MYB é o grupo mais abundante de fatores de transcrição estudado em plantas. Esse fatores de transcrição controlam processos como a diferenciação celular da epiderme, abertura estomática, síntese de flavonóides, tolerância à seca e ao frio e resistência à patógenos (Matus et al., 2008). Além do elemento cis MBS foi identificado também a presença do CCAAT-box que é o sítio de ligação de MYBHv1 que é um dos fatores de transcrição da superfamília MYB. Esse dois elementos só foram encontrados no *ptox2* o que explica a sua regulação diferencial em folhas de milho submetidas à estresse osmótico como já foi discutido.

Na tentativa de detectar-se a atividade da PTOX foram testados protocolos para extração de cloroplasto intactos e de tilacóides em folhas de milho. A adaptação do protocolo de isolamento de cloroplastos intactos com plantas de tabaco (CIT) para as de milho não foi possível. Daí, o isolamento da fração tilacoidal foi estabelecido de acordo com Casazza e colaboradores (2001), o qual se revelou compatível para o estudo da atividade da PTOX. Após o isolamento de tilacóides foram feitos ensaios polarográficos para tentar detectar a atividade da PTOX em tilacóides de milho.

De acordo com os traçados polarográficos mostrados na figura 22, indicativos do grau de acoplamento e da qualidade da preparação, através de medidas de evolução de O_2 , reação de Hill (Figura 22A) e consumo de O_2 , reação de Mehler (Figura 22B), constatou-se a boa qualidade da preparação. Contudo, a estratégia escolhida para o estudo da atividade da PTOX não teve êxito. Tal resultado negativo não foi surpreendente, vez que, Peltier & Cournac, em 2002, mostraram que as estimativas alcançadas para avaliar o fluxo de elétrons através da cloro-respiração correspondia a apenas 2% do valor estimado para o transporte de elétrons através da cadeia clássica (esquema "Z"). Tal fluxo de elétrons foi anteriormente estudado por outros grupos de pesquisa que também não encontraram valores superiores aos registrados por Peltier & Cournac, em 2002.

Provavelmente devido ao baixo percentual do fluxo de elétrons através da cloro-respiração, também em tilacóides de milho, não tenha sido possível se estimar a atividade da PTOX através de ensaios polarográficos quando os tilacóides foram supridos com NADH.

Diante desse resultado negativo foi escolhida uma outra estratégia para estimar-se a atividade da cloro-respiração. Tal estimativa foi feita de maneira indireta através da medida da atividade da NDH em géis nativos de poliacrilamida (Figura 23). Essa figura mostra as bandas reveladas correspondentes a atividade da NDH do plastídeo nos tilacóides de folhas de milho. Como já foi largamente esclarecido, a NDH é um dos componentes fundamentais para o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons da cloro-respiração estando conectada a PTOX. Assim, pode-se sugerir a presença da PTOX nos tilacóides isolados de folhas de milho já que ambas proteínas são parte essencial da cloro-respiração.

Ademais, foram usadas ferramentas de bioinformática para prever o destino das proteínas codificadas pelos genes da PTOX. Ambos os genes da PTOX codificaram proteínas que continham seqüências de endereçamento para o cloroplasto. As diversas ferramentas de bioinformática usadas identificaram esse peptídeo sinal de endereçamento ao cloroplasto tendo sido confirmado com grau de certeza de 93%.

Os dois genes da PTOX de milho foram comparados com outros 21 genes da PTOX, já sequenciados e a maioria deles já anotados nos bancos de genes, através de uma análise filogenética. Nessa pesquisa foram encontrados dois genes codificantes para a PTOX em apenas duas outras espécies como poplar, uma dicotiledônea, e sorgo, uma monocotiledônia.

Nossos dados revelaram que os dois genes da PTOX de milho são ortólogos aos dois genes da PTOX de sorgo. Fora dos dois grandes grupos das dicotiledôneas e das monocotiledôneas encontram-se duas seqüências uma de *Saruma* um gênero considerado basal dentro das dicotiledôneas e a seqüência de uma gimnosperma, o *Pinus*, ambas sendo grupos ancestrais dentro das seqüências aqui utilizadas, o que indica a presença da PTOX desde cedo na evolução das plantas como indicado em vários trabalhos com espécies de plantas, algas e até cianobactérias (Kuntz, 2004).

Uma análise de expressão virtual dos genes da PTOX de milho foi feita através de BLAST com cada um dos genes na busca por ESTs que indicassem o local e a condição de expressão dos mesmos. Neste caso foram obtidos poucos resultados mas que indicavam que a PTOX era expressa em todos os tecidos da planta inclusive no embrião e no endosperma. A PTOX2 foi encontrada em pelo menos “4 hits” como sendo expressa em raízes de plantas de milho o que seria mais um indício de expressão diferencial dos genes já que a PTOX1 não foi encontrada nenhuma vez como sendo expressa em raízes nas bibliotecas pesquisadas.

Assim como a AOX é codificada por uma família multigênica e submetida a uma complexa regulação diferencial durante o desenvolvimento e em diferentes condições de estresse nas plantas de milho (Considine et al., 2001 & Saika et al., 2002; Arnholdt-Schmitt et al., 2006), pode-se sugerir que a PTOX também tenha uma regulação diferencial de seus genes possivelmente nos diferentes tecidos como também mais caracteristicamente em diferentes situações de estresse .

6 CONCLUSÃO

Pela primeira vez foi revelada a presença de dois genes da PTOX em cloroplastos de plantas de milho, uma monocotiledônea de metabolismo C4. “Primers” específicos foram desenhados, com base em ferramentas de bioinformática, e esses genes foram identificados e denominados de *ptox1* e *ptox2*. Eles foram encontrados em raízes e folhas e apenas o gene da *ptox2* pareceu ser induzido em resposta ao estresse osmótico. Estudo filogenéticos revelaram que esses genes são ortólogos aos genes de sorgo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. (2006) Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. **Annals of Botany** 97, 925-931, 2006.
- ALURU, M.R.; BAE, H.; WU, D.; RODERMEL, S.R. (2001) The Arabidopsis *immutans* mutation affects plastid differentiation and the morphogenesis of white and green sectors in variegated plants. **Plant Physiol** 127:67–77
- ALURU, M.R.; RODERMEL, S.R. (2004) Control of chloroplast redox by the IMMUTANS terminal oxidase. **Physiologia Plantarum**. 120, 4-11.
- ARCHIBALD, J.M.; ROGERS, M.B.; TOOP, M.; ISHIDA, K.; KEELING, P. (2003) Lateral gene transfer and the evolution of plastid-targeted proteins in the secondary plastid-containing alga *Bigeloviella natans*. **Proc Natl Acad Sci**. 100,7678-7683.
- ARNHOLDT-SCHMITT, B.; COSTA, J.H.; FERNANDES DE MELO, D. AOX- a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? (2006) **Trends in plant science**. 11:281-287.
- ASADA, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 50:601–39.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (1992). **Short Protocols in Molecular Biology**. (New York: John Wiley & Sons).
- BAENA-GONZÁLEZ, E.; ALLAHVERDIYEVA, Y.; SVAB, Z.; MALIGA, P.; JOSSE, E.-M.; KUNTZ, M.; MÄENPÄÄ, P.; ARO, E.-M. (2001) Deletion of the tobacco plastid *psbA* gene triggers an upregulation of the thylakoid-associated NAD(P)H dehydrogenase complex and the plastid terminal oxidase (PTOX), **Plant J**. 35: 704–716.
- BANNAI, H., TAMADA, Y., MARUYAMA, O., NAKAI, K., AND MIYANO, S. (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals", **Bioinformatics**. 18, 298-305.
- BENNOUN, P. (1982). Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. **Proceedings of the National Academy of Science**, 79:4352–56
- BENNOUN, P. (2001) Chlororespiration and the process of carotenoid biosynthesis, **Biochim. Biophys. Acta**. 1506:133–142.
- BENNOUN, P. (1982) Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. **Proc Natl Acad Sci**. 79:4352–4356.
- BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; WHEELER, D. L. (2006) GenBank. **Nucleic Acid Research**. 34:D16-D20.
- BERGER, S.; ELLERSIEK, U.; WESTHOFF, P.; STEINMULLER, K. 1993. Studies on the expression of NDH-H, a subunit of the NAD(P) H-plastoquinone oxidoreductase of higher plant chloroplasts. **Planta** 190:25–31
- BOHNERT H. J.; JENSEN, R. G. (1996). Strategies for engineering water stress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**. 14:89-97
- BOOKER, J.; AULDRIDGE, M.; WILLS, S.; MCCARTY, D.; KLEE, H.; LEYSER, O. (2004) MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. **Curr Biol**.14, 1232-1238.

- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEN, W.; JONES, R.L. (2000) **Biochemistry and Molecular Biology of plants**. Estados Unidos, American society of plant physiologists. 1367p
- BÜCHEL C, GARAB G. (1995). Evidence for the operation of a cyanide-sensitive oxidase in chlororespiration in the thylakoids of the chlorophyll c-containing alga *Pleurochloris meiringensis* (Xanthophyceae). **Planta** 197:69–75
- BURROWS, P.A.; SAZANOV, L.A.; SVAB, Z.; MALIGA, P.; NIXON, P.J. (1998). Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. **EMBO J.** 17:868–76
- CAROL, D.; KUNTZ, M. (2001) A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. **Trends in Plant Science.** 6:31-36.
- CAROL, P.; STEVENSON, D.; BISANZ, C.; BREITENBACH, J.; SANDMANN, G.; MACHE, R.; COUPLAND, G.; KUNTZ, M. (1999) Mutation in the *Arabidopsis* gene IMMUTANS causes a variegate phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. **Plant Cell.** 11:57-68.
- CARUSO, A.; CHEFDOR, F.; CARPIN, S.; DEPIERREUX, C.; DELMOTTE, F. M.; KAHLEM, G.; MORABITO, D. (2007) Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. **Journal of Plant Physiology.** doi: 10.1016/j.jplph.2007.04.006
- CASANO, L. M.; LASCANO, H. R.; MARTÍN, M.; SABATER, B. (2004) Topology of the plastid Ndh complex and its NDH-F subunit in thylakoid membranes. **Biochemistry Journal.** 382:145-155.
- CASAZZA, A. P.; TARANTINO, D.; SOAVE, C. (2001) Preparation and functional characterization of thylakoids from *Arabidopsis thaliana*. **Photosynthesis research.** 68:175-180
- CHEN, H.C.; MELIS, A. (2002) A putative chloroplast quinol-to-oxygen oxidoreductase in *Chlamydomonas reinhardtii*. GenBank accession AF494290.
- CONSIDINE, M.J., DALEY, D.O., AND WHELAN, J. (2001). The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. **Plant Physiol.** 126, 1619–1629.
- COURNAC, L.; JOSSE, E-M.; JÖET, T.; RUMEAU, D.; REDDING, K.; KUNTZ, M.; PELTIER, G. (2000) Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.** 355:1447-1454.
- COURNAC, L.; LATOUCHE, G.; CEROVIC, Z.; REDDING, K.; RAVENEL, J.; PELTIER, G. (2002) In vivo interactions between photosynthesis, mitorespiration, and chlororespiration in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology.** 129:1921-1928.
- DARIE, C. C.; PASCALISB, L. D.; MUTSCHLERC, B.; HAEHNEL, W. (2006) Studies of the Ndh complex and photosystem II from mesophyll and bundle sheath chloroplasts of the C4-type plant *Zea mays*. **Journal of Plant Physiology** 163:800—808.
- DAVISON, P.A. (2002) Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. **Nature** 418:203-206.

- EMANUELSSON O, NIELSEN H, VON HEIJNE G. (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. **Protein Science**. 8, 978-984.
- EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK S.; VON HEIJNE, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **J. Mol. Biol.** 300: 1005-1016.
- FEILD, T.S.; NEDBAL, L.; ORT, D.R. (1998). Nonphotochemical reduction of the plastoquinone pool in sunflower leaves originates from chlororespiration. **Plant Physiology** 116:1209–18
- FISCHER, M.; FUNK, E.; STEINMÜLLER, K. (1997). The expression of subunits of the mitochondrial complex I-homologous NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase during plastid development. **Z. Naturforsch. Teil C** 52:481–86
- FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Prog Lipid Res** 43:228-265.
- FU, A.; PARK, S.; RODERMEL, S. (2005) Sequences Required for the Activity of PTOX (IMMUTANS), a Plastid Terminal Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 280:42489–42496
- GAFFRON, H.; RUBIN, J. (1942) Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. **J. Gen. Physiol.** 26:219-40.
- GALLAGHER, C.E.; MATTHEWS, P.D.; LI, F.; WURTZEL, E.T. (2004) Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses (Poaceae). **Plant Physiology**. 135:1776-1783.
- GFELLER, R.P.; GIBBS, M. (1985) Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. 2. Role of plastoquinone. **Plant Physiol.** 77:509-511.
- GODDE, D. (1982). Evidence for a membrane-bound NADH-plastoquinone oxidoreductase in *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15. **Arch. Microbiol.** 131:197–202
- GODDE, D.; TREBST, A. (1980) NADH as electron donor for the photosynthetic membrane of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Arch. Microbiol.** 127:245-52.
- GOMES, C.M.; LE GALL, J.; XAVIER, A.V.; TEIXEIRA, M. Could a diiron-containing four-helix-bundle protein have been a primitive oxygen reductase? **Chem. Bio. Chem.** 2, 583-587, 2001.
- GUEDENEY, G.; CORNEILLE, S.; CUINE, S.; PELTIER, G. (1996). Evidence for an association of *ndhB*, *ndhJ* gene products and ferredoxin-NADP-reductase as components of a chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex. **FEBS Lett.** 378:277–80
- GUERA, A.; DE NOVA, P.; SABATER, B. (2000) Identification of the Ndh (NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase) complex in etioplast membranes of barley: changes during photomorphogenesis of chloroplasts. **Plant Cell Physiol** 41:49–59
- HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K.; BOHNERT, H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 51: 463-499.
- HAVAUX, M.; DALL'OSTO, L.; BASSI, R. Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in *Arabidopsis* leaves and functions independent of binding to PSII antennae. **Plant Physiology**. 145, 1506-1520, 2007.

- HORVATH, E.M.; PETER, S.O.; JOËT, T.; RUMEAU, D.; COURNAC, L. (2000) Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. **Plant Physiol.** 123:1337–49
- INGRAM, J.; BARTEL, D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.** 47:377–403.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção Agrícola Municipal. IBGE, Tabela 1612. 2003. Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br
- JIANG, M.; ZHANG, J. (2002) Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. **Journal of Experimental Botany.** 53:2401-2410
- JOËT T., COURNAC L., HORVATH E.M., MEDGYESY P. & PELTIER G. (2001) Increased sensitivity of photosynthesis to antimycin A induced by inactivation of the chloroplast *ndhB* gene. Evidence for a participation of the NADH-dehydrogenase complex to cyclic electron flow around photosystem I. **Plant Physiology** 125, 1919–1929.
- JOËT, T.; GENTY, B.; JOSSE, E-M.; KUNTZ, M.; COURNAC, L.; PELTIER, G. (2002) Involvement of a Plastid Terminal Oxidase in Plastoquinone Oxidation as Evidenced by Expression of the Arabidopsis thaliana Enzyme in Tobacco. **The Journal of Biological Chemistry.** 277:31623–31630
- JOHNSON, G. N. (2005) Cyclic electron transport in C3 plants: fact or artefact?, **J. Exp. Bot.** 56:407–416.
- JOHNSON, M.P.; HAVAUX, M.; TRIANTAPHYLIDES, C.; KSAS, B.; PASCAL, A.A.; ROBERT, B.; DAVISON, P.A.; RUBAN, A.V.; HORTON, P. (2007) Elevated zeaxanthin bound to oligomeric LHCII enhances the resistance of Arabidopsis to photooxidative stress by a lipid-protective, antioxidant mechanism. **Journal of Biological Chemistry.** 282:22605-22618.
- JOSSE, E-M.; ALCARAZ, J-P.; LABOURÉ, A-N.; KUNTZ, M. (2003) *In vitro* characterization of plastid terminal oxidase (PTOX). **European Journal of Biochemistry.** 270:3787-3794.
- JOSSE, E-M.; SIMKIN, A.J.; GAFFE, J.; LABOURE, A.M.; KUNTZ, M.; CAROL, P. (2000) A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. **Plant Physiol.** 123:1427-36.
- KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; WOLK, C.P.; KURITZ, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IRIGUCHI, M.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MURAKI, A.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKAZAWA, M.; YAMADA, M.; YASUDA, M.; TABATA, S. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **DNA Res** 8:205-213.
- KANERVO, E.; SOURSA, M.; ARO, E-M. (2005) Functional flexibility and acclimatation of the thylacoid membrane. **Photochem photobiol Sci.**, 4:1072-1080.
- KOFER W, KOOP HU, WANNER G, STEINMÜLLER K. (1998) Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-

- plastoquinoneoxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plastome transformation. **Mol. Gen. Genet.** 258:166–73
- KONG, J.; GONG, J.M.; ZHANG, Z.G.; ZHANG, J.S.; CHEN, S.Y. (2003) A new AOX homologous gene OsIM1 from rice (*Oryza sativa* L.) with an alternative splicing mechanism under salt stress. **Theor Appl Genet** 107:326-331.
- KUMAR, S.; DUDLEY, J.; NEI, M.; TAMURA, K. (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics.** 9: 299-306.
- KUNTZ, M. (2004) Plastid terminal oxidase and its biological significance. **Planta** 218:896-899.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227:680-685.
- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. (2007) ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics** 2007 23(21): 2947-2948.
- LEMIEUX, C.; OTIS, C.; TURMEL, M. (2000) Ancestral chloroplast genome in *Mesostigma viride* reveals an early branch of green plant evolution. **Nature** 403:649–52
- LENNON AM, PROMMEENATE P, NIXON PJ (2003) Location, expression and orientation of the putative chlororespiratory enzymes, Ndh and IMMUTANS, in higher-plant plastids. **Planta** 218:254–260
- LESCOT, M.; DHAIS, P.; THIJS, G.; MARCHAL, K.; MOREAU, Y.; VAN DE PEER, Y.; ROUZ, P.; ROMBAUTS, S. (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences **Nucleic Acids Res.** 30:325-327.
- LI, F.; MURILLO, C.; WURTZEL, E.T. (2007) Maize Y9 encodes a product essential for 15-cis zetacarotene isomerization. **Plant Physiology.** 144:1181-1189.
- LI, Y.; SOMMERFELD, M.; CHEG, F.; HU, Q. (2008) Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: A protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Plant Physiology**
- LU, J.; SIVAMANI, E.; LI, X.; QU, R. (2008) Activity of the 50 regulatory regions of the rice polyubiquitin rubi3 gene in transgenic rice plants as analyzed by both GUS and GFP reporter genes **Plant Cell Rep.** 27:1587–1600
- MAIONE, T.E.; GIBBS, M. (1986) Hydrogenase-mediated activities in isolated chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiol.** 80, 360-63.
- MATUS, J.T.; AQUEA, F.; ARCE-JOHNSON, P. (2008) Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes **BMC Plant Biol.** 8:83.
- MCDONALD, A.E.; VANLERBERGHE, G.C. (2006) Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part D1,** 357-364.
- MCFADDEN, G. I. (2001) Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. **Journal of Phycology.** 37:951–959.
- MITTLER R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** 7:405–410.

- MOMANY, FRANK A.; SESSA, DAVID J.; LAWTON, JOHN C.; SELLING, GORDON W.; HAMAKER, SHARON A. H.; AND WILLETT, JULIOUS L. (2005) Structural Characterization of A-Zein., **American Chemical Society**
- MUNEKAGE Y., HASHIMOTO M., MIYAKE C., TOMIZAWA K., ENDO T., TASAKA M. & SHIKANAI T. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. **Nature** 429, 579–582.
- NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; SATO, S.; MIMURO, M.; MIYASHITA, H.; TSUCHIYA, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; KAWASHIMA, K.; KISHIDA, Y.; KIYOKAWA, C.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; TAKEUCHI, C.; YAMADA, M.; TABATA, S. (2003) Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. **DNA Res** 10:137-145.
- NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annu Rev Plant Biol** 56, 165-185, 2005.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. (2005) **Lehninger Principles of Biochemistry**, Estados Unidos, W. H. Freeman, 1100 pp.
- NIXON, P.J. Chlororespiration. **Phil.Trans. R. Soc. Lond. B**, 355, 1541-1547, 2000.
- NIYOGI, K. K. Safety valves for photosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**. 3: 455-460, 2000.
- OHYAMA K, KOHCHI T, SANO T, YAMADA Y. 1988. Newly identified groups of genes in chloroplasts. **Trends Biochem. Sci.** 13:19–22
- PELTIER, G. & COURNAC, L. Chlororespiration. **Annual Review of Plant Biology** 53:523-550. 2002.
- PELTIER, G.; RAVENEL, J.; VERMÉGLIO, A. (1987) Inhibition of a respiratory activity by short saturating flashes in *Chlamydomonas*: evidence for a chlororespiration. **Biochim Biophys Acta** 893:83–90.
- PIEULLE L, GUEDENEY G, CASSIER-CHAUVAT C, JEANJEAN R, CHAUVAT F, PELTIER A. (2000)The gene encoding the NdhH subunit of type 1 NAD(P)H dehydrogenase is essential to survival of *Synechocystis* PCC6803. **FEBS Lett** 487:272–6
- POHL, M. E. D.; PIPERNO, D. R.; POPE, K. O.; JONES, J. G. (2007) Microfossil evidence for pre-Comulbian maize dispersal in the neotropics from San Andreas, Tabasco, Mexico. **PNAS**, 104:6870-6875,.
- QUILES M J, ALBACETE M E, SABATER B, CUELLO J. (1996) Isolation and Partial Characterization of the NADH Dehydrogenase Complex from Barley Chloroplast Thylakoids **Plant Cell Physiol.** 37:1134–1142.
- ROCAP, G.; LARIMER, F.W.; LAMERDIN, J.; MALFATTI, S.; CHAIN, P.; AHLGREN, N.A.; ARELLANO, A.; COLEMAN, M.; HAUSER, L.; HESS, W.R.; JOHNSON, Z.I.; LAND, M.; LINDELL, D.; POST, A.F.; REGALA, W.; SHAH, M.; SHAW, S.L.; STEGLICH, C.; SULLIVAN, M.B.; TING, C.S.; TOLONEN, A.; WEBB, E.A.; ZINSER, E.R.; CHISHOLM, S.W. (2003) Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. **Nature**. 424:1042-1047.
- RÖBBELEN G. (1968) Genbedingte Rotlicht-Empfindlichkeit der Chloroplastendifferenzierung bei *Arabidopsis*. **Planta**. 80, 237– 254.
- RUMEAU, D.; PELTIER, G.; COURNAC, L. (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. **Plant, Cell and Environment**. 30:1041–1051.

- RUMEAU, D, BÉCUWE-LINKA, N.; BEYLY, A.; LOUWAGIE, M.; GARIN, J.; PELTIER, G. (2005) New Subunits NDH-M, -N, and -O, Encoded by Nuclear Genes, Are Essential for Plastid Ndh Complex Functioning in Higher Plants. **The Plant Cell**. 17, 219–232.
- SAIKA, H., OHTSU, K., HAMANAKA, S., NAKAZONO, M., TSUTSUMI, N., AND HIRAI, A. (2002). AOX1c, a novel rice gene for alternative oxidase: Comparison with rice AOX1a and AOX1b. **Genes Genet. Syst.** 77, 31–38.
- SANDMANN, G.; BÖGER, P. (1989) Inhibition of carotenoid biosynthesis by herbicides. In: Böger P, Sandmann G, editors. **Target sites of herbicides action**. Boca Raton, FL: CRC Press; p. 25–44.
- SANDMANN, G. (2002) Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants. **Physiologia Plantarum**. 116:431–440.
- SAZANOV, L.A.; BURROWS, P.A.; NIXON, P.J. (1998) The plastid ndh genes code for an NADH-specific dehydrogenase: isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95:1319–24
- SAZANOV, L.A.; BURROWS, P.; NIXON, P.J. (1996) Detection and characterization of a complex I-like NADH-specific dehydrogenase from pea thylakoids. **Biochem. Soc. Trans.** 24:739-43.
- SCHERER, S. (1990) Do photosynthetic and respiratory electron transport chains share redox proteins. **Trends Biochem Sci** 15: 458–462.
- SERRANO, R.; RODRIGUEZ-NAVARRO, (2000) A. Ion homeostasis during salt stress in plants. **Cur. Opin. In Cell Biol.** 13: 399-404.
- SHIKANAI, T.; ENDO, T.; HASHIMOTO, T.; YAMADA, Y.; ASADA, K.; YOKOTA, A. (1998) Directed disruption of the tobacco ndhB gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95:9705–9
- SHINOZAKI, K.; OHME, M.; TANAKA, M.; WAKASUGI, T.; HAYASHIDA, N. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. **EMBO J.** 5:2043–49
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology** 115, 327±334.
- SIMKIN, A.J.; BREITENBACH, J.; KUNTZ, M.; SANDMANN, G. (2000) In vitro and in situ inhibition of carotenoid biosynthesis in *Capsicum annuum* by bleaching herbicides. **J Agric Food Chem** 48:4676–80.
- SIMKIN, A.J.; MOREAU, H.; KUNTZ, M.; PAGNY, G.; LIN, C.; TANKSLEY, S.; MCCARTHY, J. (2007) An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. **J Plant Physiol**. doi:10.1016/j.jplph.2007.06.016
- STENØIEN, H. K. (2007) Compact genes are highly expressed in the moss *Physcomitrella patens*. **Journal Compilation of the European Society for Evolutionary Biology**. 20:1223-1229.
- SURPIN, M.; LARKIN, R.M.; CHORY, J. (2002) Signal transduction between the chloroplasts and the nucleus. **Plant Cell** 14: S327–S338
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2002) **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre. Artemed. 719p
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. (1997) The CLUSTA_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acid Research**. 25:4876-4882

- TILNEY-BASSETT, R.A.E.; ALMOUSLEM, A.B. (1989) Variation in plastid inheritance between pelargonium cultivars and their hybrids. **Heredity**, 63:145–153.
- TURMEL, M.; OTIS, C.; LEMIEUX, C. (1999) The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96:10248–53
- UMENO, D.; TOBIAS, A.V.; ARNOLD, F.H. (2005) Diversifying Carotenoid Biosynthetic Pathways by Directed Evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 69:51-78
- URAO, T.; YAKUBOV, B.; SATOH, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. **Plant Cell**.11:1743–54.
- URAO, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. (2000) Two component systems in plant signal transduction. **Trends Plant Sci**. 5:67–74.
- VANLERBERGHE, G.C.; MCINTOSH, L. (1997) Alternative oxidase: from gene to function. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 48: 703–734
- WETZEL C.M., JIANG C., MEEHAN L.J., VOYTAS D.F. & RODERMEL S.R. (1994) Nuclear-organelle interactions: the *immotans* variegation mutant of *Arabidopsis* is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis. **Plant Journal**. 6, 161–175.
- WHATLEY, F. R.; TAGAWA, K.; ARNON, D. I. (1963) Separation of the light and dark reactions in electron transfer during photosynthesis **Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.**, 49, 266.
- WOO, K.C.; ANDERSON, J.M.; BOARDMANN, N.K.; DOWNTON, W.J.S.; OSMOND, C.B.; THORNE, S.W. (1970) Deficient photosystem II in agranal bundle sheath chloroplasts of C4 plants. **Proc Natl Acad Sci USA** 67:18–25.
- WU, D.; WRIGHT, D.A.; WETZEL, C.; VOYTAS, D.F.; RODERMEL, S. (1999) The *IMMUTANS* variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. **Plant Cell**, 11:43-55.
- ZOU, Z.; EIBL, C.; KOOP, H-U. (2003) The stem-loop region of the tobacco *psbA* 5'UTR is an important determinant of mRNA stability and translation efficiency. **Mol Gen Genomics** 269: 340–349