



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



INRA



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Centro de Ciências

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Curso de Pós-graduação em Bioquímica

CARACTERIZAÇÃO DE DOIS CULTIVARES DE *Vigna unguiculata*
EM REPOSTA A SECA COMBINADA OU NÃO COM OZÔNIO:
REGULAÇÃO DE PROTEÍNAS MEMBRANARES (AOX, pUCP E PTOX)

FRANCISCO YURI MAIA DE SOUSA

Fortaleza
2012



CARACTERIZAÇÃO DE DOIS CULTIVARES DE *Vigna unguiculata* EM REPOSTA A SECA COMBINADA OU COM OZÔNIO:

REGULAÇÃO DE PROTEÍNAS MEMBRANARES (AOX, pUCP E PTOX)

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

Orientadora: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo

Co-Orientador: Prof. Dr. Yves Jolivet

Fortaleza
Novembro - 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- S696c Sousa, Francisco Yuri Maia de.
Caracterização de dois cultivares de *Vigna unguiculata* em resposta a seca combinada ou não com ozônio: regulação de proteínas membranares (AOX, pUCP e PTOX) / Francisco Yuri Maia de Sousa. – 2012.
120f. : il., color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo.
Coorientação: Prof. Dr. Yves Jolivet.
1. Feijão-de-corda. 2. Seca. 3. Ozônio. 4. Oxidase alternativa. I. Título.

FRANCISCO YURI MAIA DE SOUSA

CARACTERIZAÇÃO DE DOIS CULTIVARES DE *Vigna unguiculata*
EM REPOSTA A SECA COMBINADA OU NÃO A
FORTES DOSES DE OZÔNIO:
REGULAÇÃO DE PROTEÍNAS MEMBRANARES (AOX, pUCP E PTOX)

Aprovada em: 23 de Novembro de 2012

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Dirce Fernandes de Melo
Orientadora
Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. Yves Jolivet
Orientador
Université de Lorraine



Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho



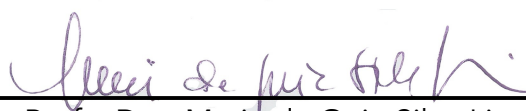
Prof. Dr. Pierre Carol
Université Pierre et Marie Curie



Prof. Dr. Pierre Dizengremel
Université de Lorraine



Prof. Dra. Maria Erivalda F. de Aragão
Universidade Estadual do Ceará



Prof. Dra. Maria da Guia Silva Lima
Universidade Federal do Ceará

AGRADECIMENTOS

Depois de mais de dez anos de trabalho no laboratório de pesquisa de Bioenergética da Universidade Federal do Ceará, e durante os últimos dois anos passados no laboratório Ecologia e Ecofisiologia Florestal à Nancy, meus agradecimentos vão para todos aqueles, e são muitos, que contribuíram de uma forma ou de outra na preparação desta tese como a culminação de uma carreira científica.

Primeiro de tudo eu quero agradecer à professora Dirce, minha primeira e mais importante fonte de inspiração para o trabalho de pesquisa, o seu talento e sua incansável perseverança, mesmo quando as condições não são as mais fáceis, me ensinaram que mesmo quando o caminho é difícil, sempre podemos desfrutar de longas horas de discussão e assim trabalhar mais feliz.

Nesta tese eu gostaria também de agradecer muitíssimo ao professor Yves por me receber incondicionalmente em sua equipe, me ajudar desde os meus primeiros passos hesitante no laboratório, para dizer o mínimo, até os últimos dias de escrita, porque sempre foi paciente e compreensivo e confiou no meu trabalho. Yves, agradeço também por todas as horas de discussão muito proveitosa neste durante este trabalho.

Agradeço também ao Prof. Pierre Dizengremel que me acolheu em sua equipe e pelas discussões que sempre me ajudaram a ver os resultados de outra maneira. Obrigado a Marie-Paule Hasenfratz-Sauder pelas correções do francês. Um muito obrigado especial a Marie-Noëlle Vaultier por todas as dicas do trabalho na bancada assim como as da vida cotidiana, que me ajudaram muito como um estrangeiro na França.

Obrigado a todos aqueles que trabalharam comigo ou do meu lado no laboratório brasileiro, membros do laboratório, assim como todos os amigos que apareceram ao longo desta jornada: Luciana Maia, Alana Cecília, Neuza Felix e Erika Freitas. Com a ajuda de muitas pessoas, consegui concluir mais esta etapa, aqui eu quero também agradecer ao Prof Hélio Costa por todas as dicas e minha introdução à bioinformática. Em relação aos colegas de laboratório, obrigado pelo ambiente de trabalho produtivo e amigável, entre eles Camila Freitas, João Henrique, Débora Moura, Carine e Carol Almada e Edson Garantizado.

Meus agradecimentos, vão também, a toda a equipe do quinto andar. Primeiramente: Joëlle por sua valiosa assistência no laboratório, conselhos em microscopia e também seu desejo incansável de ajudar, Jean-Claude sempre reclamando de algo, Mireille, Dany, Elisabeth, Dominique com quem é sempre extremamente gratificante se trabalhar, Lysiane e Prof Daniel Epron finalmente por

seu apoio como diretor do laboratório. Também gostaria de agradecer aos colegas sextoandar: Carolina, Pierrick e Sandrine pelas discussões durante o almoço, que sempre era divertido e informativo ao mesmo tempo.

Um obrigado especial à minha amiga Morgane, que durante a minha estadia no laboratório fez de tudo para me ajudar tanto na pesquisa quanto na vida de todo dia. Obrigado pelas discussões filosóficas, por todo o apoio moral que você me deu, não esquecendo os muitos "saídas culturais" tão importantes quanto o trabalho no laboratório.

Eu não posso não agradecer aos estagiários que contribuíram para esse trabalho de tese: Clio que não teve muita sorte com os Western Blotting e Pierre que teve um pouco mais de sorte com as dosagens de MDA.

Eu gostaria também de agradecer a minha família pelo apoio incondicional durante toda a minha vida e sobretudo durante o meu período na França, meu Pai, meus irmãos e minha mãe, sem o apoio deles o trabalho se tornaria muito difícil e minha estada na França quase impossível.

Um ultimo agradecimento aos amigos de longas datas no Brasil: Wal, Célio e Juliana, tanto quanto para os novos adquiridos durante meu período na França. Estes últimos, tão importantes na ultima linha reta de todo esse trabalho. Obrigado Emmanuel Boutin pelo enorme apoio e a toda a trupe também: Romain, Manon A., Manon H., Cédric, Ségolène, Elodie, Julien et Anthony.

O trabalho experimental apresentado nesta tese foi realizado sob um acordo de cotutela entre a Université de Lorraine e a Universidade Federal do Ceará e financiado pelo acordo CAPES/COFECUB 685/10. O trabalho foi realizado sob a responsabilidade conjunta de Yves Jolivet e Marie-Noelle Vaultier, da equipe de Fisiologia e Diversidade resposta à estresses da UMR 1137 INRA/UL Ecologia Ecofisiologia Florestal em Vandoeuvre-lès-Nancy, e também sob a responsabilidade de Dirce Fernandes de Melo do Laboratório de Bioenergética, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Apoio Financeiro:



“Remembering that you are going to die is the best way I know
to avoid the trap of thinking you have something to lose.
You are already naked.
There is no reason not to follow your heart.”

Steve Jobs

A Fotossíntese e a respiração são bem conhecidos como sendo responsáveis pela produção de energia no interior das células de plantas. Acoplados à estes processos bioenergéticos, a transferência de elétrons que ocorre nas membranas do cloroplasto e mitocôndria, também são considerados com tendo potencial de produção de ROS. Possíveis interações no funcionamento dessas organelas permanecem pouco conhecidas, especialmente em resposta a condições de estresse. Sob estas condições, sugere-se que as vias de transferência de elétrons ligadas à AOX, à pUCP ou à PTOX poderia limitar a formação de ROS reduzindo assim danos oxidativos às organelas celulares. Em nosso trabalho, foram selecionadas duas cultivares de *Vigna unguiculata*, inicialmente caracterizados como sensível (cv 1183) ou tolerante (cv EPACE1) à seca. Sob condições experimentais, as duas cultivares não apresentaram diferenças significativas na sensibilidade à seca. Entretanto o cultivar EAPCE1 foi mais tolerante ao ozônio com base no desenvolvimento de necrose e de vários parâmetros fisiológicos (Φ PSII) e bioquímicos (teor de glutatona). Para os perfis de expressão de genes que codificam AOX, PUCP e PTOX duas respostas foram claramente identificadas no cultivar EPACE1. Em um tempo curto, a expressão destas proteínas é geralmente estimulada. Em um período mais longo (14 dias), a resposta é diferente, dependendo da tipo de estresse. Sob o ozônio, um aumento da expressão das proteínas mitocondriais é mantida enquanto o gene que codifica para a PTOX é sub-regulada. Sob seca a proteína desacopladora do plastídio (PTOX) é super-expressa. Sob condições de combinação stress, seca combinada com ozônio, o efeito da seca sobre o fluxo de ozônio nas folhas não foi alterado, e os genes *VuPTOX* e *VuUCP1b* são super-expressos depois de 3 e 7 dias de stress. Este aumento da expressão, já observado em resposta à seca por aplicada separadamente poderia desempenhar um papel na prevenção da formação de ROS tanto em mitocôndrias e cloroplastos prevenindo assim os danos causados pelo ozônio.

Palavras-Chaves:

Vigna unguiculata, seca, ozônio, oxidase alternativa (AOX), proteína desacopladora de plantas (pUCP), oxidase terminal do plastídio (PTOX)

Les interactions entre chloroplastes et mitochondries restent encore mal connues, notamment en réponse à des conditions de stress. Dans ces conditions, il est suggéré que les voies de transfert d'électrons liées à des protéines découplantes AOX ou pUCP (mitochondriales) et PTOX (plastidiale) pourraient limiter la formation de ROS afin d'atténuer les dommages oxydatifs dans ces organites. Dans le cadre de notre travail, nous avons retenu deux cultivars de *Vigna unguiculata*, cv 1183 et cv EPACE. Les deux cultivars n'ont pas montré de réelles différences de sensibilité à la sécheresse. Par contre le cultivar EPACE s'est montré plus tolérant à l'O₃ sur la base du développement des nécroses et plusieurs paramètres physiologiques (F_v/F_m , Φ_{PSII}) et biochimiques (glutathion). Pour les profils d'expression des gènes codant pour l'AOX, la pUCP et la PTOX deux réponses ont été clairement identifiées chez le cultivar EPACE. Sur un court terme l'expression de ces protéines est généralement stimulée. Sur un plus long terme (14 jours), la réponse diffère en fonction de la contrainte. Sous O₃, la plus forte expression des protéines mitochondriales est maintenue alors que le gène codant pour la PTOX est sous-régulé. Sous sécheresse seule la protéine plastidiale (PTOX) reste sur-régulée. Dans des conditions de combinaison de contrainte, la sécheresse a peu d'effet sur l'influx d'O₃ dans les feuilles, et les gènes *VuPTOX* et *VuUCP1b* sont sur-régulés après 3 et 7 jours de contrainte. Cette sur-régulation, déjà observée en réponse à la sécheresse seule, pourrait jouer un rôle déterminant pour prévenir la formation de ROS à la fois dans la mitochondrie et dans le chloroplaste.

Possible interactions between chloroplast and mitochondria remain poorly known, particularly in response to stress conditions. Under these conditions, it is suggested that the electron transfer pathways linked to AOX or pUCP (mitochondrial uncoupling proteins) and PTOX (plastidial uncoupling protein) could limit the formation of ROS to reduce oxidative damage in cellular organelles. In our work, we selected two cultivars of *Vigna unguiculata*, cv 1183 and cv EPACE. Under our experimental conditions, both cultivars showed no real differences in sensitivity to drought. However cv EPACE was more tolerant to O₃ based on the development of necrosis and several physiological parameters (F_v/F_m , Φ_{PSII}) and biochemical (glutathione content). For the expression profiles of genes encoding AOX, PUCP and PTOX two responses were clearly identified in the cultivar EPACE. On a short-term, expression of these proteins is generally stimulated. On a longer term (14 days), the answer differs depending on the treatment. Under O₃, the strongest expression of mitochondrial proteins is maintained while the gene encoding the PTOX is down-regulated. Under drought only the plastid protein (PTOX) is up-regulated. Under conditions of stress combination, drought has little effect on the influx of O₃ in the leaves, and the *VuPTOX* and *VuUCP1b* genes are up-regulated after 3 and 7 days of stress. This over-regulation, already observed in response to drought alone could play a role in preventing the formation of ROS in both mitochondria and chloroplasts.

DNA – cido desoxirribonucleico

cDNA – Sequncias de DNA complementares

AOX – Oxidase alternativa

RNA – cido ribonucleico

mRNA – RNA mensageiro

EST – *Expressed Sequence Tag* (Marcadores expresso de sequências)

F_v/F_m – Rendimento quântico máximo do fotossistema II

O₃ – Ozônio

ppb – Partes por bilhão, em volume

ppm – Partes por milhão, em volume

PSI, II – Fotossistemas I e II

PTOX – Oxidase terminal do plastídio

pUCP – Proteína desacopladora de plantas

qN – *Quenching* não-fotoquímico

ROS – *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigênio)

RWC – Teor relativo de gua

SFW – Massa fresca da parte aérea

ϕ_{PSII} – Rendimento quântico do fotossistema II

1. Justificativa e Caracterização do Problema	12
2. Estado da Arte	17
2.1 O Caupi	17
2.2 Os estresses abióticos	20
2.2.1 A seca	22
2.2.2 O ozônio	24
2.3 A detoxificação	26
2.4 O metabolismo energético	28
2.4.1 A mitocôndria	28
2.4.1.1 A Oxidase Alternativa (AOX)	29
2.4.1.2 A Proteína Desacopladora de Plantas (pUCP)	32
2.4.2 Os plastos e o cloroplasto	34
2.4.2.1 A cloro-respiração	36
2.4.2.2 A Oxidase Terminal do Plastídio (PTOX)	39
3. Abordagem experimental	43
3.1 Material vegetal e condições de cultura	43
3.1.1 O dispositivo de fumigação	44
3.1.2 Procedimento de fumigação	45
3.1.3 Índices de exposição ao ozônio	45
3.2 Medidas da fluorescência da clorofila	46
3.3 Extração de RNA total e RT-PCR em tempo real	48
3.4 Extração de proteínas totais foliares	49
3.5 Western blotting	50
4. Physiological responses of two <i>Vigna unguiculata</i> cultivars to combined drought stress and ozone exposure.	53
Introduction	56
Material and Methods	59
Results	64
Discussion	69
5. Involvement of plastid terminal oxidase (PTOX) and mitochondrial uncoupling proteins (AOX and pUCP) in the response of <i>Vigna unguiculata</i> to combined drought stress and ozone exposure.	75
Introduction	79
Material an Methods	82
Results	88
Discussion	92
6. Análise da expressão da AOX (Resultados preliminares)	98
7. Conclusões e Perspectivas	101
8. Referências Bibliográficas	109

Artigo submetido

Maia, Y., Bagard, M., Costa, J.H., Vaultier, M-N., Rebouças, D.M., Grandjean, P., Dizengremel, P., Repellin, A., Fernandes de Melo D. and Jolivet, Y.

Involvement of plastid terminal oxidase (PTOX) and mitochondrial uncoupling proteins (AOX and pUCP) in the response of *Vigna unguiculata* to combined drought stress and ozone exposure

Soumis à Plant, Cell & Environment

Artigo em preparação

Maia, Y., Bagard, M., Costa, J.H., Vaultier, M-N., Rebouças, D.M., Grandjean, P., Dizengremel, P., Repellin, A., Jolivet, Y. and Fernandes de Melo D.

Physiological responses of two *Vigna unguiculata* cultivars to combined drought stress and ozone exposure

JUSTIFICATIVA & CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

1- JUSTIFICATIVA E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

As atividades antrópicas são responsáveis, depois de mais de um século, pelas mudanças climáticas que são acompanhadas de um aumento da concentração de gases de efeito estufa (CO₂, ozônio) e por consequência de um aumento da temperatura. Tais mudanças, desencadeiam períodos de secas prolongadas, inundações tanto quanto aumenta a salinidade dos solos. Todos estes estresses ambientais, em articular a seca ou a exposição à concentrações elevadas de ozônio têm um impacto desfavorável significativo sobre a produção das plantas cultivadas (Morgan, Ainsworth, & Long, 2003; Smith & Griffiths, 1993). Dentro deste contexto, a região nordeste do Brasil é particularmente atingida, pois ela está sujeita a períodos de secas regulares. Junta-se a essa condição desfavorável causadas pela seca, concentrações elevadas de ozônio na troposfera, que é atualmente reconhecido como um poluente atmosférico maior. Mesmo sendo as zonas tropicais menos atingidas que as regiões temperadas pela poluição causada pelo ozônio na troposfera, episódios de poluição devido ao aumento da concentração de ozônio na troposfera já foram identificados no Brasil, principalmente na periferia de grandes metrópoles (Morgan et al., 2003; Morgan, Mies, Bollero, Nelson, & Long, 2005).

Para prevenir tais riscos, as pesquisas voltadas para entender os efeitos dos estresses ambientais ganharam novo fôlego nos últimos anos. Sobretudo, no tocante as pesquisa na escala celular e molecular. O objetivo destas pesquisas é de entender os processos que são desencadeados pelas plantas que levam a tolerância aos estresses abióticos, conhecendo assim os mecanismos moleculares pelos quais determinadas espécies são mais tolerante. Depois de vinte anos, o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular permitiram que os mecanismos de tolerância pudessem ser reexaminados do ponto de vista dos genes, desde a identificação até

a seleção de genes que fossem capazes de aumentar a tolerância a determinado estresse e sobretudo na seleção de marcadores de tolerância que podem ajudar na transformação genética de plantas mais resistentes. Dentre as plantas cultivadas, o feijão de corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma leguminosa importante para o nordeste do Brasil, pois ela representa a principal fonte de alimentação de muitas famílias ao mesmo tempo que é também uma fonte de ganho econômico (Araújo & Watt, 1988).

Para compreender a maneira pela qual o metabolismo energético é um mecanismo de adaptação das plantas ao stress ambiental, propomos a explorar os mecanismos moleculares e bioquímicos de regulação de três proteínas da membrana: a oxidase alternativa (AOX) presente na membrana interna mitocôndria, proteína desacopladora mitocondrial de plantas (pUCP) e oxidase terminal do plastídio (PTOX). Estas proteínas desempenham um papel na transferência de elétrons associados com a cadeia respiratória ou com o ciclo da fotossíntese e podem desempenhar papéis importantes no controle e na produção de ROS nas células. Quando as plantas são submetidas à condições de seca e/ou ozônio, estas situações desfavoráveis podem modificar a regulação da produção de ROS e estas proteínas tornam-se alvos de grande interesse. Trabalhos anteriores, realizado em colaboração entre a equipe do Laboratório de Bioenergética (Universidade Federal do Ceará) e UMR 1137 (Equipe PhysioDiv) incidiram sobre o envolvimento de AOX em cultivares de *Vigna unguiculata* mostrando diferentes níveis de sensibilidade em relação à salinidade / seca (Fernandes de Melo et al., 1994). Esses estudos também têm ajudado a esclarecer os mecanismos de regulação de AOX (Lima-Júnior et al., 2000). Colaboração entre duas equipas de investigação foi recentemente reforçada pelo desenvolvimento de um projeto CAPES / COFECUB 685/10, intitulado "Abordagens bioquímicas e moleculares para compreender os mecanismos de adaptação das plantas ao estresse abiótico", que envolve também a UMR Bioemco,

equipe Ibios da Universidade de Paris Est-Créteil. Além do estudo dos aspectos moleculares e bioquímicos das proteínas desacopladoras mitocondriais e plastidiais, o projeto visa estudar a composição lipídica de membranas de células foliares, dentre os lipídios estudados, alguns são conhecidos como sendo organelo-específicos e podem estar envolvidos na regulação da expressão de genes ao mesmo tempo que podem regular a atividade de proteínas membranares, como as proteínas desacopladoras aqui estudadas (AOX, pUCP e PTOX). O material de estudo usado para este projeto é *Vigna unguiculata*, com o objetivo de trabalhar em cultivares que diferem na tolerância à seca estresse e/ou ozônio.

- Meu trabalho de tese foi orientado em direção de uma primeira caracterização fisiológica de dois cultivares de *Vigna unguiculata* EPACE e 1183, conhecidos por apresentarem diferentes graus de tolerância a seca (travaux de Torres-Franklin et al., (2007)) mas sem nenhuma caracterização prévia da tolerância ao ozônio nem para a combinação dos dois estresses.
- Neste manuscrito, depois de uma primeira parte que apresentará a abordagem experimental usada no meu trabalho, encontra-se o primeiro capítulo da minha tese (artigo em preparação) que apresenta os parâmetros fisiológicos e bioquímicos analisados nas folhas dos dois cultivares, o que nos permitiu caracterizar possíveis diferenças na sensibilidade aos estresses estudados (ozônio, seca e a combinação dos dois estresses).
- O segundo capítulo é um manuscrito dedicado à regulação das enzimas desacopladora dos plastídios (PTOX) e das mitocôndrias (AOX e PUCP) nas folhas de *Vigna unguiculata*, cultivar EPACE, face aos estresses aplicados. Para cada uma destas condições de estresse, foram monitorando os níveis de transcritos (PCR em tempo real) e a atividade fotossintética das folhas (fluorescência da clorofila).

Este trabalho é uma contribuição importante para a melhor compreensão dos mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos, e poderão permitir a identificação de variedades mais tolerantes ao stress ambiental, particularmente à seca, ozono e uma combinação de ambos os estresses.

ESTADO DA ARTE

2- ESTADO DA ARTE

2.1- O Caupi

A espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp é comumente conhecida como feijão-caupi. Esta é uma eudicotiledônia que pertence a ordem Fabales, família Fabaceae, anteriormente conhecido como legumes. O gênero *Vigna* é composta por mais de 200 espécies, nativa de regiões quentes e presente em todos os continentes (Fery, 2002). A localização exata do centro de origem do caupi é muito difícil de determinar. Com base nas variações morfológicas e genéticas, em termos do número e distribuição geográfica de cultivares selvagem e as suas características primitivas, aceita-se que os cultivares mais primitivos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp selvagem apareceram na África Austral. Da África Austral o caupi migrou para outras partes da África, Europa e Índia e foi importado para América tropical em torno dos 1700 anos pelos espanhóis com o tráfico de escravos (Singh & Tarawali, 1997).

As leguminosas contêm quantidades relativamente grandes de proteínas, vitaminas e minerais e são a principal fonte de proteína para muitas pessoas ao redor do mundo, por razões culturais e econômicas. A composição da semente varia com as condições da região, com o cultivar e com o solo e as características climáticas (Iqbal, Khalil, Ateeq, & Sayyar Khan, 2006). A espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp é uma excelente fonte de proteína (23-25%, em média), que contém todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62%), vitaminas, minerais, fibra dietética e uma pequena quantidade de gordura mas sem colesterol. Portanto, o caupi é um alimento de base para populações de baixa renda no Nordeste do Brasil (Andrade-Júnior et al., 2002). O Caupi também é essencial para apoiar a produção de gado e cereais em regiões semi-áridas, servindo de forragem, proteção contra a erosão e a

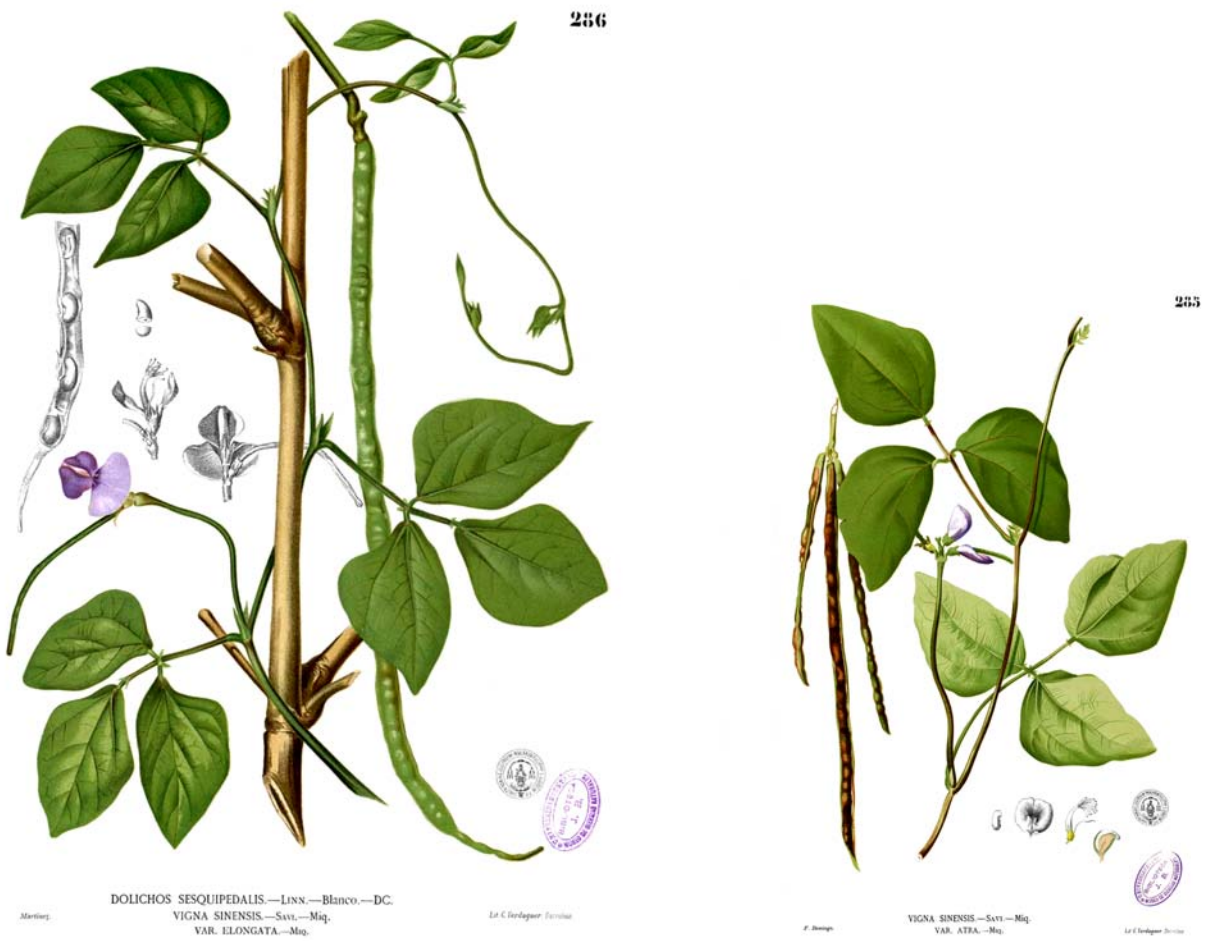


Figura 1. Pranchas botânicas representando *Vigna unguiculata* (L.) Walp (Fabácea), anteriormente chamada de *Vigna sinensis*.

eliminação de algumas plantas parasitas. Outra característica importante desta espécie é promover a fixação de nitrogênio pelas bactérias simbióticas (*Bradyrhizobium* sp.). A produção de caupi prova-se capaz de manter as reservas de nitrogênio no solo e até mesmo aumentar (Singh & Tarawali, 1997).

A área plantada com feijão-caupi no mundo é de cerca de 12,5 milhões de hectares, com 8 milhões (64% do total mundial) na África Ocidental e Central. Outras partes do mundo, onde caupi está fortemente presente, estão localizados na América do Sul, América Central e Ásia, com áreas também no sudoeste da Europa, o sudoeste dos Estados Unidos e Oceania. Entre todos os países, os principais produtores são Nigéria, Niger e Brasil (Quin, 1997). No Brasil, o feijão-caupi é cultivado principalmente na região do semi-árido nordestino e em pequenas áreas da Amazônia. Os principais produtores de feijão-caupi são os estados do Ceará (159.471 t), Piauí (58.786 t), Bahia (50.249 t) e Maranhão (35.213 t), que também tem a maior área plantada (IBGE, 2001).

Apesar de ser considerada uma cultura tolerante a seca, a pesquisa mostrou que o aparecimento de um déficit de água durante a cultura do caupi, especialmente em períodos de floração e enchimento dos grãos, pode diminuir fortemente a produção de grãos. O estresse hídrico reduz também o peso de nódulos, a quantidade de nitrogênio acumulado, a produção de nitrogênio e produção de matéria seca das plantas de feijão-caupi, especialmente quando o estresse hídrico é imposto entre a segunda e a quinta semana após a semeadura (Stanford, Santos, Silva, Santos, & Monteiro, 1990). Em um estudo baseado no efluxo de solutos de discos de folhas tratadas com PEG *Vigna unguiculata* foi mais tolerante do que outras espécies de feijão (Vasquez-Tello, Zuily-Fodil, Pham-Thi, & Vieira da Silva, 1990). Ainda nessa linha de investigação El Maarouf et al. (1999) caracterizaram cv. Epace como mais tolerante do que cultivar cv. 1183 ao estresse hídrico (PEG). Vis-à-vis as respostas à fumigação de ozônio as respostas do caupi



Figura 2. Fotografia de plantas de *Vigna unguiculata* no campo.

não são conhecidos. Alguns trabalhos de *Glycine max*, uma espécie suficientemente próxima de *Vigna unguiculata* mostrou a sensibilidade dessas Fabaceae ao ozônio em comparação com outras culturas (Mills et al., 2011; Mills, Buse, Gimeno, Bermejo, & Holland, 2007).

Recursos moleculares, de genética e genômica, têm sido desenvolvidos para caupi com o objetivo de fortalecer os programas de melhoramento genético para o melhoramento de variedades de caupi nos Estados Unidos, Índia, Brasil e em muitos países da África e Ásia (Pottorff et al., 2012). No entanto, até agora, pouca atenção tem sido dada à caracterização genética e desenvolvimento de recursos genéticos para caupi. Atualmente, menos de 1000 EST de caupi foram depositadas em bancos de dados públicos e a maioria das sequências de DNA gnômico disponíveis estão diretamente relacionados com o mRNA e sequências não codantes ou sequências não caracterizadas encontradas através de RFLP (polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição). O tamanho do seu genoma é de apenas 620 MB, um dos menores entre as plantas que o coloca no final (o menor tamanho) dos genomas das plantas (Paterson, 2006; Timko et al., 2008).

Dentre os principais objetivos relacionados com a seleção do caupi, bem como programas para melhorá-lo, é a sobreposição de características agronômicas desejáveis, tais como tolerância a estresses abióticos (seca, salinidade, calor e recentemente poluentes do ar), o tipo de crescimento de plantas e sementes de qualidade, bem como a sua resistência a muitas infecções bacterianas, doenças fúngicas e virais, insetos, invertebrados (nemátodes) e pragas de herbívoros. O uso de seleção assistida por marcadores e outros meios de melhoramento molecular para monitorar características monogênicas deverá em um futuro próximo aumentar a eficácia dos programas de melhoramento do caupi, bem como proporcionar novas oportunidades para o desenvolvimento de caupi como um alimento básico tanto quanto dar suporte à agricultura de subsistência.

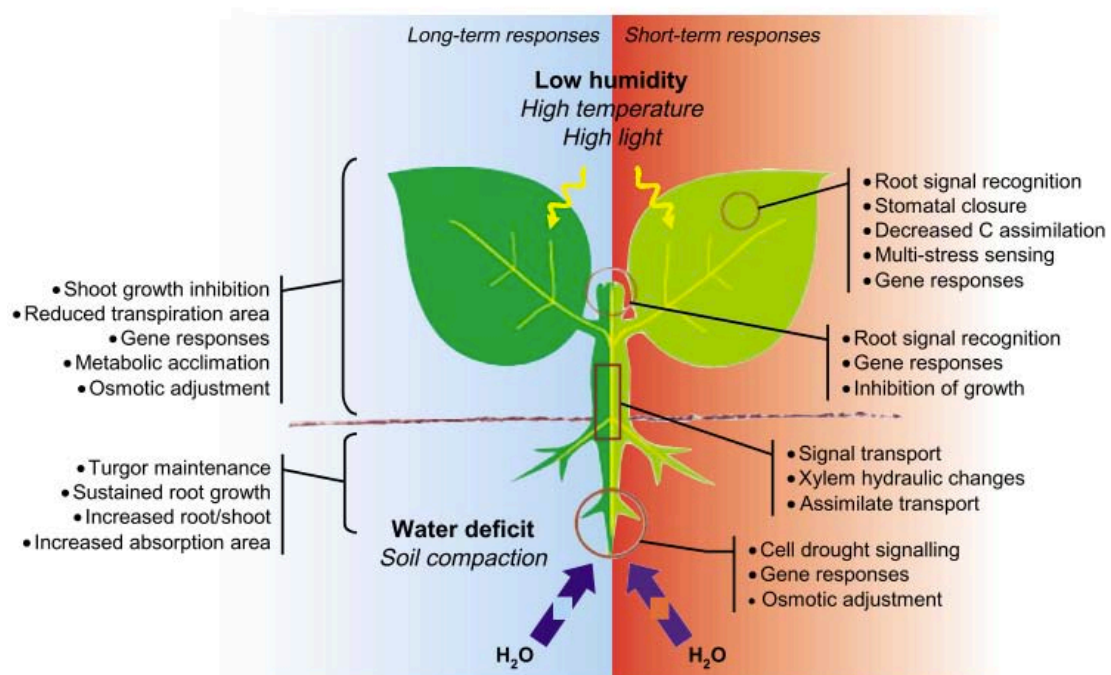


Figura 3. Mecanismo de respostas das plantas à seca. Esquerda, respostas de longo termo ou aclimatação; direita, respostas de curto termo.

De acordo com Chaves, Maroco, & Pereira (2003)

2.2- Os estresses abióticos

Quando as plantas são sujeitas a condições que alteram a homeostase celular, elas são consideradas sob estresse. O estresse da planta pode afetar o crescimento e a sobrevivência das plantas e produtividade das culturas. Pesquisas para entender como o calor, secas, enchentes, falta de nutrientes, herbicidas, pesticidas, produtos químicos, poluição do ar, pH, doenças, herbívoros, metais pesados e nível de luz podem afetar o crescimento e desenvolvimento da planta, têm sido muito importantes nas últimas décadas (Baker & Rosenquist, 2004; Maxwell & Johnson, 2000). Para abordar este e outros desafios, tais como segurança alimentar de populações e a crescente competição por recursos naturais, existe uma real necessidade de uma nova "revolução agrícola" para abastecer a população mundial, que deverá aumentar de 7-10 bilhões de pessoas (nas próximas duas décadas), com a necessidade de aumentar a produção de alimentos em 50-70% (Reynolds & Ortiz, 2010).

Plantas evoluíram para viver em ambientes onde elas são muitas vezes expostas a uma combinação de tensões. Sendo sésseis, desenvolveram mecanismos específicos que lhes permitem detectar alterações ambientais específicas e responder aos estresses complexos do meio ambiente, tentando minimizar os danos. Assim, elas podem economizar recursos significativos para o seu crescimento e reprodução (Atkinson & Urwin, 2012). Uma das características mais importantes das células vegetais é a sua capacidade de responder às mudanças no seu ambiente. Compreender as ligações entre as respostas iniciais da planta e os eventos seguintes que levaram ao sucesso de sua adaptação ao ambiente alterado é um grande desafio em biologia vegetal. A maioria das plantas são cultivadas em

condições abaixo do ideal, o que impede as plantas de alcançar seu potencial genético para o crescimento e reprodução (Rockström & Falkenmark, 2000).

De toda forma, o declínio da produção agrícola em diferentes culturas pode ser associado com o efeito do estresse abiótico que terá consequências importantes para a limitação da fixação do CO₂ e consecutivo fechamento dos estômatos. Este fechamento devido à seca ou por causa de poluentes do ar, promove a danos induzidos pela luz em excesso (danos fotooxidante ligado a um desequilíbrio entre as reações fotoquímicas e bioquímicas, sendo estas últimas limitadas pela diminuição da entrada de CO₂). Assim, as plantas desenvolveram diversos mecanismos, tais como moléculas fotoprotetoras e enzimas antioxidantes (Niyogi, 2000). O stress oxidativo a partir de fontes ambientais e nas transições de desenvolvimento, tais como a maturação da semente, resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células vegetais (Greene, 2002).

Por outro lado, a poluição pelo ozônio, que conduz rapidamente a um aumento da carga celular oxidativa é sempre comparado com os efeitos tóxicos de outros fatores de stress, tais como seca, salinidade e luz. Em geral, os estresses ambientais promovem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como oxigênio singlete, íon superóxido (O²⁻), radical hidroxila (OH[·]), além do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Estes radicais são normalmente gerados continuamente, principalmente como um subproduto da fotossíntese, da produção de energia ou de transferência de elétrons de componentes associados com o PSI e o PSII ou por reações relacionadas com também a respiração através de vazamento de elétrons através de vários dos complexos da cadeia respiratória (Mittler, 2002). Graças à presença de numerosos sistemas antioxidantes, a célula é capaz de manter a homeostase celular e de conter a carga oxidante. Condições de stresses, enfraquecendo as estruturas de membrana, aumentam a produção de ROS, que podem ou não ser contida pelas células, ajustando a sua capacidade antioxidante. A

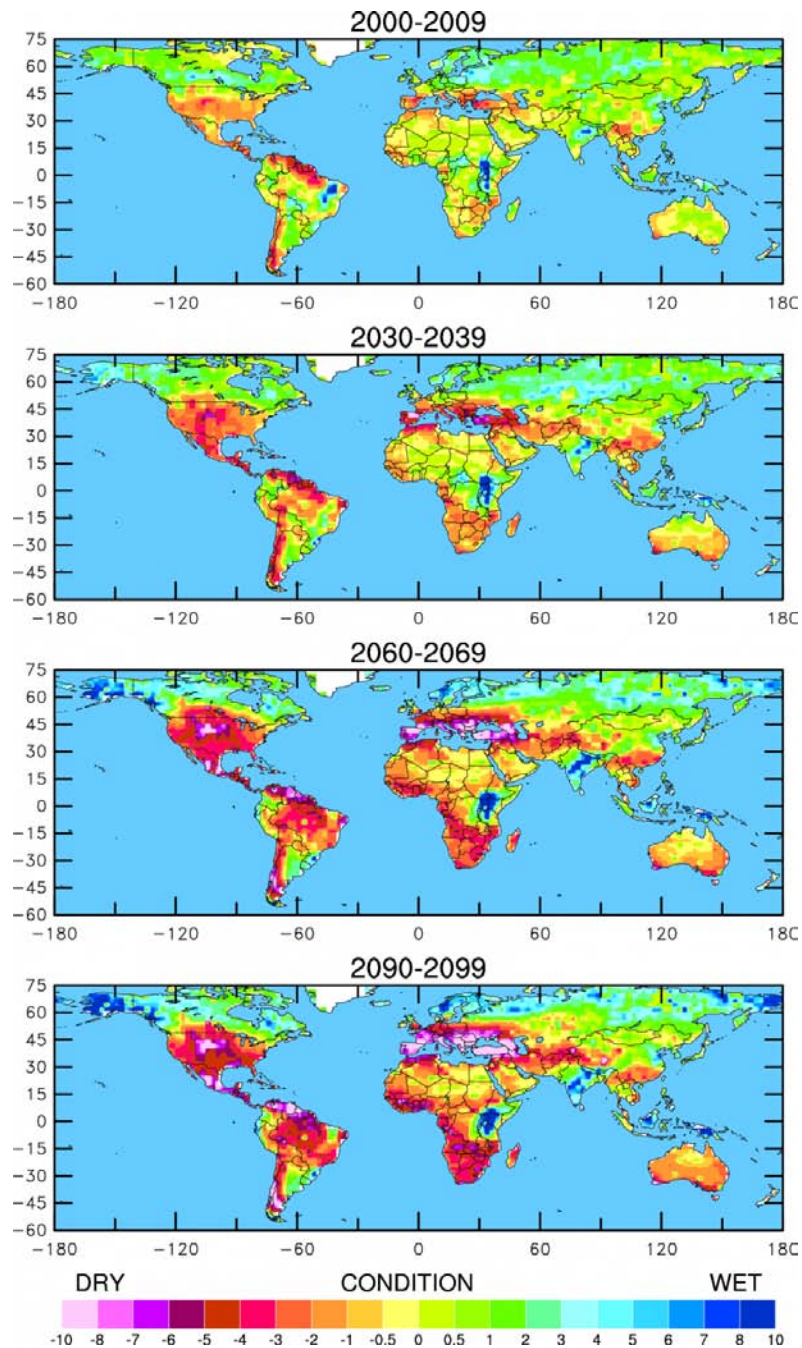


Figura 4. Mapas que mostram a previsão de seca global para os próximos cem anos. Estes quatro mapas ilustram a seca atual e o potencial de sacas futuras no mundo ao longo das décadas indicadas, com base nas projeções atuais e futuras emissões de gases de efeito estufa. Foram usadas a legenda de índice de Severidade de Seca de Palmer, que coloca números positivos quando as condições são excepcionalmente úmidas para uma determinada região, e os números negativos quando as condições são anormalmente secas.

De acordo com Dai (2010)

incapacidade para conter a carga oxidativa, leva ROS à reagir com a maioria das macromoléculas, tais como DNA, lipídios e proteínas, provocando danos celulares (Asada, 1999)(Li, Vallabhaneni, Yu, Rocheford, & Wurtzel, 2008). O estresse oxidativo é então o "centro" de muitos estresses abióticos.

2.2.1- A seca

A seca é um fenômeno climático "que é definido pela falta de água no solo", caracterizado pela escassez de água. Este é um dos fatores ambientais mais importantes que limitam o crescimento e desenvolvimento das plantas, e, por conseguinte, a sua produção. O interesse no entendimento da resistência à seca, nos seus aspectos fundamentais, aumentou recentemente. As preocupações com as mudanças climáticas e escassez de água na agricultura são razões importantes para a expansão deste campo de pesquisa. A crescente demanda mundial por alimentos, enquanto os recursos hídricos para a agricultura diminuem, requer que a produtividade das terras secas seja aumentada (Blum, 2011).

Muito rapidamente, a seca edáfica leva à combinação de estresses tais como a falta de uma forte pressão de vapor de água nas folhas, muitas vezes está associada com a incidência concomitante de altas temperaturas, alta luminosidade (radiação fotossinteticamente ativa), a redução na disponibilidade de nutrientes do solo e impedância mecânica ao crescimento das raízes num solo endurecido (Wilkinson & Davies, 2010). No entanto, algumas espécies podem tolerar ou evitar a seca. Mecanismos incluem: (1) o fechamento dos estômatos, (2) a diminuição da taxa de crescimento das folhas e do caule (3) regulação da velocidade de crescimento das raízes (Munns & Sharp, 1993) e/ou (4) aumento da condutância hidráulica das raízes e do caule (Hose, Steudle, & Hartung, 2000; Parent et al., 2009;

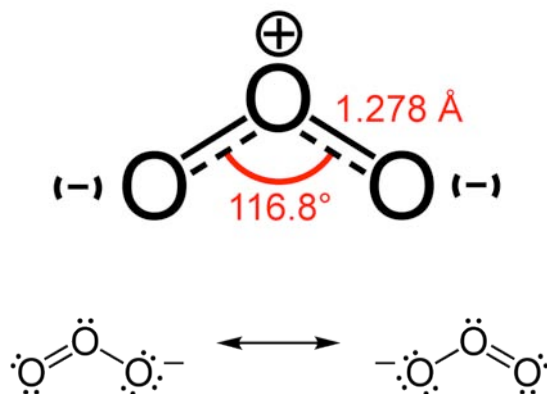


Figura 5. Representação esquemática da molécula de ozônio (O₃) e seus possíveis dipolos.

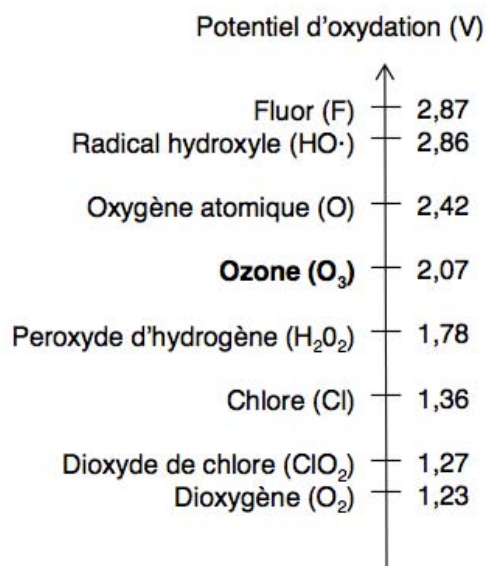


Figura 6. Potenciais de oxidação de diversos compostos oxidantes.

Wilkinson & Davies, 2010). Estes processos físico-químicos exigem o estabelecimento de uma série de mecanismos moleculares e celulares sob o controle de múltiplos sinais (Abdeen, Schnell, & Miki, 2010; Bohnert & Jensen, 1996). Sobrevivência em condições de stress depende da capacidade das plantas de perceber o estímulo, gerar e transmitir sinais, e também para promover várias alterações fisiológicas e químicas (Jiang & Zhang, 2002; Urao, Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2000). Para responder ao estresse hídrico, as plantas desenvolveram a habilidade de perceber rapidamente o estresse, provocando o acúmulo de um grande número de novos mRNA e polipeptídeos recém sintetizados (Ingram & Bartels, 1996; Urao et al., 1999, 2000). Reorganização rápida do genoma, em situações de stress ambiental tem sido claramente documentada e a expressão de muitos genes em resposta à seca também já foi amplamente descrita (Caruso et al., 2008).

Entre as culturas, feijão-caupi apresenta grande diversidade na morfologia da planta, na maturação das sementes, sendo também adaptado à uma ampla gama de ambientes. Na verdade, o caupi pode servir de leguminosa modelo. Caupi tem diferentes adaptações à seca. Entre os mecanismos comumente encontrados para esta espécie, há o evitamento com a redução da área foliar para evitar a desidratação e também a tolerância através do estabelecimento de um estágio vegetativo com o retardamento da senescência foliar (Hall, 2004). As plantas de caupi escapam da desidratação através da manutenção de um potencial hídrico alto nas folha sem ajuste osmótico. Isto foi demonstrado como sendo uma resposta comum do processo fotossintético em resposta à seca, em relação ao teor de água do solo ou de mudanças na condutância estomática independentes potencial osmótico da folha (Singh & Raja Reddy, 2011).

Regulação estomática desempenha um papel fundamental na troca de gases entre a folha e o ambiente. Noventa por cento da perda de água nas plantas é

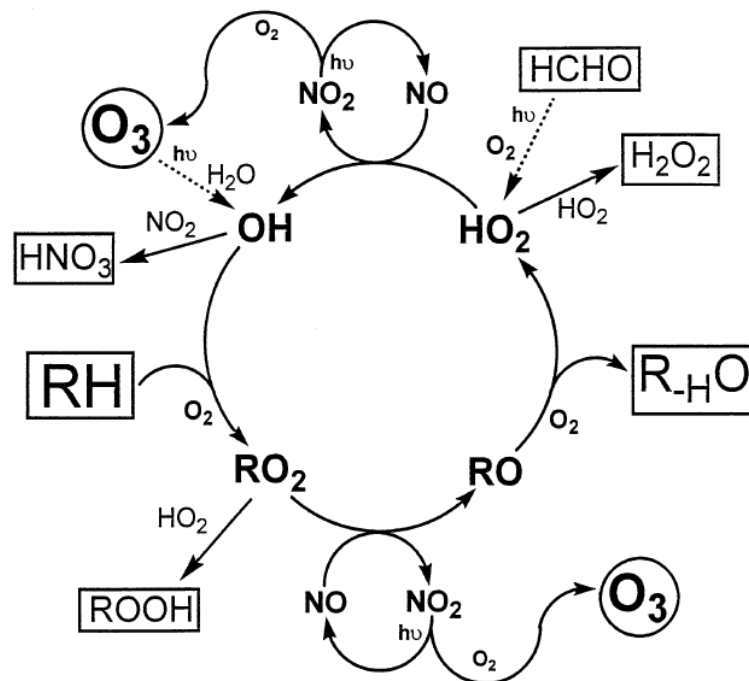


Figura 7. Ciclo do ozônio troposférico.

De acordo com Jenkin & Clemitshaw (2000)

devido à transpiração através das aberturas estomática. No entanto, a limitação da condutância estomática seria reconhecido como o principal fator na redução da fotossíntese, quando a água se torna indisponível. Ela é responsável pela menor disponibilidade de CO₂ no cloroplasto que aumenta as limitações não relacionados à condutância tal como a diminuição progressiva da atividade de RuBisCO e eficiência fotoquímica de FSII à medida que aumentam a intensidade e duração do stress hídrico (Xu, Zhou, & Shimizu, 2010).

2.2.2- O ozônio

O ozônio é um constituinte menor da atmosfera, representa entre 0-0,07 ppm (partes por milhão em volume) de acordo com a altitude. Ao contrário da maior parte do conteúdo de constituintes atmosféricos, tais como o oxigênio ou o nitrogênio, o conteúdo de ozônio atmosférico não diminui de forma constante, com a altitude é contrariamente a concentração de ozônio é maior na estratosfera, em camadas entre 20 e 30 km de altitude. Esta parte da estratosfera, em que se concentra 90% do ozônio atmosférico é comumente chamado de camada de ozônio. A radiação solar cria a camada de ozônio na estratosfera, que absorve uma fração de alta energia desta radiação (UV-B). Este processo tanto aquece a atmosfera como protege a atividade biológica sobre a superfície da terra de radiações nocivas. Ao longo dos últimos 50 anos, os mecanismos químicos, que estão envolvidos na formação da camada de ozono estratosférico tem sido compreendidos, incluindo as reações catalíticas que envolvem as espécies químicas, tais como: OH, HO₂, NO, NO₂, Cl et ClO (Rowland, 2006).

A troposfera, que consiste das camadas inferiores da atmosfera, se estende desde a superfície terrestre até a tropopausa, que é o ponto em que a temperatura

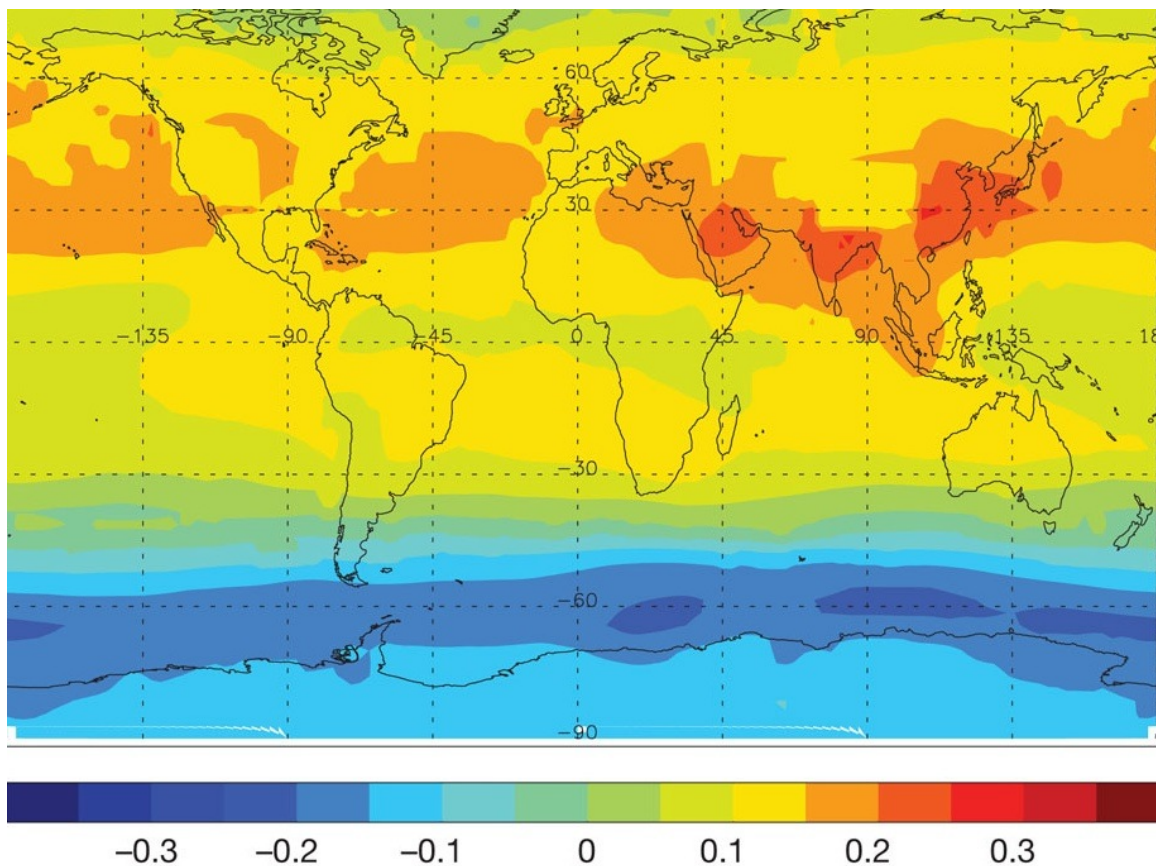


Figura 8. Mapa apresentando a variação média anual (1970-2009) das concentrações de ozônio na troposfera em ppbv por ano.

De acordo com Allen, Sherwood, Norris, & Zender (2012)

começa a diminuir com a altitude. A espessura da troposfera varia entre 13 e 16 km no equador, e entre 7 e 8 km nos polos. Na troposfera concentram-se os fenômenos meteorológicos, o fluxo de ar e substancialmente toda a massa de vapor de água da atmosfera, mas contém apenas 10% de ozônio da atmosfera. A troca vertical entre estratosfera e troposfera tem contribuição marginal nos níveis de ozônio na troposfera, a principal fonte é produção através de um reações fotoquímicas seriadas (Jenkin & Clemitshaw, 2000). Na troposfera, o ozônio age como um gás de efeito estufa além de ter um impacto negativo sobre os ecossistemas terrestres. O nível global de ozônio aumentou gradualmente ao longo do século passado, devido ao aumento das emissões de precursores fotoquímica de origem antrópica (Bagard et al., 2008; Dizengremel, Le Thiec, Bagard, & Jolivet, 2008; Simmonds, Derwent, Manning, & Spain, 2004).

Deixando de lado a intervenção dos compostos resultantes de atividades humanas, o ozônio pode ser formado na troposfera, da mesma forma como na estratosfera a partir da dissociação de moléculas de oxigênio, sob a influência dos raios UV. Esta reação é limitada pela intensidade relativamente baixa de radiação UV na troposfera e o ozônio produzido reforma o oxigênio suficientemente rápido, evitando assim o acúmulo de ozônio na troposfera. Assim a intervenção de compostos orgânicos voláteis emitidos pela vegetação terrestre pode promover um acúmulo limitado de ozônio "natural" (Lee & Wang, 2006). O desenvolvimento da indústria e do transporte alterou significativamente o ciclo de ozônio troposférico. As atividades humanas produzem grandes quantidades de óxidos de nitrogênio (Lee et al., 1997) que, sob o efeito da radiação UV, podem liberar átomos de oxigênio. Os átomos de oxigênio se combinam com o oxigênio do ar para formar ozônio, que reage novamente com o óxido nítrico, o que limita assim a sua acumulação. Em teoria, a quantidade de ozônio na troposfera deverá resultar do equilíbrio fotoquímico determinado pela relação entre NO e NO₂ e a intensidade da

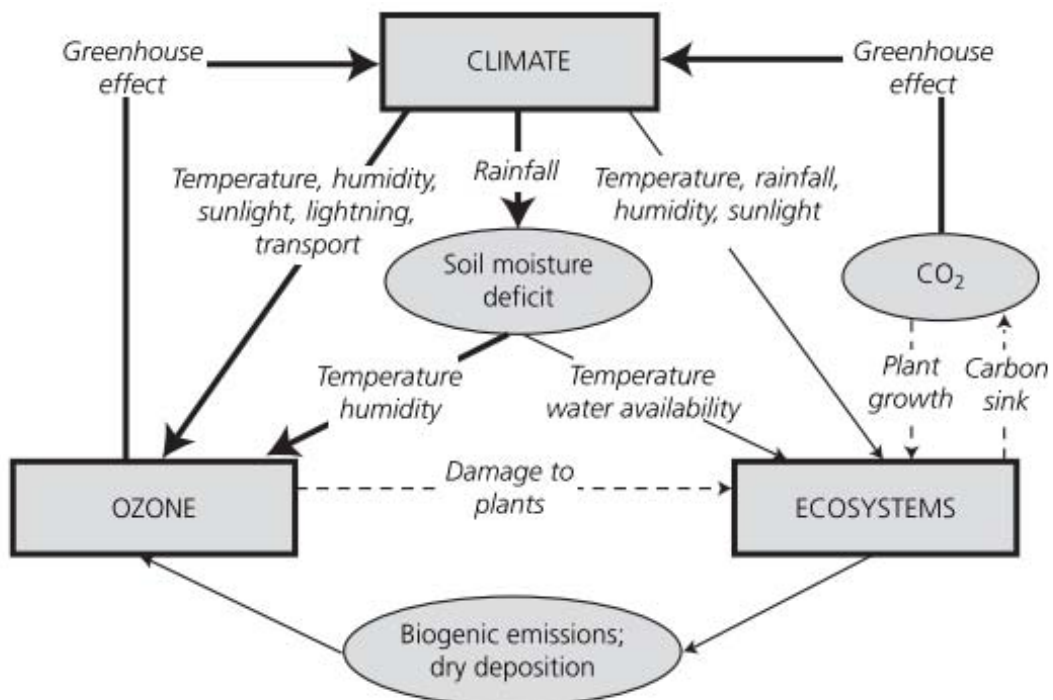


Figura 9. Representação esquemática das interações entre o clima, os ecossistemas e o ozônio troposférico. As linhas grossas cheias indicam os processos que são geralmente bem conhecidos e representados nos modelos de química-clima. Linhas finas indicam processos onde ainda existem incertezas e são apenas parcialmente representadas nos modelos. As linhas pontilhadas correspondem aos novos links que geralmente são importantes, mas não incluídas nas projeções do modelo.

De acordo com Ground-level ozone in the 21st century: future trends, impacts and policy implications (2008).

radiação solar, mas os níveis medidos na troposfera excedem os valores previstos pelo modelo simples. Em uma atmosfera poluída, existem muitos compostos envolvidos no ciclo de formação de ozônio troposférico (Jenkin & Clemitshaw, 2000). Estes compostos são principalmente hidrocarbonetos em fase gasosa, conhecidos coletivamente como compostos orgânicos voláteis (VOCs). Através da combinação preferencialmente, com óxido nítrico, estes compostos tornam possível a acumulação de ozônio. Além disso, eles não são uma fonte de NO derivado da degradação do ozônio, o que desequilibra ainda mais o sistema a favor da formação de ozônio.

O ozônio é conhecido por ser um poluente do ar que é altamente fitotóxico, causando danos visíveis nas folhas (lesões necróticas e cloróticas), diminuição do crescimento, perda de produtividade e pode, eventualmente, levar à morte da planta. Mas é importante notar que a exposição crônica ao ozono (baixas concentrações aplicada durante um longo período de tempo de ozono) afeta os processos fisiológicos e bioquímicos, tais como a diminuição da fotossíntese, antes do desenvolvimento qualquer dano visível (Dizengremel, 2001; Dizengremel et al., 2008; Heath & Taylor, 1997).

2.3- A detoxificação

Ozônio, assim como outros tipos de stress abiótico pode induzir a síntese e/ou a ativação de vários sistemas de detoxificação de ROS, que incluem metabolitos antioxidantes (ácido ascórbico, glutathione, fenóis, flavonoides,...) e diversas enzimas, incluindo principalmente peroxidase (Cruz de Carvalho, 2008; Kangasjärvi, Jaspers, & Kollist, 2005; Wilkinson & Davies, 2010). Entre as ROS, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), molécula não carregada e estável é capaz de se espalhar rapidamente através das membranas celulares (Bienert et al., 2007).

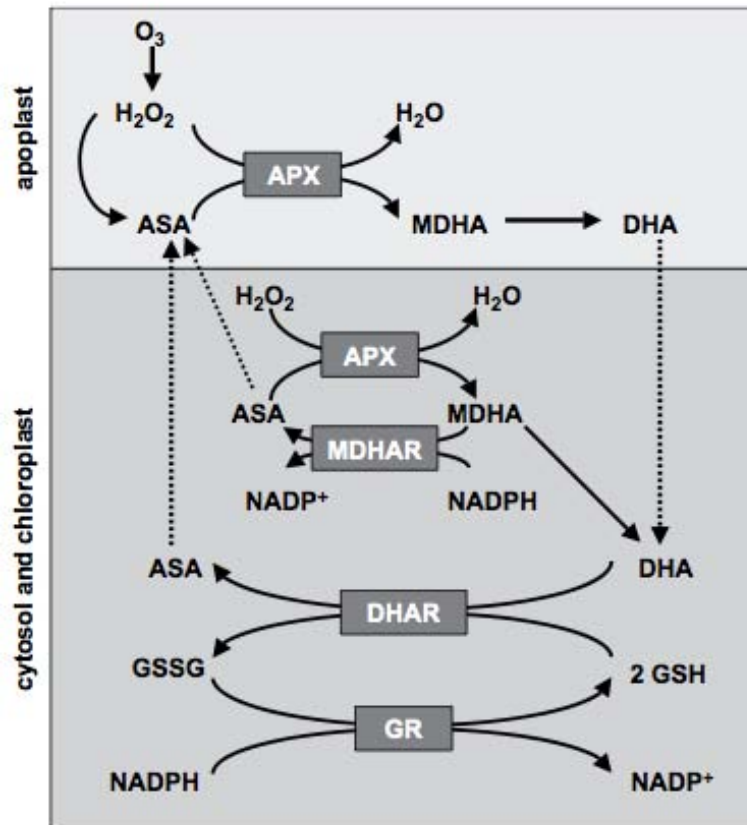


Figura 10. Reações de oxido-redução do ascorbato no apoplasto e simplasto de uma célula vegetal exposta ao ozono.

Ascorbato reduzido (ASA), oxidado diretamente pelos ROS induzidos pelo ozônio ou indiretamente oxidado pelas reações ligadas à peroxidase do ascorbato (APX) dependentes da captura do H_2O_2 , sendo reciclada na forma reduzida pelo ciclo ascorbato-glutationa, ou ciclo de Halliwell-Asada-Foyer. APX, peroxidase do ascorbato; ASA, ascorbato reduzido; DHA, dehidroascorbato; DHAR, redutase do dehidroascorbato; GR, redutase da glutatona; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; MDA, monodehidroascorbato; MDAR, redutase do monodehidroascorbade.

De acordo com Castagna & Ranieri (2009).

Portanto, H_2O_2 é considerado também como sendo uma molécula de sinalização (Bienert et al., 2007) acionando defesas antioxidantes (Dizengremel et al., 2008) ou ativando a morte celular programada, quando ele se encontra acumulado nos tecidos (Rao & Davis, 2001).

Dentre as enzimas capazes de reduzir o H_2O_2 estão catalases, várias peroxidases, além das peroxiredoxinas (Dietz, 2003). No entanto, um dos principais mecanismos de detoxificação de ROS gerada por condições de estresse em plantas é o ciclo Halliwell-Asada-Foyer ou ciclo ascorbato-glutationa (Asada, 1999; Foyer & Noctor, 2011). Assim, o H_2O_2 produzido espontaneamente a partir da molécula de O_3 ou como um subproduto da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), é então transformado em água através da enzima ascorbato peroxidase e oxigênio. O ciclo de ascorbato-glutationa, que também neutraliza ions superóxido e envolve a participação de várias enzimas, incluindo: ascorbato peroxidase (APX), a redutase dehidroascorbato (DHAR), redutase monodehidroascorbate (MDHAR) e glutaciona redutase (GR). A maioria das enzimas de ciclo-ascorbato glutaciona estão presentes em diferentes compartimentos celulares: como o citossol, os cloroplastos, as mitocôndrias e também nos peroxissomos (Jiménez, Hernandez, Del Rio, & Sevilla, 1997).

Vários estudos têm demonstrado que as reações redox envolvendo ácido ascórbico são cruciais para aumentar a tolerância das plantas a estresses ambientais, incluindo ozônio (Conklin & Barth, 2004; Dafré-Martinelli, Nakazato, Dias, Rinaldi, & Domingos, 2011). O envolvimento do ascorbato não seriam necessariamente relacionado com o estado redox da glutaciona (Dafré-Martinelli et al., 2011). O papel antioxidante ascorbato é estritamente dependente da capacidade da célula para mantê-lo num estado reduzido. Isto ocorre por meio de duas reações catalisadas pela monodehidroascorbate redutase (MDHAR) ou dehidroascorbato redutase (DHAR), respectivamente, com a utilizando de glutaciona reduzida (GSH) e

NADPH. A glutathione é um poderoso antioxidante que por sua vez é regenerado pela glutathione redutase (GR) à custa da oxidação do NADPH. Todas estas reações mostram a importância da regeneração do poder redutor em diferentes compartimentos celulares para alimentar o funcionamento do ciclo de ascorbato-glutathione.

2.4- O metabolismo energético

Fotossíntese e respiração são os principais processos bioenergéticos que coexistem nas células das folhas das plantas. O estudo do metabolismo energético é de fundamental importância na compreensão dos mecanismos de adaptação das plantas a condições adversas.

Entre as várias proteínas de membrana da célula vegetal, três foram objeto de uma atenção especial: a oxidase alternativa (AOX), a proteína desacopladora de plantas (pUCP) e oxidase plastidial (PTOX). As duas primeiras estão localizadas na membrana interna de mitocôndrias, enquanto a PTOX está localizada na membrana tilacoidal.

2.4.1- A mitocôndria

As mitocôndrias são a principal fonte de produção de energia intracelular, e representa a resposta evolutiva para o principal problema que enfrentam os organismos vivos, a obtenção de energia a partir do ambiente para satisfazer as suas funções biológicas (Hughes & Criscuolo, 2008). Esta produção de energia está associada com a oxidação de compostos orgânicos, tais como lipídios e

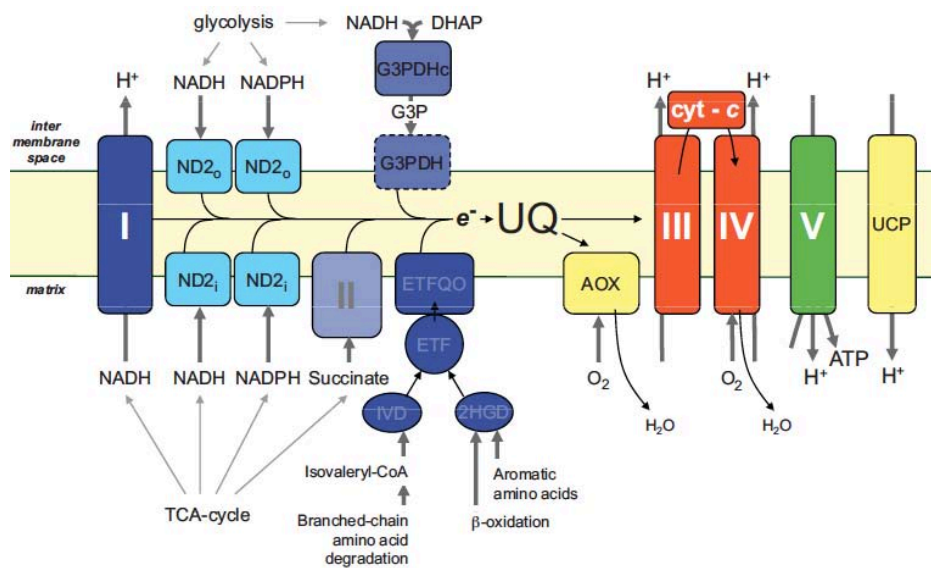


Figura 11. Representação esquemática da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

Complexes I - V: Desidrogenase do NADH, desidrogenase do succinato, redutase do citocromo c, oxidase do citocromo c, sintase do ATP, respectivamente. 2HGD: desidrogenase do hidroxiglutarate; AOX: oxidase alternativa, cyt c: citocromo c; UCP: proteína desacopladora de plantas. ND2_o: desidrogenase do NAD(P)H do tipo II, situada na face externa da membrana interna; ND2_i: desidrogenase do NAD(P)H do tipo II, situada do lado matricial da membrana interna; G3P: glicerato-3-fosfato; G3PDH: desidrogenase do gliceraldeido-3-fosfato; IVD: desidrogenase do isovenil; UQ: ubiquinona.

De acordo com Dongen et al (2011)

carboidratos, com a liberação de CO₂ e consumo de O₂. Ela está relacionada com a utilização de uma cadeia de transporte de elétrons (ETC) localizado na membrana interna da mitocôndria. A ECT está acoplando ao transporte de elétrons ao bombeamento de prótons para o espaço intermembranar gerando deste modo um gradiente electroquímico ($\Delta\mu\text{H}^+$) utilizado para produzir ATP pela ATP sintase (Azzu, Jastroch, Divakaruni, & Brand, 2010; Dietrich & Horvath, 2010; Mailloux & Harper, 2011). Este processo é denominado fosforilação oxidativa, e requer a impermeabilidade da membrana mitocondrial interna aos prótons (Mitchell, 1961).

A cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias de planta exhibe uma notável plasticidade para o fluxo de elétrons a partir de um substrato. A oxidação do NADH pode ocorrer através do complexo 1, o qual proporciona também a transferência de prótons de um lado ao outro da membrana, ou por meio de NAD(P)H-desidrogenase, localizados na face externa ou interna da membrana e insensível a rotenona. A oxidação do ubiquinol pode dirigir os elétrons para a via do citocromo, conectando assim o complexo 3 e a citocromo c oxidase via sensível ao cianeto. Além disso, os elétrons do ubiquinol podem também serem dirigidos para a oxidase alternativa (AOX), que não está acoplada a uma transferência de prótons (Lance, Chauveau, & Dizengremel, 1985; Moore & Siedow, 1991). Mais recentemente, a complexidade da cadeia respiratória mitocondrial de plantas aumentou com o descobrimento e uma proteína homóloga a proteína desacopladora mitocondrial (UCP) encontrada na mitocôndria de células animais, a qual tem o papel de permitir o retorno dos prótons do espaço intermembranar para matriz, ignorando o complexo ATP sintetase (Laloi, 1999; Vercesi et al., 1995).

2.4.1.1- A oxidase alternativa (AOX)

A oxidase alternativa, resistente ao cianeto (AOX), é uma proteína codificada

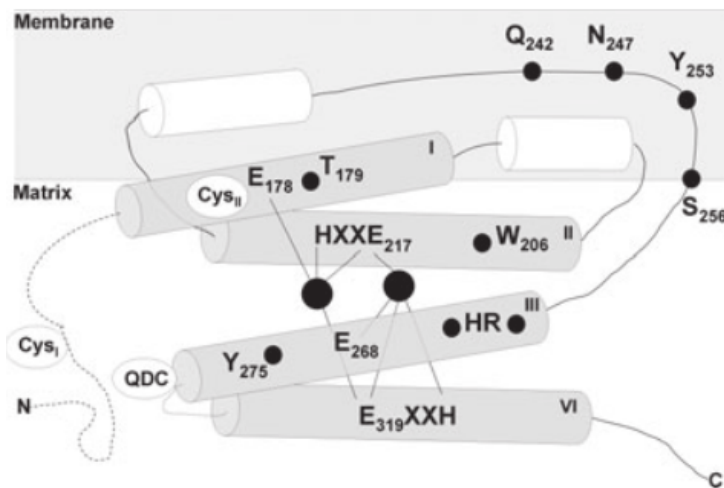


Figura 12. Estrutura tridimensional da oxidase alternativa de plantas (AOX).

Os cilindros cinza representam as quatro α -hélices voltadas para a matriz mitocondrial, círculos negros: os átomos de ferro e as linhas pontilhadas: áreas não modeladas até o presente. São indicadas também as posições aproximadas dos resíduos de cisteína conservados e os resíduos dos aminoácidos que formam o sítio de ligação ao ferro.

De acordo com Andersson et Nordlund (1999) e modificado por Berthold et al. (2000)

pelo genoma nuclear e localizada na membrana interna de mitocôndrias de todas as plantas superiores. Ela catalisa a reação de redução de oxigênio em H_2O e é insensível ao cianeto, o qual é inibidor do caminho do citocromo. Nas plantas, a AOX é um homodímero da proteína associada com o lado matricial da membrana interna. A distribuição de AOX não está limitado às plantas, ela também presentes em muitos fungos e protistas, incluindo organismos patogênicos, tais como *Trypanosoma brucei* (Chaudhuri & Hill, 1996), o *Cryptosporidium parvum* (Roberts et al., 2004; Suzuki et al., 2004) e o *Blastocystis hominis* (Stechmann et al., 2008). Homólogos da AOX foram também identificados nas α -protéobactérias (Atteia et al., 2004; Stenmark & Nordlund, 2003) e aparecem em uma ampla variedade de espécies animais (McDonald, 2008; McDonald & Vanlerberghe, 2006). Uma proteína homóloga da AOX está presente nos cloroplastos (oxidase terminal do plastídio (PTOX) e cianobactérias (Atteia et al., 2004).

Um dos papéis da AOX, relacionado com a sua descoberta, está associada com a polinização em um pequeno número de plantas da família Araceae, onde ela é responsável pela produção de calor e volatilização de substâncias atrativas para insetos (Lance et al., 1985; Meeuse, 1975; Wagner, Krab, Wagner, & Moore, 2008). A função de AOX nas plantas não-termogênicas, no entanto, continua a ser objeto de muita discussão, embora as funções propostas incluem a manutenção do funcionamento do ciclo de Krebs, em condições de stress (Mackenzie & McIntosh, 1999) e evitar o acúmulo de ROS que pode danificar os componentes celulares (D. P. Maxwell, Wang, & McIntosh, 1999; Purvis & Shewfelt, 1993; Wagner & Moore, 1997). Os primeiros trabalhos sobre o papel de AOX levou a conclusão de que o funcionamento *in vivo*, ocorreu apenas quando a via de citocromo estava saturada (Lambers, 1982). Mais recentemente, tem sido proposto um papel da AOX na homeostase do crescimento das plantas (Hansen et al., 2002) e a manutenção da flexibilidade metabólica para uma rápida adaptação aos estresses (Moore, Albury,

Crichton, & Affourtit, 2002). A AOX, tem sido proposta como um marcador eficiente para a reprogramação celular sob stress (Arnholdt-Schmitt, Costa, & Fernandes de Melo, 2006; Clifton, Millar, & Whelan, 2006).

A elucidação da estrutura da AOX tem sido atrapalhada pela dificuldade de purificação da proteínas para análise por técnicas espectroscópicas. Apesar destes obstáculos, a nossa compreensão de sua estrutura tem progredido consideravelmente desde o final de 1980 e é geralmente aceito que a AOX é membro da família de proteínas di-ferro, que tem como exemplos a metano monooxigenase (MMO), a subunidade R2 da ribonucleotídeo redutase (R2), a desaturase do stéaroil-acil ($\Delta 9$ -désaturase), a rubreritina, assim como as ferritinas e hemeritinas. Em cada uma destas proteínas, o sítio ativo está inserido nas quatro α -hélices. A maior parte destas proteínas contém dois motivos conservados EXXH com glutamato e os resíduos de histidina formando a ligação com os átomos de ferro. Os primeiros estudos Siedow e colaboradores levaram à definição de motivos de ligação com o ferro em um pequeno número de sequências de AOX disponíveis no momento e a propuseram um modelo estrutural da AOX em que a proteína contém um centro de tipo ponte ferro hidroxido-di-ferro residente no centro das quatro α -hélices, semelhante ao centro de ferro na MMO (Moore, Umbach, & Siedow, 1995; Siedow, Umbach, & Moore, 1995). Com as muitas sequências de cDNA da AOX, o modelo do centro ativo foi revisto e agora a proteína AOX é considerada uma proteína de membrana interfacial monotópica interagindo com uma única camada da bicamada lipídica das membranas (Andersson & Nordlund, 1999; Berthold, Andersson, & Nordlund, 2000).

Muito pouca informação está disponível sobre o mecanismo catalítico pelo qual a AOX reduz o oxigênio à água, bem como a ligação com substratos, ubiquinol e oxigênio no sítio ativo. Hipóteses mecanicista do funcionamento da AOX foram sugeridas por Affourtit et al. (2002) que propuseram quatro possíveis mecanismos

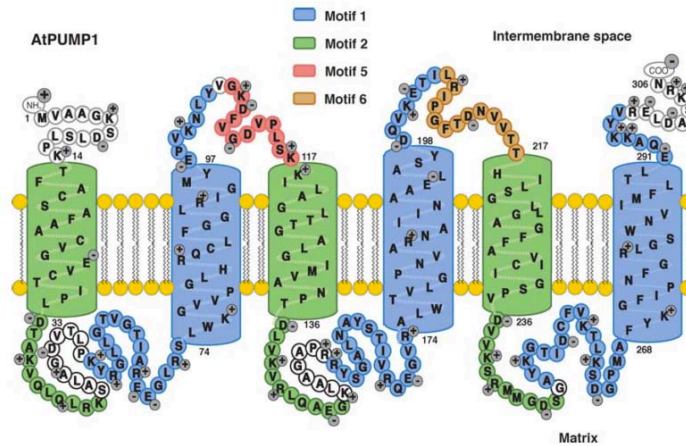


Figura 13. Diagrama mostrando os motivos conservados contidos na proteína AtPUMP1.

Os motivos 1 e 2 são comuns a todos os membros da subfamília de proteínas UCP. Motivos 5 e 6 são pUCP específico e são ambos expostos ao espaço intermembranar.

De acordo com Vercesi et al (2006)

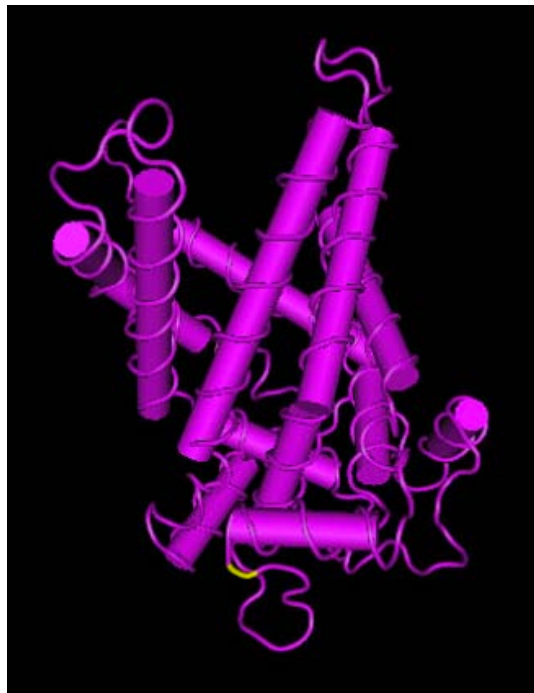


Figura 14. Representação tridimensional da pUCP de acordo com a estrutura 3D do transportador de ADP-ATP mitocondrial de bovino.

De acordo com Hughes & Criscuolo (2008)

catalíticos.

AOX é codificada pelo genoma nuclear e importada para as mitocôndrias (Tanudji, Sjöling, Glaser, & Whelan, 1999). Ela é codificado por uma pequena família multigênica de três a cinco membros, dependendo da espécie da planta e é regulada durante o desenvolvimento e em diferentes tecidos (Considine, Daley, & Whelan, 2001; Finnegan et al., 1997). Em *V. unguiculata*, AOX é codificado por uma pequena família de pelo menos três genes: *AOX1*, *2a* e *2b*. Estes três genes têm um perfil semelhante ao genes *AOX1* e *AOX2* de soja (Costa et al., 2010).

Considerando que os AOX pode ter um papel importante no controle da fuga de elétrons na membrana mitocondrial interna, que conduz a formação de ROS (D. P. Maxwell et al., 1999; Purvis, 1997; Yip & Vanlerberghe, 2001), esta atividade antioxidante pode ser altamente importante para evitar os danos causados pelos estresses abióticos como a seca e ozônio conhecidos por provocarem estresse oxidativo.

2.4.1.2- A proteína desacopladora de plantas (pUCP)

Ao estabelecer o gradiente de prótons no processo de oxidação de um substrato, o acoplamento com o processo de fosforilação oxidativa pode acontecer. Entretanto, os prótons pode retornar para a matriz mitocondrial por outras proteínas chamadas proteínas desacopladoras, também presentes na membrana mitocondrial interna (Divakaruni & Brand, 2011; Hourton-Cabassa, Rita Matos, Zachowski, & Moreau, 2004). Assim, as proteínas desacopladoras (UCPs) que orquestram a dissociação de transferência de elétrons e a síntese de ATP estão realmente envolvidos na regulação da fosforilação oxidativa (Vercesi et al., 2006). Conseqüentemente, o potencial da membrana é reduzida e a energia produzida

pela oxidação dos substratos é perdida na forma de calor. A UCP desempenha um papel fundamental no processo termogênico, como a manutenção da temperatura corporal em pequenos mamíferos, recém-nascidos, e mamíferos aclimatados à hibernação e ao frio (Borecký & Vercesi, 2005; Chien, Wu, & Chen, 2011; Hourton-Cabassa et al., 2004; Ito-Inaba, Hida, & Inaba, 2009; Nicholls & Rial, 1999; Vercesi et al., 2006). Os Trabalhos sobre a termogênese nos anos 50 e início dos anos 60 mostrou que não só a respiração fosforilante, mas também o desacoplamento da transferência de elétrons poderiam ter importância fisiológica (Skulachev, 1999). Na década de 1970, uma proteína de 32 kDa foi identificada no tecido adiposo marrom de mamíferos que estava envolvida no processo de termogênese, foi chamada de termogenina, devido à sua função (Ricquier & Kader, 1976). Durante décadas, acreditou-se na existência desta enzima exclusivamente no tecido adiposo marrom sendo então considerada como um marcador de mitocôndrias animais, após a aquisição evolutiva tardia desta proteína (Klingenberg, 1990; Nicholls & Rial, 1999; Vercesi et al., 2006).

Em 1995, Vercesi et al. identificaram uma enzima com propriedades bioquímicas semelhantes à UCP1 animal em mitocôndrias de batata. Esta proteína foi denominada PUMP (Plant Uncoupling Mitochondrial Protein). A nomenclatura PUMP para as proteínas desacopladoras de plantas foi posteriormente substituída por pUCP (Plant Uncoupling Protein) para evitar confusão com o termo PUMP (Proton Pumps), utilizados para os transportadores envolvido no processo de transporte ativo (Borecký et al., 2001). A descoberta desta enzima no reino vegetal tem estimulado a busca de outras congêneres UCPs em plantas, animais e outros eucariotas (Borecký et al., 2001; Boss et al., 1997; Bouillaud et al., 1994; Cavalheiro, Fortes, Borecký, Faustini, & Schreiber, 2004; Fleury et al., 1997; Jarmuszkiewicz, Sluse-Goffart, Hryniewiecka, & Sluse, 1999; Jarmuszkiewicz, Behrendt, Navet, & Sluse, 2002).

A pUCP exerce, portanto, o desacoplamento entre a fosforilação oxidativa e a produção de ATP podendo diminuir a produção de ROS (Vercesi et al., 2006). Portanto, também possui atividade antioxidante. A expressão de genes que codificam para pUCP e sua atividade em plantas ainda são pouco conhecidos e poucos estudos são dedicados à evolução paralela da regulação da AOX e da pUCP. A pUCP apresenta-se como uma família multigênica com pelo menos seis membros em *Vigna unguiculata* (*VuUCP1a*, *1b*, *2*, *3*, *4* et *5*). Além disso, estudos têm sugerido que a pUCP *AtUCP1* tem expressão predominante em *Arabidopsis* (Sweetlove et al., 2006) e dois genes (*AtUCP1* et *AtUCP5*) foram mostrados como sendo super expressos quando as plantas estavam submetidas à seca (Kreps et al., 2002; Vercesi et al., 2006). Mais recentemente, e com base na homologia de genes sequenciados de *Arabidopsis* *AtPUMP4*, *5* et *6*, foram reclassificados como genes que codificam transportadores de ácidos carboxílicos (*DIC1*, *DIC2* et *DIC3*) (Palmieri et al., 2008).

2.4.2- Os plastos e os cloroplastos

Plastídios são encontrados apenas nas células das plantas e algas. Eles são responsáveis pela fotossíntese e armazenagem de vários produtos bem como a síntese de moléculas-chave necessárias para a arquitetura e para o funcionamento das células de plantas. Plastídios são derivadas da endosimbiose de células procariontas durante simbiogênese. A maioria dos genes do organismo simbiote foram perdidos ou transferidos para o núcleo da célula hospedeira. O genoma dos plastídios das plantas superiores codifica cerca de 87 proteínas (Peltier & Cournac, 2002). No entanto, estes genes representam apenas uma fração do total de proteína necessária para a biogênese e funcionamento do cloroplasto (Aluru &

Rodermel, 2004). Foi proposto um modelo para a biogénese e diferenciação de dos vários tipos de plastídios. Neste modelo identificou sete passos para o desenvolvimento de plastídios: proplastídio, amiloplasto e plastídio amebóides, que são agrupados nos estágios iniciais do desenvolvimento como proplastídios não-verdes, além dos leucoplastos e dos etioplastos. Nas folhas o estágio final de desenvolvimento é chamado de cloroplasto, ele é fotossinteticamente ativo e sofre "senescência" durante o envelhecimento das folhas. Devemos ainda incluir os cromoplastos em frutas e flores (Tilney-Bassett & Almouslem, 1989).

Nos eucariotos, as reações biofísicas e bioquímicas da fotossíntese ocorrer num plastídio especializado, o cloroplasto. Os cloroplastos das plantas superiores têm um sistema de envelope composto por uma membrana dupla consistindo de uma membrana externa e uma membrana interior. A membrana interna chamada de membrana tilacoidal rodeia o compartimento interior. Este compartimento contém vesículas achatadas ou sacos chamados tilacóides, que normalmente são dispostos em pilhas chamadas grana. O lumen é a fase aquosa presente no centro de tilacóides e delimitada pela membrana tilacoidal. Os pigmentos fotossintéticos e complexos enzimáticos que promovem as reações de conversão da energia luminosa em energia química na forma de ATP estão incorporados nas membranas tilacoidais enquanto as enzimas necessárias para as reações de assimilação de carbono estão presentes no estroma.

Os cloroplastos, tais como mitocôndrias, têm uma cadeia transporte de elétrons acoplada à síntese de ATP. A excitação dos fotossistemas I e II e a oxidação subsequente resulta na produção de O_2 $NADPH+H^+$ promovendo assim a geração de um gradiente de prótons para a síntese de ATP (Cournac et al., 2000). Embora a luz seja essencial para realização da fotossíntese, o aparelho fotossintético é sensível a danos induzidos pela luz, causando assim fuga de elétrons e inevitável produção de intermediários reativos ou de ROS. A produção de oxigênio pelas plantas foi

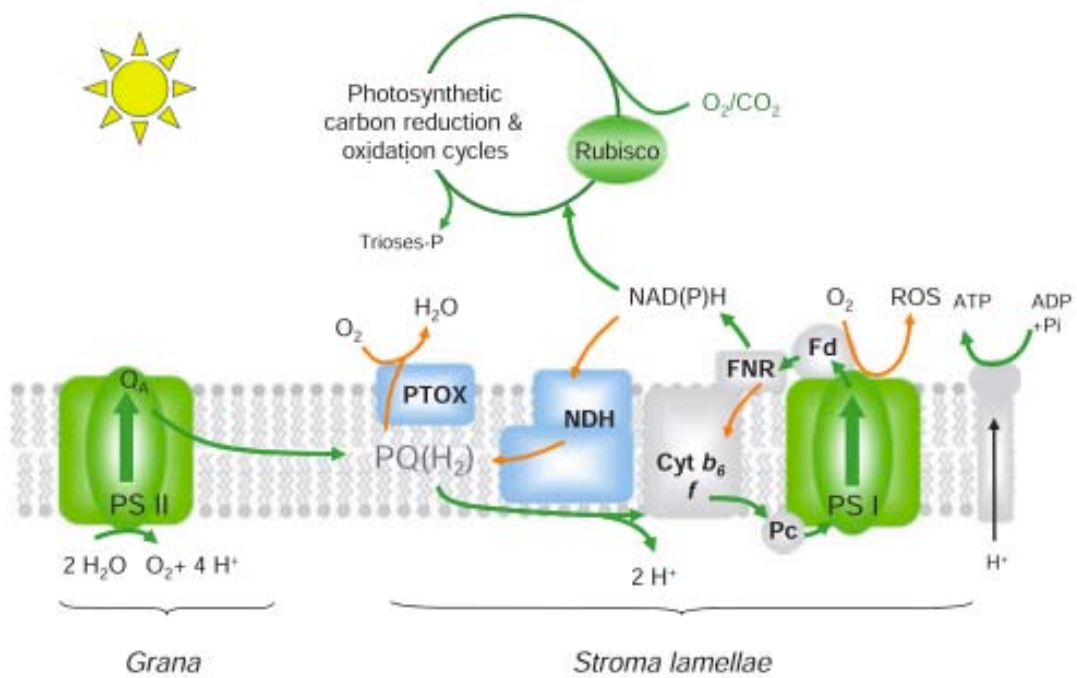


Figura 15. Esquema representando as reações de transferência de elétrons nos tilacóides.

De acordo com Rumeau, Peltier, et Cournac (2007)

demonstrada por Priestley, em 1771, quando ele observou que uma vela acesa em uma câmara fechada de vidro não se apaga, na presença de uma planta. Em 1779, Jan Ingenhousz, mostrou que a luz era essencial para a produção de oxigênio pelas plantas (Taiz & Zeiger, 2004).

Mais tarde, o cloroplasto e dos tilacóides foram identificados como o local de produção do oxigênio a partir da água nos organismos fototróficos. Em 1937, Robert Hill, demonstrou a produção de O_2 , quando extrato de folhas de contendo cloroplastos eram expostos à luz. Posteriormente Severo Ochoa mostrou que o $NADP^+$ é o aceptor final dos elétrons no cloroplasto (Taiz & Zeiger, 2004).

Em 1951, Mehler mostrou o consumo de oxigênio, na presença de luz a partir do consumo de O_2 e produção de H_2O_2 em tilacóides, através da detecção da formação de acetaldeído e etanol, na presença de catalase (Asada, 1999) .

2.4.2.1- A clororrespiração

Fotossíntese e respiração, são os dois principais processos bioenergéticos de organismos vivos que coexistem em células vegetais. Enquanto que a cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese é claramente limitado aos cloroplastos, a cadeia de transporte de elétrons da respiração celular, inicialmente pensada como limitada às mitocôndria, também está presente (pelo menos parcialmente) nos cloroplastos (Bennoun, 2002; Cournac, Josse, et al., 2000). Este respiração do cloroplasto foi então chamada de clororrespiração, para diferenciá-la da mitorespiração, e provavelmente teve sua origem nas cianobactérias que deram origem aos cloroplastos durante a endossimbiose (Scherer, 1990).

A primeira evidência da oxidação não-fotoquímica das plastoquinona veio de estudos sobre o metabolismo H_2 das microalgas. Gaffron & Rubin, em 1942, observaram que algas verdes unicelulares, como *Chlamydomonas* ou *Scenedesmus*

obliquus, em condições anaeróbias, catalisavam a redução de CO₂ usando H₂ como doador de elétrons. Estas reações precisavam da atividade do PSI e um período de adaptação sob condições anaeróbicas para iniciar a síntese e/ou a ativação de hidrogenases responsáveis por catalisar uma reação reversível. A produção de H₂, assim como a redução de CO₂ dependente de H₂, são processos insensíveis ao herbicida 3 - (3,4-dichlorofenil) -1,1-dimetil ureia (DCMU), mostrando assim que os elétrons vêm de uma fonte diferente que o PSII. No entanto, estas reações são sensíveis ao 2,5-dibromo-3-méthyl-6-isopropyl-p-benzoquinone (DBMIB), uma análogo de quinonas, inibidor do citocromo *b₆f*, demonstrando assim a implicação das plastoquinonas (Gfeller & Gibbs, 1985; Godde & Trebst, 1980; Maione & Gibbs, 1986).

A clororrespiração é definido como o transporte de elétrons a partir da oxidação de moléculas endógenas (NADH ou NADPH) passando pelo "pool" de quinonas, e ao final transferido para o O₂, graças a uma oxidase terminal similar à oxidase alternativa das mitocôndrias (Kuntz, 2004).

Durante muito tempo, tem-se especulado sobre a possível existência da PTOX mas somente em 1999 esta proteína foi isolada e caracterizada em um mutante de *Arabidopsis* (Carol et al., 1999; Wu, Wright, Wetzel, Voytas, & Rodermel, 1999). O mutante de *Arabidopsis* chamado "IMMUTANS", tinha um fenótipo chamado "variegate" com alguns zonas despigmentada quando a luminosidade era de baixa ou média intensidade. No entanto, quando as plantas foram expostas a altos níveis luminosidade, as folhas ficavam quase completamente despigmentada, mostrando um resposta insuficiente ou inadequadas ao estresse fotooxidante. A existência deste fenótipo está ligado à acumulação de fitoeno, o primeiro precursor da síntese de carotenóides (Carol & Kuntz, 2001).

A clororrespiração é uma via alternativa envolvendo a redução das plastoquinonas (PQ) pela ação da NDH (NADH redutase do cloroplasto), oxidação

das plastoquinonas reduzidas pela oxidase terminal do plastídio (PTOX) com a redução de oxigênio à água (Aluru & Rodermel, 2004; Bennoun, 2002; Nixon, 2000). Sabe-se que, sob condições normais de saturação da cadeia de transporte de elétrons (sistema "Z"), os cloroplastos podem ativar um transporte cíclico de elétrons com a finalidade de controlar a luz através de um mecanismo de *quenching* não-fotoquímico da fluorescência da clorofila (NPQ) (Johnson, 2005).

A ação conjunta do complexo NDH e da PTOX otimiza a eficiência do transporte de elétrons cíclico equilibrando o estado redox dos transportadores de elétrons entre os fotossistemas. Sob condições de estresse, o papel destes componentes é evitar a superredução do PSI e dos receptores de elétrons e, assim, evitar a formação de ROS e, protegendo então o PSI de fotoinibição (Rumeau, Peltier, & Cournac, 2007).

Diferentes grupos de pesquisa têm tentado quantificar o fluxo de elétrons através da clororrespiração (Bennoun, 1982; Büchel & Garab, 1995; Feild, Nedbal, & Ort, 1998; Peltier, Ravenel, & Verméglio, 1987). Contudo, estas estimativas devem ser tomados com cautela, com base em medições de oxidação da PQ, com a doação de elétrons para o O₂, que estão sujeitas a alterações quando há mudanças na respiração mitocondrial (Feild et al., 1998). Outras abordagens têm sido tentadas pela utilização de inibidores da cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias. A utilização de cianeto não teve efeito sobre a clororrespiração mas o propil-galato, um inibidor da AOX mitocondrial inibe também a cloro-respiração em células de *Chlamydomonas* (Cournac, Josse, et al., 2000; Cournac, Redding, et al., 2000; E. Josse et al., 2000). Nestas células, a taxa de consumo de O₂ atribuída à clororrespiração foi estimada em cerca de 50 nmol O₂.min⁻¹.mg⁻¹de clorofila, representando cerca de 2% da velocidade máxima de fluxo dos elétrons da fotossíntese (Cournac et al., 2002). Outra forma de avaliar a importância da clororrespiração é determinar a abundância relativa dos complexos enzimáticos

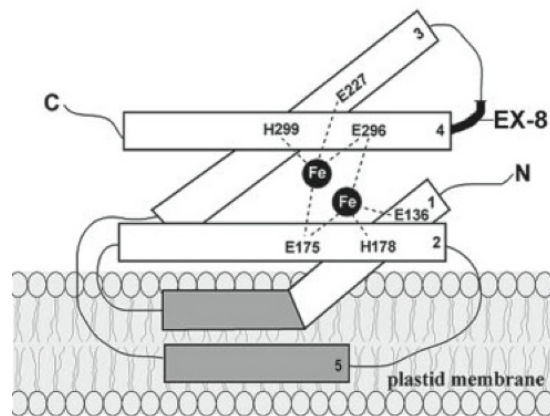


Figura 16. Modelo estrutural propondo a PTOX como uma proteína de membrana de plastos com um centro di-ferro no sítio ativo.

De acordo com Rodermel (2002).

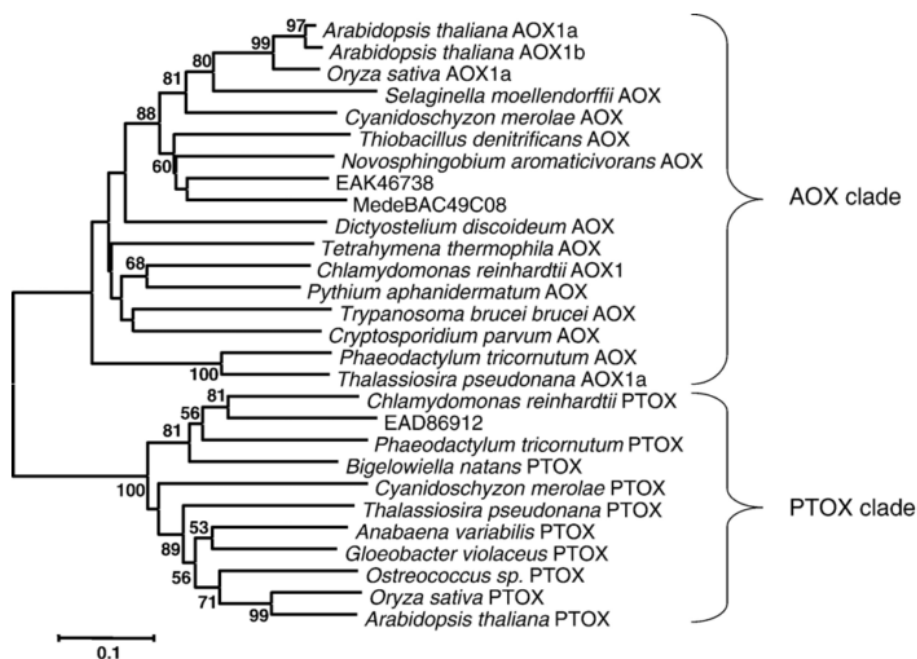


Figura 17. Árvore filogenética de seqüências de proteínas obtidas a partir de RNAm dos genes AOX e PTOX de organismos procariotos e eucariotos, que mostra a separação dos clados de PTOX e AOX.

De acordo com McDonald and Vanlerberghe (2006).

envolvidos na clororrespiração nas membranas dos tilacóides. Em plantas C3 em condições ótimas de desenvolvimento, a NDH é um componente menor da membrana tilacóide, representando aproximadamente 0,2% do total de proteínas (Sazanov, Burrows, & Nixon, 1998). Assim, em comparação com o processo fotossintético, a clororrespiração parece ser quantitativamente menor, pelo menos, nos cloroplastos das plantas superiores (Peltier & Cournac, 2002).

2.4.2.2- A oxidase terminal dos platídios (PTOX)

As proteínas carboxiladas di-ferro (grupo ao qual pertencem a PTOX e a AOX) é um grupo de proteínas primitivas, uma vez que estão presentes em todos os reinos (incluindo arqueobactérias) tanto nos aeróbios quanto nos anaeróbios (Gomes, Gall, Xavier, & Teixeira, 2001). Conforme mencionado no parágrafo sobre a AOX, esta classe de proteínas é caracterizada por um centro de dois átomos de ferro não heme (no qual os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação com os metais são altamente conservados), contido no centro de uma conformação de quatro α -hélice conservada (McDonald & Vanlerberghe, 2006). A PTOX é codificada por um gene nuclear, e sintetizada como uma proteína precursora que contém uma extensão N-terminal que é clivada antes de ser importada para os cloroplastos (Carol et al., 1999). As sequências de AOX e PTOX tem homologia elevada e ambos apresentam um sítio C-terminal de ligação ao átomo de ferro (Carol & Kuntz, 2001). Mas a análise filogenética mostrou que PTOX e AOX são agrupadas em famílias distintas (Carol & Kuntz, 2001). Os genes da PTOX estão presentes em monocotiledóneas (Kong, Gong, Zhang, Zhang, & Chen, 2003) e nas algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii*. Um gene homólogo ao gene da PTOX também está presente em uma ameba *Bigelowiella natans* (Archibald, Rogers, Toop, Ishida,

& Keeling, 2003), resultado de um evento endosimbiótico secundário. Curiosamente, os genes homólogos à PTOX estão na cianobactéria *Anabaena* sp. PCC7120 (Kaneko, 2001), *Prochlorococcus marinus* tr. MED4 (Rocap et al., 2003), e também no *Gloeobacter violaceus* PCC7421, uma cianobactéria, que não tem cloroplasto (Nakamura et al., 2003). Estas observações sugerem um origem procariótica da PTOX (Kuntz, 2004).

Nas plantas, os resultados das experiências com a técnica de "light shift" indica que PTOX é expressa no início do desenvolvimento de cotilédones (Röbbelen, 1968; Wetzel, Jiang, Meehan, Voytas, & Rodermel, 1994). Durante esta fase da resposta à luz, o fenótipo dos cotilédones é irreversivelmente determinado pela luz ambiente. O modelo "variegate" e localização da PTOX nos cloroplastos também indicam que ela é ativa nas folhas. Isto foi confirmado por um experimento utilizando promotores PTOX e gene o repórter GUS. Estas experiências também mostraram que a expressão da PTOX não parece estar restrita aos tecidos verdes, mas ubíquo em tecidos e órgãos de *Arabidopsis* durante o desenvolvimento (Aluru, Bae, Wu, & Rodermel, 2001). Nestes tecidos uma acumulação significativa de transcritos da PTOX concomitante com a acumulação de fitoeno é mostrado, que corrobora a ideia de que PTOX está envolvida na biossíntese de carotenóides. Também foi mostrado que os níveis de transcritos da PTOX são aumentados durante a maturação de tomate e pimentões (Josse et al., 2000). No entanto, a expressão ubíqua da PTOX levanta a questão de qual é a sua função em tecidos não verdes, especialmente as raízes que não acumulam quantidades significativas de carotenóides (Aluru & Rodermel, 2004).

Vários estudos apontam que a PTOX e a cadeia respiratória do cloroplasto, o clororrespiração, são superregulados, tanto em suas atividades quanto na quantidade das proteínas, quando as plantas são submetidas à estresses abióticos como a seca e salinidade (Ibáñez, Ballester, Muñoz, & Quiles, 2010; Stepien &

Johnson, 2009) mas os estudos sobre a expressão do gene da PTOX ainda são raros. O papel chave atribuído à oxidase terminal do plastídio (PTOX) é de limitar a produção de ROS em cloroplastos (Josse, Alcaraz, Laboure, & Kuntz, 2003). No entanto, esse papel ainda é controverso (Rosso et al., 2006; Stepien & Johnson, 2009) e a importância desta atividade em condições de estresse oxidativo ainda não foi demonstrado.

Finalmente, a função metabólica e fisiológica destas proteínas (AOX e PTOX) continua a ser objeto de investigação intensa (McDonald & Vanlerberghe, 2006), mas os trabalhos abordando a co-regulação destas proteínas e o "cross-talk" entre as duas organelas em plantas submetidas a estresses abióticos são quase inexistentes.

MATERIAL E MÉTODOS

3- A ABORDAGEM EXPERIMENTAL

3.1- Material vegetal e condições de cultivo

O estudo foi realizado em plantas de caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), à partir de dois diferentes cultivares. Dentre os diversos cultivares existentes de *Vigna unguiculata*, dois foram selecionados para este estudo. O primeiro Epace, cultivar desenvolvida pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará é adaptado para semi-árido nordeste do Brasil. O segundo cultivar escolhido foi o 1183, que é nativa das regiões úmidas da China e foi fornecido pela equipe da Profa Anne Repellin da Universidade de Paris-Est à Creteil. Estas cultivares foram previamente selecionados pela equipe pela diferença na resposta vis-à-vis a seca (cv. Epace, mais tolerantes à seca e cv. 1183 mais sensível à seca.).

As sementes foram desinfetados após imersão em uma solução de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 0,5% durante 5 minutos e, em seguida, enxaguado com água corrente. As sementes foram então colocadas em vasos de 5 L de plástico (1 semente por vaso) contendo substrato (N/P/K 14/16/18, $1,2 \text{ kg.m}^{-3}$, Gramoflor repiquage) fertilizado com 15 g de grânulos de liberação lenta de nutrientes (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2, Fertil, Boulogne-Billancourt, France). As plantas foram cultivadas por duas semanas em salas de cultura, em condições estritamente controladas (14h dia com luminosidade de $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no nível das plantas, 25/20 °C (dia/noite), 80% de umidade). Durante este período, as plantas foram regadas com água da torneira à temperatura ambiente. Após este período, as plantas que atingiram a mesma fase de desenvolvimento foram transferidas para câmaras fitotrônicas (Figura 18) (120 cm de largura por 117 cm de profundidade e 204 cm de altura), nas mesmas condições que as descritas acima. Após um período de aclimação de uma semana, as plantas foram então sujeitos durante 14 dias às seguintes condições: fumigação O_3 (120 ppb \pm 10 ppb) durante 12h por dia, suspensão da irrigação (seca), e combinação da

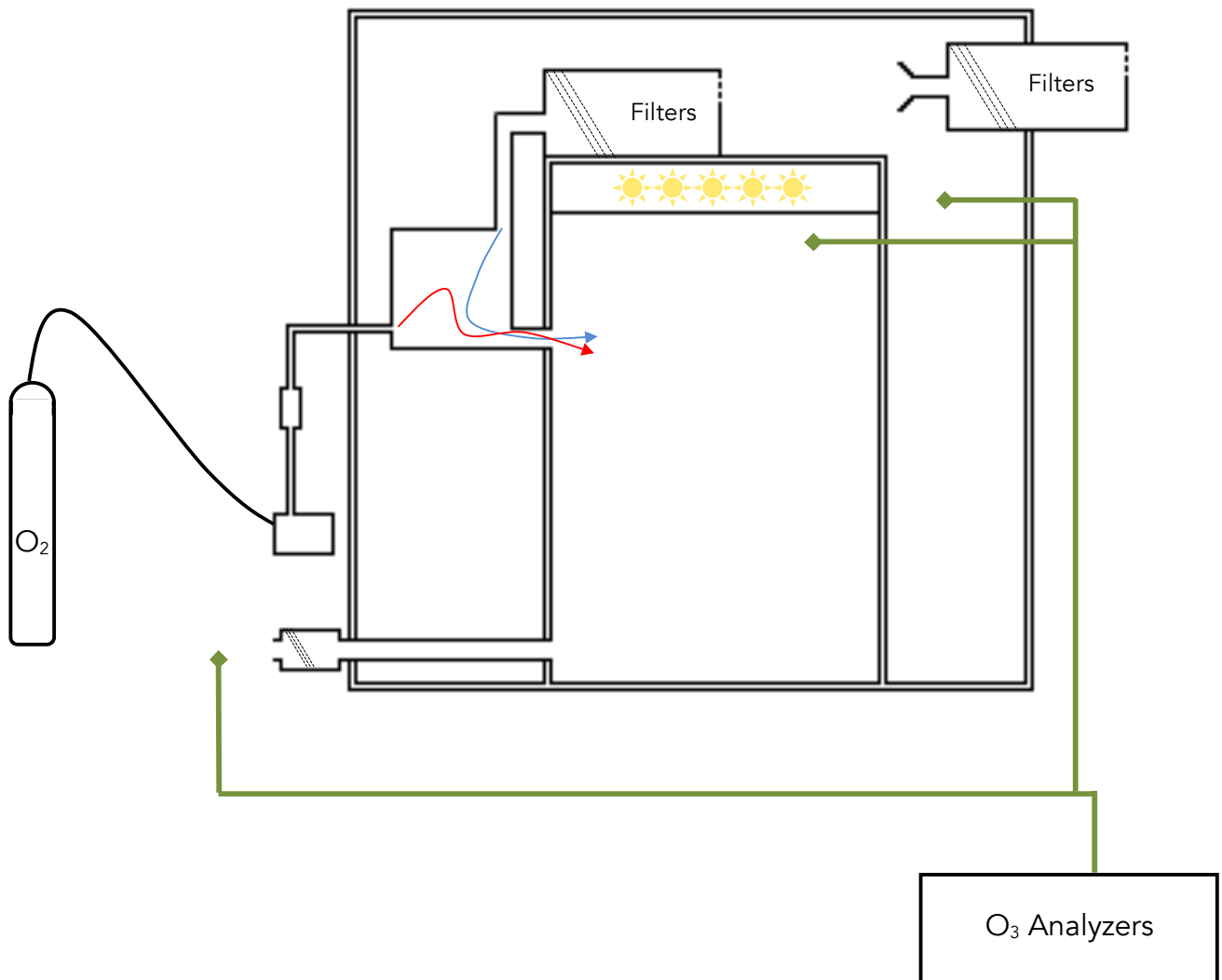


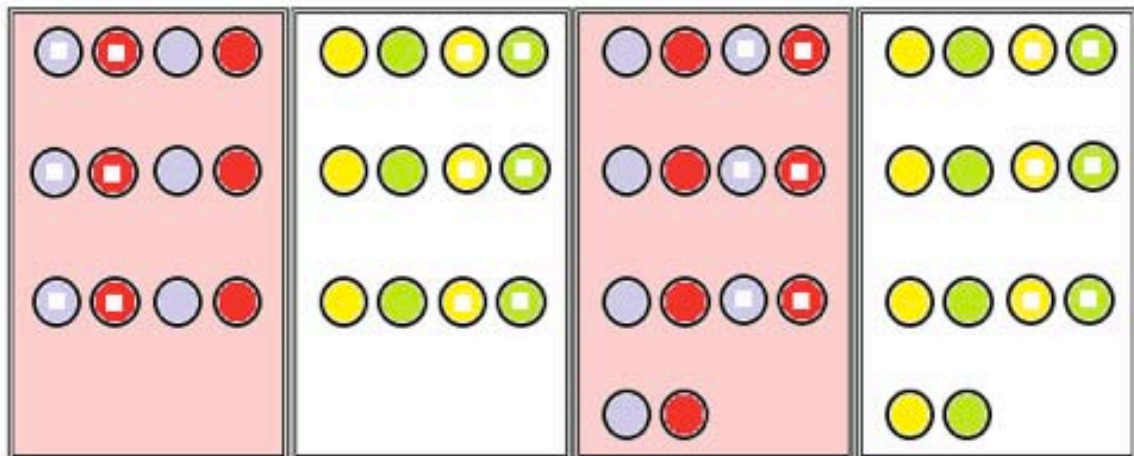
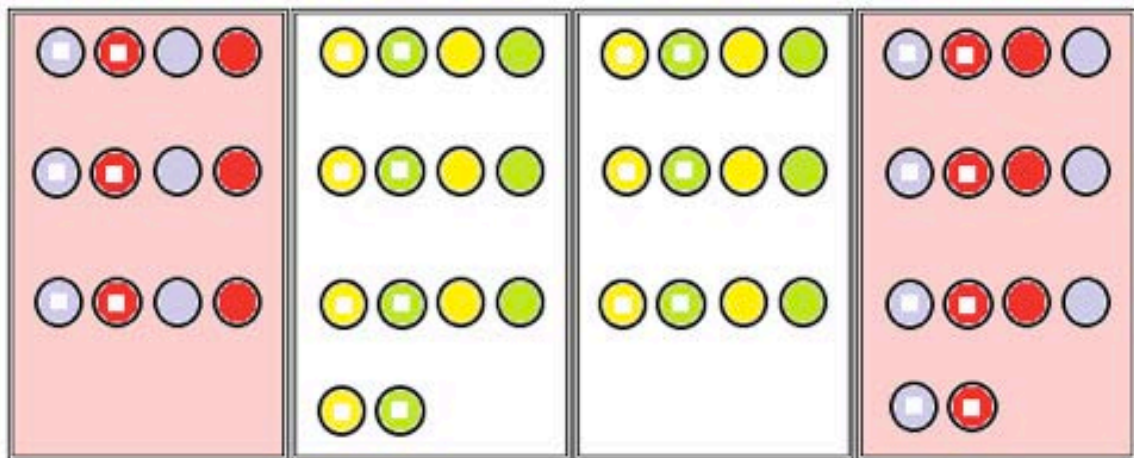
Figura 18. Esquema representativo do dispositivo experimental de fumigação ao ozônio

seca à fumigação por O_3 aplicadas simultaneamente. Um total de 104 plantas (52 plantas de cada cultivar) foram distribuídas em oito câmaras de fumigação: 4 com ar filtrado através de um filtro de carvão (CF), 4 com ar filtrado enriquecido com O_3 . Em cada câmara metade das plantas foi submetidas à suspensão de rega, enquanto a outra metade foi regularmente regada com água da torneira. Em resumo, 26 plantas são consideradas como um controle (C), 26 plantas foram submetidas a suspensão da rega (D), 26 plantas foram expostas ao O_3 e mantidos bem regada (O), 26 plantas eram O_3 e exposto a privação de água, ao mesmo tempo (D + O). Para cada tratamento, as plantas 26 foram então distribuídas em quatro câmaras fitotrônicas (Fig. 19).

3.1.1- O dispositivo de fumigação

O ozônio foi produzido a partir de oxigênio puro por dois geradores (OZ500 Fischer, Bonn, Alemanha, e CMG3-3 Innovatec II, Rheinbach, Alemanha). Dentro desses dois geradores, as moléculas de oxigênio (O_2) são separados por um arco elétrico e reassociadas formando aleatoriamente moléculas de ozônio (O_3). O ozônio produzido é injetado no sistema de ventilação das câmaras de fumigação. A regulação deste fluxo é fornecido por medidores de fluxo e a concentração do ozônio em todo o dispositivo é continuamente medida com o auxílio de um analisador de UV (O341M, Environment S.A., Paris, França) associada com a estação de aquisição de computadorizada.

As câmaras de fumigação climatizadas. A iluminação é fornecida por cinco lâmpadas de vapor de sódio (Son-T Agro, Philips, Eindhoven, Holanda), atingindo assim uma PPFD de $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no nível das plantas. A intensidade da luz foi medida em todas as câmaras, dependendo da distância até às lâmpadas. Os níveis



- Epace Control
- Epace Drought
- 1183 Control
- 1183 Drought
- Epace Drought + Ozone
- Epace Ozone
- 1183 Ozone
- 1183 Drought + Ozone

Figura 19. Diagrama representativo da distribuição das plantas nas câmaras

de temperatura e humidade foram medidos duas vezes por hora em cada câmara, juntamente com a concentração de ozônio (Figura 18).

3.1.2- Procedimento de fumigação

O período de fumigação ozônio diário começou 2 horas depois do início do fotoperíodo e continuou durante 12 horas, até que o desligamento das luzes (Figura 21). Geralmente 1h é necessária para o nível de ozônio atingir a concentração desejada nas câmaras (120 ppb \pm 10 ppb). As plantas foram fumigados com ozônio durante 14 dias sem interrupção (Figura 20).

A amostragem foi feita sempre na primeira folha trifoliolada, estando esta totalmente desenvolvida no início dos tratamentos. As amostras de folhas foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 ° C para posterior análise (Figura 22).

3.1.3- Os índices de exposição ao ozônio

A dose de exposição ao ozônio pode ser estimada utilizando AOT 40 com base na dose cumulativa de ozônio durante um limite de 40 ppb, e o índice POD_Y é calculado com base no fluxo de ozono para a folha (a dose de ozônio fitotóxica dentro de um limiar de fluxo instantâneo Y^{-2} nmol.m.s⁻¹). O cálculo destes foi realizado usando as seguintes fórmulas (Mills et al., 2011) :

$$AOT\ 40 = \sum_{i=1}^N \max(c_i - 40, 0) \Delta t$$

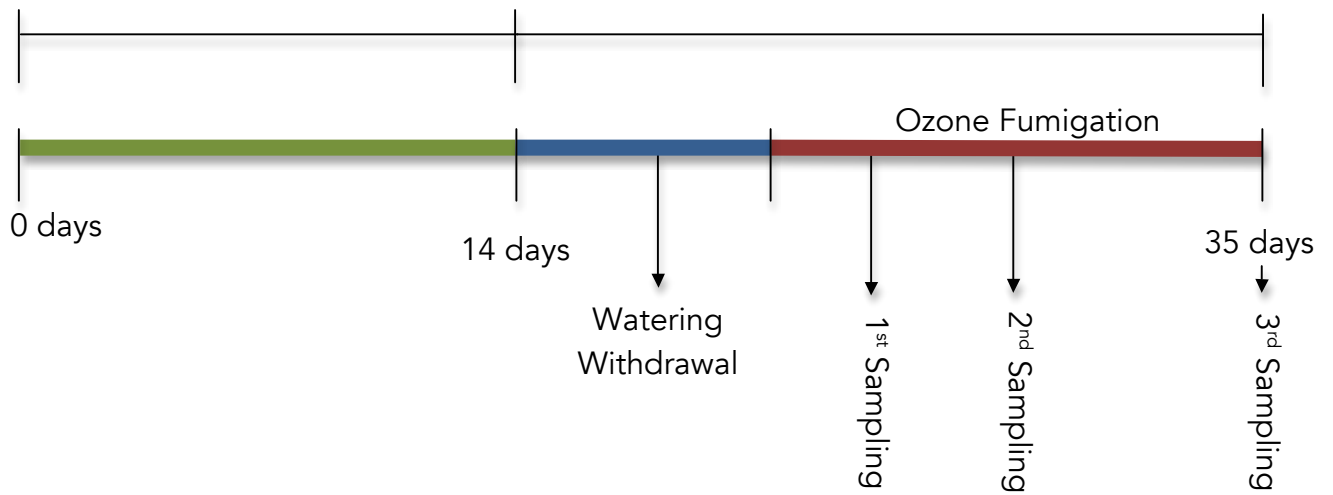


Figura 20. Diagrama experimental

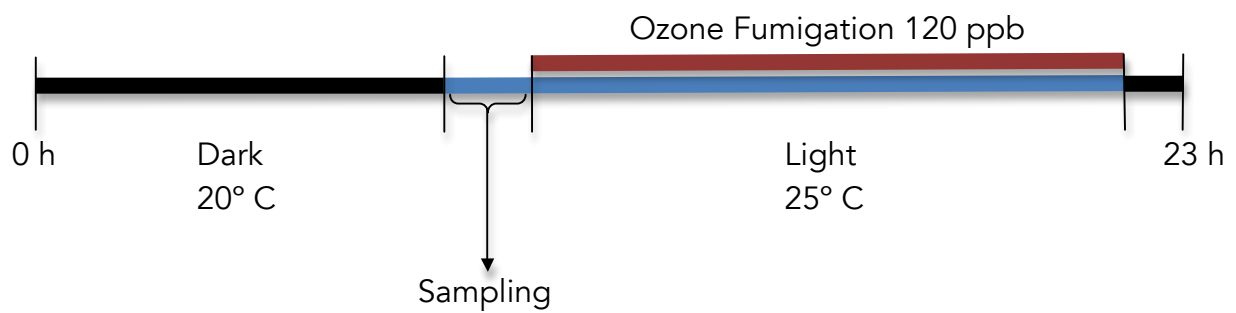


Figura 21. Diagrama de fumigação de ozônio em um dia

e,

$$POD_Y = \sum_{i=1}^N \max(F_{st,i} - Y, 0) \Delta t$$

O cálculo da AOT40 e do POD_0 baseia-se em valores horários, da concentração de ozônio (c_i em ppb) ou no fluxo estomático ($F_{st,i}$ em mmol.m^{-2}), respectivamente. N indica o número de horas no período que devem ser incluídos no cálculo e $\Delta t = 1$ h. Somente horas do dia foram levadas em conta. A condutância estomática para o fluxo de ozônio (F_{st}) foi calculada como descrita por Bagard et al. (2008).

3.2- Medidas da fluorescência da clorofila

O princípio da análise da fluorescência da clorofila é baseado no fato de que quando um quantum de energia de luz é absorvida pela molécula de clorofila, toda esta energia é transferida para os elétrons de valência. Estes elétrons "excitados" voltam ao seu estado original, liberando a energia absorvida de três formas: fotoquímica (P), a dissipação de calor (H) e reemissão de fluorescência (F). Como esses três fenômenos competem entre si, a medição da fluorescência da clorofila pode fornecer informações sobre os outros dois processos (Maxwell & Johnson, 2000). Provavelmente, o parâmetro mais útil na presente abordagem para a fluorescência, é o que mede a quantidade de energia absorvida e utilizada na fotoquímica, chamado de rendimento quântico fotoquímico. Se a medida for no escuro, o rendimento quântico intrínseco é expresso como F_v/F_m . Na presença da luz, o rendimento quântico intrínseco é dada pela ϕ_{PSII} (Genty, Briantais, & Baker, 1989). O ϕ_{PSII} foi utilizado para o rendimento quântico geral da fotoquímica, mas em

um sentido mais estreito, ele é utilizado para o rendimento quântico eficaz na presença de luz.

A emissão de fluorescência da clorofila foi medida na superfície superior da folha, por meio de um fluorímetro de amplitude modulada (FMS 1, Hansatech, Norfolk, Reino-Unido). Primeiramente, F_o e F (fluorescência mínima das folhas no escuro e adaptada à luz, respectivamente), e F_M et F_M' (rendimento máximo da fluorescência das folhas adaptadas no escuras e à luz, respectivamente) foram obtidos com a aplicação de um pulso de saturação. A relação F_v/F_m e o rendimento quântico da eficiência do PSII foram calculados de acordo com Genty et al. (1989) através das fórmulas:

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_o}{F_m}$$

e,

$$\Phi_{PSII} = \frac{F'_m - F_0}{F'_m}$$

Por outro lado, o quenching não-fotoquímico (qN) foi calculado para se obter uma estimativa da quantidade de energia que foi utilizada por processos não-fotoquímica, tais como a atividade PTOX. O qN foi calculado segundo Kooten & Snel, (1990) através da fórmula:

$$qN = \frac{1 - (F'_m - F'_0)}{F_m - F_o}$$

3.3- Extração de RNA total e PCR em tempo real

As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido com em grau e pistilo. O RNA total foi depois extraído utilizando o kit de purificação de RNA TRIzol Plus (Life Technologies Corporation). Após a extração de RNA (50 µg) foi feita digestão do DNA contaminante com o auxílio do kit DNA-FreeTurbo (Invitrogen). O RNA total (1 µg) foi então aquecido à 65 ° C durante 5 min, depois resfriado num banho de gelo por 2 min. A transcrição reversa foi feita com o auxílio do kit de síntese de cDNA iScript™ (Bio-Rad). As reações de PCR em tempo real foram realizadas com o iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) e iniciadores específicos para cada reação do gene alvo no iCycleriQ™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Os iniciadores foram desenhados a partir de sequências de extraídos do genespace (GSS), ou do banco de dados iniciativa genômica do caupi (CGKB) (Chen et al. 2007) assim como do banco de genes do NCBI (tableau 1). O gene de referência (*VuEF1α*) mostrando a maior estabilidade foi escolhido usando GeNorm (Vandesompele et al., 2002). Os dados de expressão apresentados nas figuras são, a média entre 3 replicatas biológica, que por sua vez é uma média de 3 repetições técnica. Eficiência da PCR utilizada fico sempre entre 80% e 110%, dependendo dos pares de iniciadores e os valores de CT Para cada amostra, foram adquiridos através do iCycler IQ™ (Biorad).

Para cada gene, o nível de expressão em amostras tratadas (D, O e D + O) foram normalizados para o nível medido nas amostras de controle. A expressão do gene alvo foi em seguida normalizada pela expressão dos genes de referência tal como descrito na seguinte fórmula:

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CT_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CT_{ref}(control-sample)}}$$

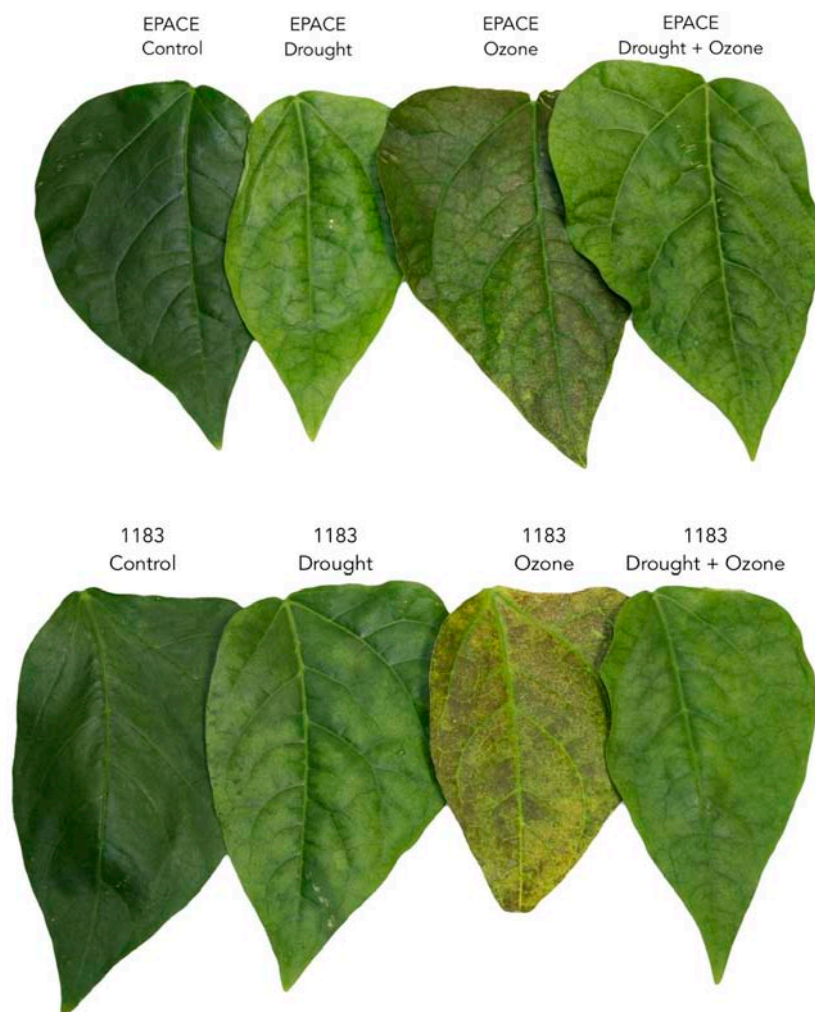


Figura 22. Exemplos de folhas ao fim da experimentação

onde E é a eficiência do PCR, CT o limite de ciclos, para o gene de referência (Ref), para os genes alvos (target) elevado ao Δ CT das plantas controles e tratadas (Pfaffl, 2001). O *heatmap* e os gráficos mostram a relação dada pela fórmula acima numa escala \log_2 . O software Multi Viewer Experiment (MeV 4.8.1) foi utilizado para montar os *heatmaps* e efetuar as análises de classificação hierárquica (Saeed et al., 2003).

3.4- Extração de proteínas foliares totais

Para preparar um extrato de proteína que inclui as proteínas da membrana, folhas de feijão-frade (1 g de peso fresco de material) foram congeladas em nitrogênio líquido e macerado num pó fino no grau e pistilo resfriado por nitrogênio líquido. O pó foi ressuspensão em tampão de extração 5 ml (50 mM Tris-HCl, pH 8,0) contendo 50 mM de β -mercaptoetanol e 1 μ M de leupeptina, 1 pM de pepstatina. Após 30 min de agitação (4 °C) as amostras foram centrifugadas (40.000 g pendant 20 min), o precipitado foi ressuspensão no mesmo tampão contendo 1% de SDS. Após nova agitação durante 30 min (4 °C) seguido por centrifugação (40.000 g pendant 20 min), as proteínas presentes no sobrenadante foram então precipitadas com acetona (na concentração final de 80%) e centrifugadas (9.000 g durante 10 min) e ressuspensão no mesmo tampão com SDS 1% e guardadas à -20 ° C (Joet et al., 2002). Após a ressuspensão dos precipitados uma alíquota foi usada para medir a quantidade de proteína total com kit DC protein assay (Bio-Rad)

3.5- Western blotting

Proteínas membranares de folhas foram desnaturadas por fervura em 1% (p / v) de SDS et β -mercaptoetanol à 100 °C durante 5 min, depois separadas por SDS-PAGE 13% (p / v) em géis de poliacrilamida utilizado o sistema Mini Bio-Rad-Protean II (Bio-Rad Laboratories, Ivry-sur-Seine, França) seguindo o método de Laemmli (1970). Após a separação por SDS-PAGE, os polipeptídeos foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose através de transferência semi-seca (Trans-Blot SD, Bio-Rad). A membrana foi tratada com 3% de albumina de soro bovino, durante 3 horas, e em seguida, colocada para reagir durante uma noite com um anticorpo monoclonal dirigido contra AOX (fonte : Center for Biothechnology, University of Nebraska-Lincoln). A hibridação proteína-anticorpo foi visualizada com um anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina. Os complexos imunes foram detectados utilizando o kit de quimioluminescência Western blot (Amersham Biosciences).

RESULTADOS

PRIMEIRO CAPÍTULO

**4- PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF TWO VIGNA
UNGUICULATA CULTIVARS TO COMBINED DROUGHT
STRESS AND OZONE EXPOSURE.**

Prefácio

Este capítulo tem a forma de um artigo (em preparação para a submissão), cujo objetivo geral é analisar as respostas de dois cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp à seca combinada com a exposição a altas doses de ozônio. Os dois cultivares (Epace e 1183) foram caracterizados por Torres-Franklin et al. (2007), em resposta à seca, mas a sua resposta vis-à-vis a exposição ao ozônio não é conhecida. Entre as culturas, o caupi é uma Fabaceae importante no nordeste do Brasil, representando a principal fonte de alimento para muitas famílias e também uma importante fonte de ganho econômico (Araújo & Watt, 1988). Os experimentos foram destinadas a avaliar o crescimento e desenvolvimento das plantas *Vigna unguiculata* através da análise da massa fresca da parte aérea, o teor relativo de água, ao mesmo tempo que a avaliação dos parâmetros bioquímicos como MDA e DAB. Análise de fluorescência da clorofila (F_v/F_m , Φ_{PSII} e q_N). Todos os experimentos foram realizadas na primeira folha trifoliolada que encontrava-se totalmente desenvolvida durante o período de aplicação dos estresses.

Physiological responses of two *Vigna unguiculata* cultivars to combined drought stress and ozone exposure.

Authors: Yuri Maia^{1,2,3}, Deborah Moura Rebouças^{1,4}, Matthieu Bagard⁴, José Hélio Costa¹, Marie-Noëlle Vaultier^{2,3}, Joelle Gerard^{2,3}, Pierre Grandjean^{2,3}, Pierre Dizengremel^{2,3}, Anne Repellin⁴, Yves Jolivet^{2,3} and Dirce Fernandes de Melo¹

¹ Laboratório de Bioenergética, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Av. Mister Hull, s/n, CEP: 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brasil.

² Université de Lorraine, UMR 1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières, IFR110 EFABA, BP 70239, F-54506, Vandœuvre-Lès-Nancy, France

³ INRA, UMR 1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières, IFR110 EFABA, F-54280, Champenoux, France.

⁴ Université Paris Est Créteil, UMR 7618 Bioemco, 94010, Créteil, France

Key words

Vigna unguiculata (L.) Walp., drought, ozone, glutathione, ascorbate, physiological responses, antioxidant content.

Introduction

Plants are frequently exposed to environmental stress and it is common that more than one abiotic stress occur at a given time, for instance, drought and exposure to high ozone doses. Abiotic stress limits crop productivity and plays a major role in determining the distribution of plant species across different types of environment. Thus, understanding the physiological processes that underlie stress injury and the tolerance mechanisms of plants to environmental stress is of crucial importance to both agriculture and environment. Abiotic stresses, especially drought, salinity and temperature, are the primary causes of plant loss worldwide (Vinocur & Altman, 2005). For the next decades these constraints are predicted to be amplified as a result of the climate changes and the subsequent increase in the greenhouse gases. Tropospheric ozone (O_3) is both a greenhouse gas and an air pollutant with detrimental effect on the vegetation (Ashmore, 2005; Wittig et al, 2009). Recent data strongly indicates that O_3 background levels in the troposphere are still increasing (Royal Society, 2008). Chronic O_3 exposure may cause detrimental effects on both annual and perennial species, including visible leaf injury, reduction in biomass production, accelerated leaf senescence and altered sensitivity to other stresses (Pell, Schlaghaufer, & Arteca, 1997; Renaut et al., 2009; Wittig, Ainsworth, Naidu, Karnosky, & Long, 2009). Drought could exacerbate the effect of the other stresses to which plants are submitted, particularly ozone stress (Matyssek et al. 2006; Morgan et al. 2003; Ibáñez et al. 2010). It is also well known that signal molecules as ethylene and ABA interact in case of drought and ozone stress to alter the responses of guard cells to drought alone (Wilkinson and Davies, 2010). The root system is the first organ to sense drought. After perception, a signal sent to the leaves triggers stomatal closure and shifts plant metabolism to a water-saving strategy. Many side effects could come from this strategy, which will ultimately leads to an overall increase in Reactive Oxygen Species (ROS) production (Cruz de

Carvalho 2008). In this condition, besides different cell tolerance mechanisms to face with water deprivation as the synthesis of osmotically active compounds, stimulation of antioxidant processes may occurred (Chaves, Maroco, & Pereira, 2003)

Highest O₃ concentrations usually occur around midday and during summer season (Lorenzini, Nali & Panicucci, 1994), in conjunction with high light and/or drought. Studies on combined effects of high light and O₃ in *Phaseolus vulgaris* indicated that the former exacerbated the detrimental effects of O₃ on photosynthesis (Guidi, Tonini & Soldatini, 2000). O₃, for its part, enters in leaf by stomata, is rapidly transformed to ROS and triggers the detoxification processes (Dizengremel et al., 2008; Pell et al., 1997). Thus, the plants under stress condition are forced to balance ROS production/scavenging ratio and an imbalance in this ratio will induce cell damage (Mittler et al., 2011; Mittler et al., 2004). Based on the O₃ uptake models, drought induced stomatal closure would limit O₃ uptake into leaves and hence protect plants from O₃ stress (Grunehage & Jager, 2003, Panek & Goldstein, 2001, Panek, Kurpius & Goldstein, 2002). However, this simplistic model was challenged by observations that O₃ caused stomatal "sluggishness" that lead to incomplete stomatal closure and hence exacerbated the effects of drought (Grulke et al., 2005, Grulke et al., 2003, Karnosky et al., 2005).

The objective of the present paper was to clarify the differences between the responses of *Vigna unguiculata* (L.) Walp EPACE and 1183 cultivars under drought, O₃ and the combination of both. *Vigna unguiculata* is a leguminous plant known to be a drought-adapted culture. This crop is also important to support the production of livestock and cereals in semi-arid regions (Ehlers and Hall, 1997). In response to drought, different cultivars have been characterized according to their level of tolerance (Costa et al. 2007). EPACE is considered as a drought-tolerant cultivar, while 1183 is considered as a drought-sensitive one (Torres-Franklin et al. 2007). For this purpose *Vigna unguiculata* plants were submitted in phytotronic chamber to

watering withdraw combined or not to 120 ppb O₃ exposure. In addition to physiological parameters (RWC, stomatal conductance, chlorophyll fluorescence) we have measured the content of metabolites implied in detoxification processes (ascorbate and glutathione) as well as indicator of oxidative stress (MDA and TBARS) in order to evaluate whether and to what extent the two cultivars were able to be differentiated in these stress conditions.

Material and Methods

Plant Material, growth conditions and sampling procedure

Vigna unguiculata seeds of a rather drought-tolerant cultivar (EPACE) were obtained from the UFC Seeds Bank. The seed of the second cultivar, considered as a rather drought-sensitive (1183) were obtained from colleagues of the UMR BioEMCo, Paris-Est Creteil University. Seeds were surface sterilized with $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 0.5% for 5 min and rinsed in tap water before sowing into 5 L plastic pots containing compost (N/P/K 14/16/18, 1.2 kg.m⁻³, Gramoflor Repiquage) fertilized with 15 g of slow-release nutritive granules (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2; Fertil, Boulogne-Billancourt, France). The plants were grown for three weeks in growth chambers in strictly controlled conditions (14h days at an irradiance of 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ at the plant level, 25/20 °C, 80% humidity). All the plants were well irrigated with tap water kept at room temperature. After this period, the plants at the same developmental stage were transferred to phytotronic chambers (120 cm wide by 117 cm deep and 204 cm high) under the same conditions as previously described for a one-week as adaptation period. Plants were then submitted for more 14 days to the following conditions: O₃ fumigation (120 ppb \pm 10ppb) during 12 h daily, watering withdrawal (drought), and a combination of O₃ and drought simultaneously applied. In this way, a total set of 52 plants was distributed in eight fumigation chambers: 4 in a charcoal-filtered (CF) air and 4 in CF air enriched with O₃. In each chamber half of the plants were submitted to watering withdraw while the others plants were regularly watered with tap water. In summary, 26 plants, were referred to as control plants (C), 26 plants were submitted to watering withdrawal (D), 26 plants were exposed to O₃ and kept well-watered (O), 26 plants were exposed to O₃ and deprived of water during the same time (D+O) as referred to the combination of the two stresses. The daily ozone fumigation period started 2 h after the beginning of the photoperiod and ran

until its end. O₃ was generated from pure O₂ using two O₃ generators (OZ500; Fischer, Bonn, Germany and CMG3-3; Innovatec II, Rheinbach, Germany) and continuously monitored by an O₃ analyzer (O341M; Environment S.A., Paris, France). Leaf samples were harvested on the first trifoliate leaf, which was fully developed at the onset of the treatments. Leaf samples were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis.

Ozone exposure indices

O₃ exposure and dose were evaluated using respectively the concentration-based index AOT40 (O₃ exposure accumulated over a concentration threshold of 40 ppb) and the flux-based index POD_Y (Phytotoxic Ozone Dose over an instantaneous flux threshold of Y nmol.m⁻².s⁻¹). Following the notation of Mills et al., (2011) the indices may be written as:

$$AOT40 = \sum_{i=1}^N \max(c_i - 40, 0) \Delta t$$

and

$$POD_Y = \sum_{i=1}^N \max(F_{st,i} - Y, 0) \Delta t$$

The calculation of AOT40 and POD₀ is based on hourly values of O₃ concentration (c_i in ppb) or stomatal flux (F_{st,i} in mmol.m⁻²), respectively. N refers to the number of hours to be included in the calculation period and Δt = 1 h. Only daylight hours were considered. The stomatal uptake of O₃ (F_{st}) was calculated as described by Bagard et al. (2008).

Sampling procedure

At the beginning of the fumigation period, the first trifoliolate leaves were already fully developed. Thus, the same leaves were monitored throughout the experiment. Leaf phenology is a decisive factor influencing O₃ sensitivity of plants. It is widely accepted that mature leaves are more sensitive to O₃ than younger, expanding ones (Bagard et al., 2008; Pääkkönen, Metsärinne, Holopainen, & Kärenlampi, 1996; Strohm et al., 1999).

Shoot weight, relative water content and stomatal conductance determination

Shoots (trifoliolate leaves, petioles and stems) were collected at the end of the experiment and weighed to obtain the shoot fresh weight (SFW). The relative water conductance (RWC) was monitored at 3, 7 and 14 days after the stress application and it was calculated according to Weatherley (1950) [RWC% = (FW - DW) × 100/TW, where FW is the fresh weight; DW, dry weight and TW, turgid weight]. Turgid weight was obtained by placing the leaf discs (2 cm diameter) for 24h on filter paper imbibed with distilled water at 8°C. Stomatal responses (g_s) were regularly monitored with a SC-1 leaf porometer (Decagon Devices, Pullman, WA).

DAB staining and MDA assay

Hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation was examined by using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining. DAB solution (1mg.mL⁻¹) was vacuum infiltrated in 1 cm diameter leaf discs and let impregnated for 24h in the dark. After this time, leaf discs were discolored with three successive 95% ethanol washing and stored in glycerol 30%. Pictures were taken with a stereoscopic microscope under 0.8 x magnification (Nikon SMZ1000) coupled with a digital camera (Nikon D70S). The

malondialdehyde (MDA) assay was performed according to Hodges et al. (1999).

Ascorbate and Glutathione Determination

To determine ascorbate and glutathione content in leaf extracts, the protocol described by Queval & Noctor (2007) was followed with slight modifications. Leaf were harvested, ground in liquid nitrogen, and then ground in 1 mL of 1 M HClO₄. After thawing, samples were centrifuged for 15 min at 15,000g and 4° C. The pH of the clarified supernatant was adjusted to 5.6 with K₂CO₃, and insoluble KClO₄ was removed by centrifugation. Ascorbate and glutathione were measured in the same supernatant. Total ascorbate contents were measured as the ascorbate oxidase-dependent decrease in A₂₆₅ before (reduced ascorbate) and after (total ascorbate) treatment of the sample for 15 min with 0.1 M DTT. The 1-mL reaction mixture contained 0.12 M NaH₂PO₄, pH 5.6 and 0.1 mL of extract. The difference in A₂₆₅ before and after the addition of 1 unit of ascorbate oxidase was converted to ascorbate concentration (A₂₆₅ 12.6 mM 1 cm 1) (Dutilleul et al., 2003). Total glutathione contents were measured using the enzymatic recycling assay, which involves the NADPH-driven glutathione-dependent reduction of 5,5-dithiobis 2-nitrobenzoic acid at 412 nm (Dutilleul et al., 2003).

Chlorophyll fluorescence measurement

Modulated chlorophyll fluorescence emission from the upper surface of the leaf was measured with a Pulse Modulated Chlorophyll Fluorometer (FMS 1, Hansatech, Norfolk, UK). First of all, F_o and F_s (minimum fluorescence yield of dark- and light-adapted leaves, respectively), as well as, F_m and F_m' (maximum fluorescence yield of dark and light-adapted leaves, respectively) were obtained with the application of

a saturating pulse. The ratio F_v/F_m and the effective quantum yield of PSII was calculated according to Genty et al. (1989). The non-photochemical quenching (qN) was calculated according to Kooten & Snel (1990)

Statistical analysis

For a given parameter at a given time point, the differences between treatments was tested through the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey or Student post-hoc tests ($\alpha = .05$).

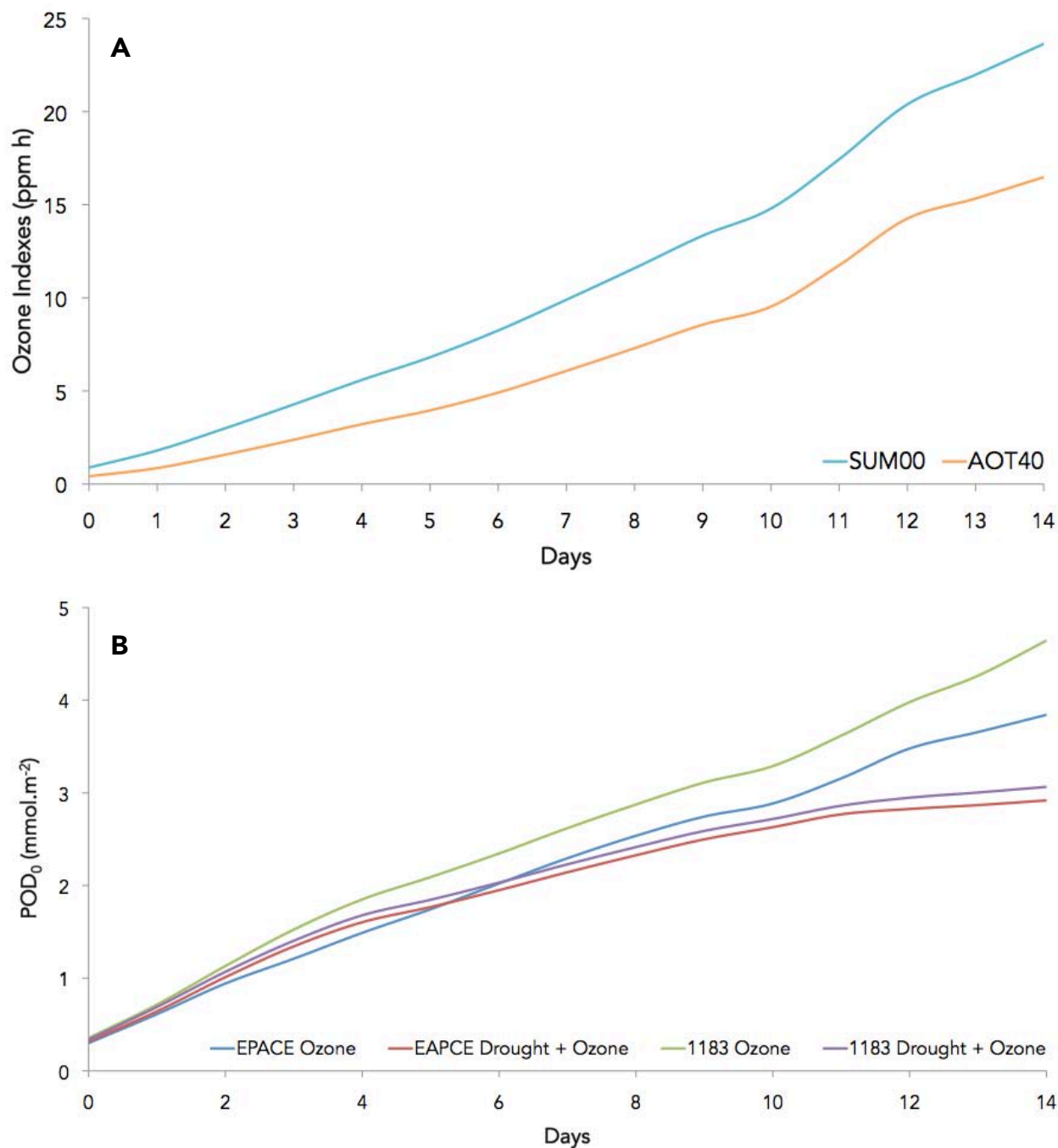


Figure 23. Evolution of the ozone exposure indices during the 14 days of treatment of *Vigna unguiculata* plants.
 (A) Ozone exposure indices (AOT40 and SUM00, in ppm h)
 (B) Ozone flux entering the leaves (POD₀, in mmol.m⁻²)

Results

Ozone indices

Two ozone indices were used in this study. The first one, AOT40, is based on the external ozone concentration (exposure) while the second one, POD₀, rather indicates absorbed dose through stomata. At the end of the fumigation period, the AOT40 index reached a maximum of 16.47 ppm h (figure 23A). To calculate the POD₀ index, it is necessary to take into account the stomatal conductance (g_s). As a consequence of a higher stomata conductance, the POD₀ for 1183 reached a final value of 4.64 mmol.m⁻², slightly higher than for EPACE (3.84 mmol.m⁻²). The value of POD₀ in D+O or O plants were not statistically different, however an important tendency to have lower POD₀ value with the combination of treatments occurred, particularly 14 days after the stress was applied (figure 23B). This tendency was seen for both cultivars as the result of a stomata closure due to the drought stress.

Stomatal conductance

Firstly the stomatal conductance of the control plants was measured (data not shown), and the results showed that at days 1 and 3 the conductance was higher for EPACE (around 30% higher than 1183). For the other sampling dates, the difference of the stomatal conductance between the two cultivars was not significant. Lower values of conductance were noted from the day 5 until the end of the experiment. This drop in stomatal conductance could be attributed to the shade caused by the development of the upper leaves. The O₃ treatment alone (O) tended to diminish stomatal conductance, with a higher closure for the cultivar EPACE (figure 24). The plants subjected to water deprivation (D and D+O) progressively closed their stomata (figure 24). After 5 days the degree of opening reached 75 and 70% for

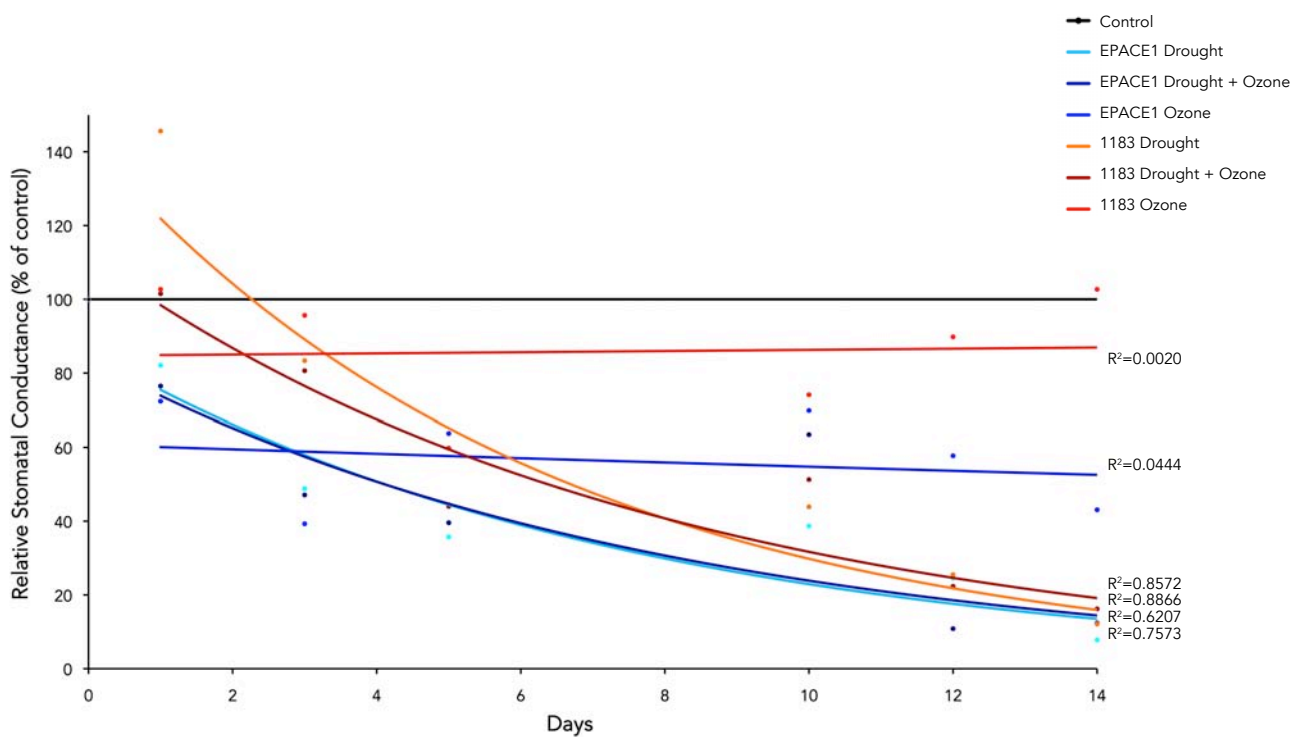


Figure 24. Relative stomatal conductance (g_s) of leaves of *Vigna unguiculata* submitted to different treatments compared to the control.

1183 cultivar, under D and D+O respectively. On the other hand, EPACE showed a stomatal closure around 50% on the fifth day. After 14 days the discrepancy between the two cultivars became lower for plants subjected to drought (D) and to combined O₃ exposure and drought (D+O). The evolution of stomatal conductance under D+O followed almost the same profile as drought alone (D) for the EPACE cultivar. However for 1183, a tendency to a weaker stomata closure could be observed at the beginning of the combined treatment (until 5 days) for the D+O plants by comparison with D treatment. After 14 days the differences between D and D+O treatments have disappeared for this cultivar (figure 24). For EPACE, no difference was noted all along the stress period between D and D+O.

Water and growth parameters

Relative water content (RWC) and shoot fresh weight (SFW) were determined on *Vigna unguiculata* plants throughout the experiment (figure 25). In response to O treatment, changes in RWC were not significant differently at day 7 and day 14 for the two cultivars. However, the RWC in 1183 leaves tended to be lower than EPACE at day 14 (figure 25). Changes in SFW were more pronounced for the 1183 cultivar under O₃ with a reduction of 25% at day 7 and 14 when compared to EPACE (figure 26). EPACE plants submitted to O₃ did not show any significant difference when compared to the control condition. The response of RWC and SFW in D and D+O plants did not differ. Under D and D+O the RWC was lower for EPACE when compared to 1183 at 14 days. A decrease in RWC values of 10% and 25% on day 7 and day 14 respectively, were noted for EPACE, while 1183 showed a reduction of 7% and 15% respectively (figure 25). The same profile was observed for SFW values. Indeed, for the two cultivars, drought combined or not with O₃, diminished SFW by 40% and 70% on day 7 and day 14 respectively (figure 26). So drought stress alone

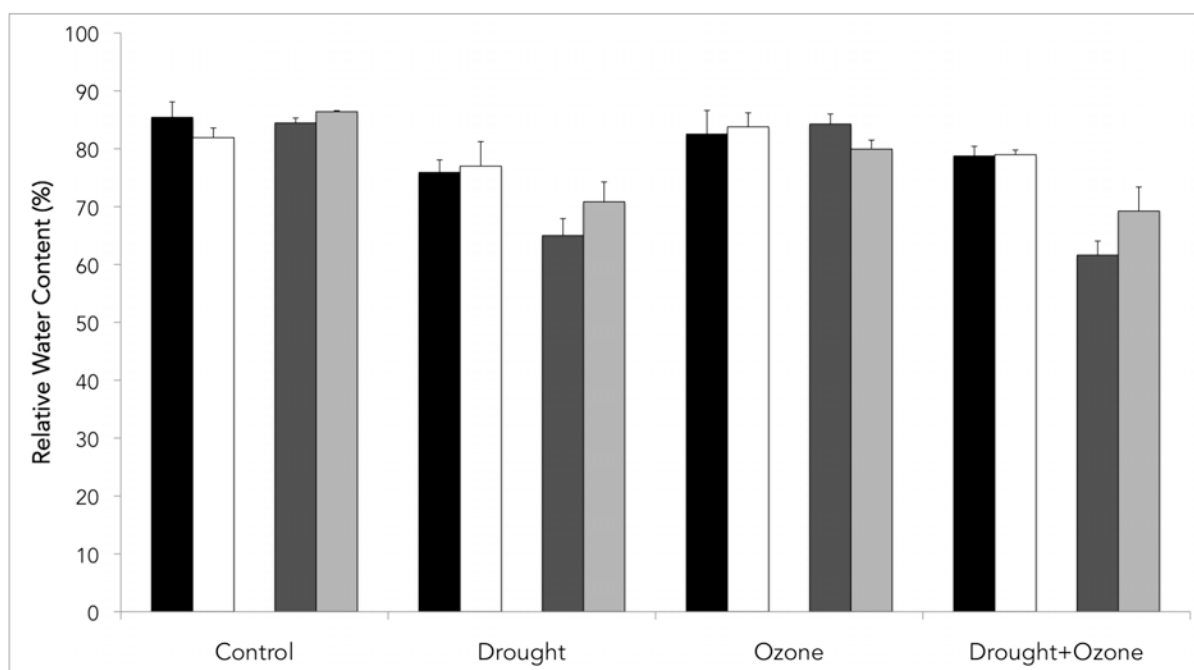


Figure 25. Relative water content of *Vigna unguiculata* plants exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days. The different experimental times and cultivars are referred as follow: Epace 7 days (black bars), 1183 7 days (white bars), Epace 14 days (dark gray bars) and 1183 14 days (light gray bars).

drastically impaired shoot development of the two cultivars and the O₃ treatment had only an effect on 1183 cultivar.

Symptoms of oxidative stress

Leaf discs were stained with DAB to detect the presence of H₂O₂ as a marker of oxidative stress. At day 7, EPACE plants did not show any noticeable difference whatever the treatment applied (figure 27). Even the plants subjected to O₃ treatment alone showed a slightly diffuse reddish color. At day 14, only leaves of O₃-treated plants showed distinct dark red spots (figure 27), whereas the cultivar 1183 showed a distinct profile. On day 7, only plants subjected to drought showed slightly stained spots symptoms, which were amplified under D+O treatment. On day 14, the plants of 1183 subjected to O₃ treatment showed a very strong presence of H₂O₂, even more remarkable than for EPACE plants (figure 27). By contrast, no symptoms were detected on D and D+O plants. MDA levels were also analyzed to assess the level of lipid peroxydation as a marker of oxidative damage of the leaf tissues. The cultivar EPACE did not show any significant differences after 7 and 14 days, although stress-treated plants tended to show higher MDA contents (figure 28). For the 1183 cultivar, higher level of lipid peroxydation was established on day 7 and occurred in response to the drought treatment, but was no significant for D+O. This effect disappeared at day 14 (figure 28). MDA content were systematically higher for the EPACE cultivar when compared to 1183, except for the plants subjected to D on day 7, for which the content of MDA was the same for both cultivars.

Photosynthesis efficiency

Fluorescence parameters were assessed to estimate the damage caused by the stresses to the photosynthetic apparatus. At day 7, F_v/F_m (the maximum quantum

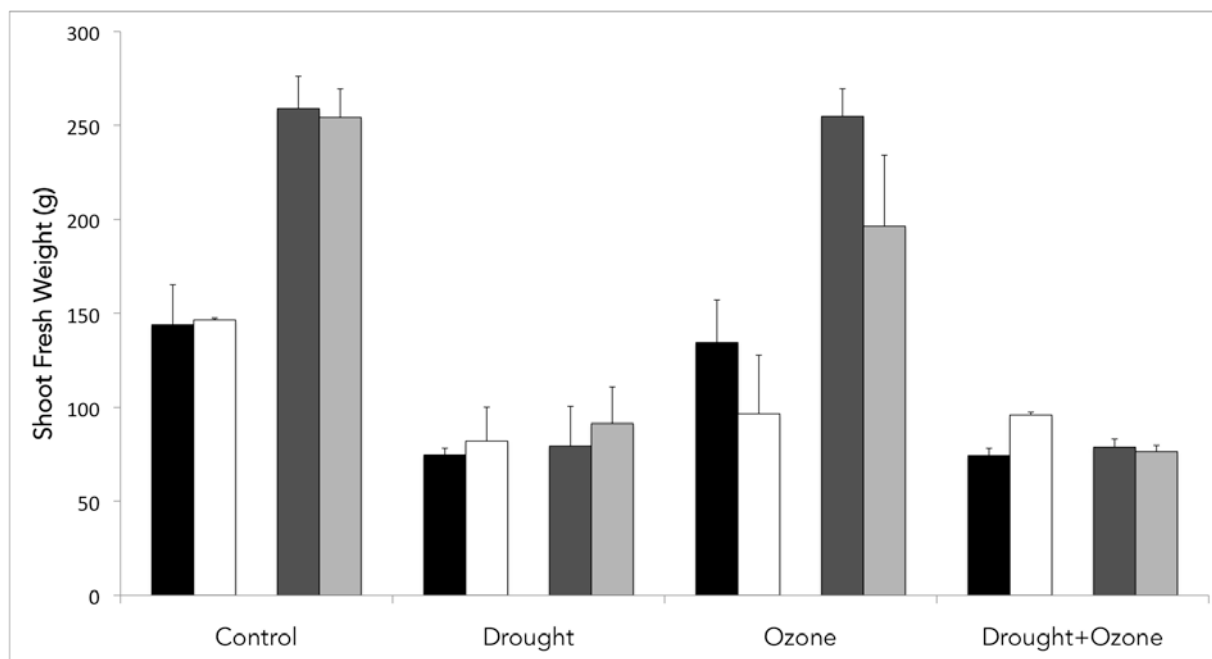


Figure 26: Shoot fresh weight of *Vigna unguiculata* plants exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days. The different experimental times and cultivars are referred as follow: Epace 7 days (black bars), 1183 7 days (white bars), Epace 14 days (dark gray bars) and 1183 14 days (light gray bars).

efficiency of Photosystem II) was not strongly affected for the two cultivars (figure 29). Though, the F_v/F_m was lower to 1183 cultivar when the plants were submitted to D and D+O at 7 days when compared to EPACE. Under ozone this difference between the two cultivars was only observed after 14 days, always lower for the sensitive cultivar. At day 14, the responses differed according the cultivars. For EPACE, F_v/F_m significantly decreased for the D+O treatment (figure 29) when compared to control ones. The tendency was similar for 1183 but the inhibition was more pronounced in response to O_3 treatment alone (figure 29). The PSII quantum yield (ϕ_{PSII}) decreased at the day 14 for the two cultivars (figure 30A), while no significant changes were noted at day 7. Nevertheless, 1183 plants showed systematically higher ϕ_{PSII} values at day 14 when compared to EPACE. By contrast, changes concerning the qN seemed to be more pronounced at day 7 (figure 30B). At this time, an increase was noted for all the treatments for EPACE but 1183 cultivar showed lower values of qN (30%) when compared to EPACE. The 1183 cultivar showed more important variations only for the drought treatments (D and D+O) at 7 days (figure 30B).

Antioxidant metabolites

To assess the detoxification network, content of ascorbate and glutathione in the leaves of treated plants was analyzed. The total ascorbate content of EPACE cultivar did not show any difference after 7 days of treatments (figure 31A). Ozone tended to decrease the ascorbate content for 1183 at day 7 and this effect was also present for D+O plants when compared to control. EPACE treated plants compared to control revealed, at day 14, a slight increase in response to D and D+O treatments, while ascorbate content decreased under ozone. For the cultivar 1183, ascorbate content increased at day 14 under D and D+O conditions and this effect already began for drought alone at day 7 (figure 31A). At 7 days, a reduction of the

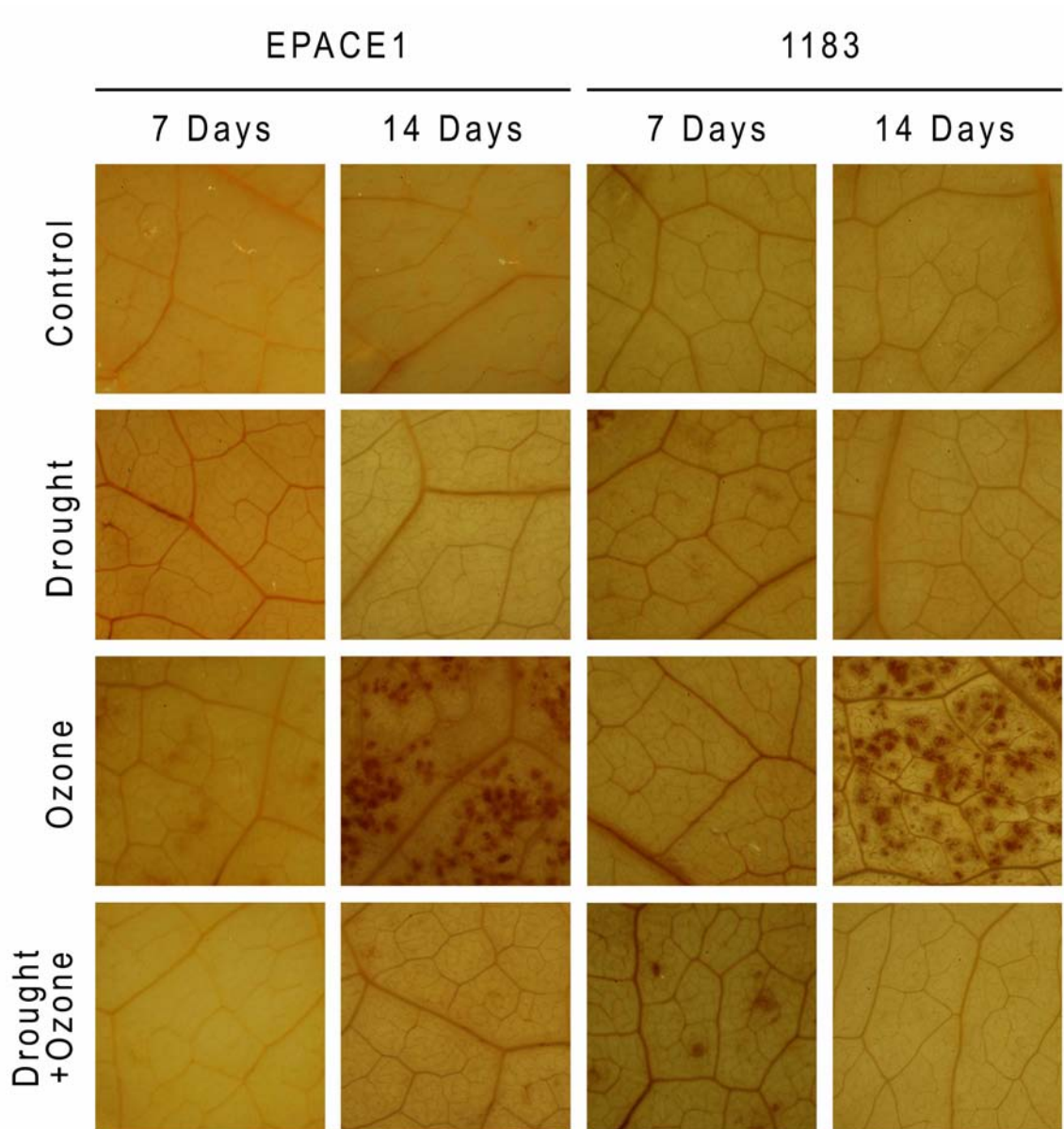


Figure 27. Detection of hydrogen peroxide using DAB staining of *Vigna unguiculata* leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days.

Pictures are representative of three independent biological replicates. No specific staining was observed in control-treated leaves with ascorbic acid (data not shown). (DAB: 3,3'-diaminobenzidine)

ascorbate content was perceived for 1183 plants under O and D+O treatments when compared to EPACE ones, and at 14 days the ascorbate content was systematically higher for 1183 plants, compared to EPACE. At 14 days, the 1183 ascorbate content values were 95, 175 and 110% higher when compare to EPACE under D, O and D+O, respectively (figure 31A). Concerning the glutathione profile, there was no drastic difference between the two cultivars, except for 1183 plants at 14 days subjected to O and D+O treatments, for which a reduction in glutathione content was perceived (figure 31B). Whatever the stress conditions, an increase at day 7 and day 14 was observed for EPACE (figure 31B). At day 14, the glutathione content reached a higher value under (D+O) treatment. For 1183 cultivar, the glutathione content also increased at day 7 whatever the treatments but at day 14 this effect did not occurred for O plants where glutathione content got back to control levels (figure 31B).

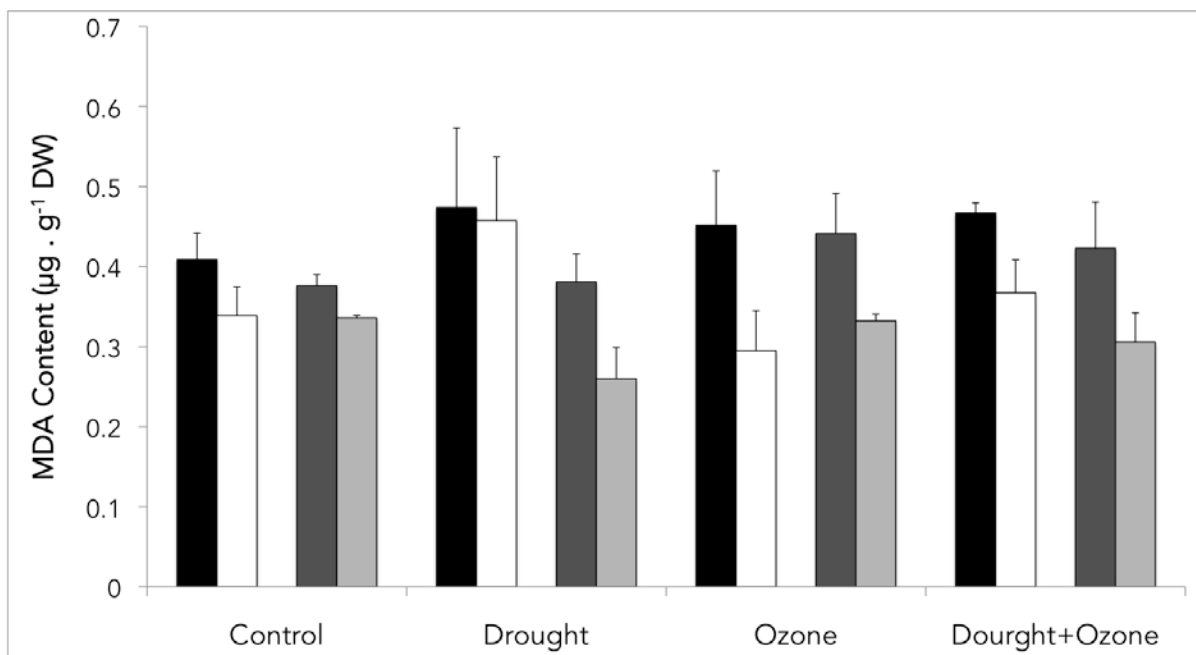


Figure 28. Malondialdehyde content in *Vigna unguiculata* leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days. The different experimental times and cultivars are referred as follow: Epace 7 days (black bars), 1183 7 days (white bars), Epace 14 days (dark gray bars) and 1183 14 days (light gray bars).

Discussion

Nowadays, it is largely accepted that environmental constraints, including drought and ozone exposure, have an unfavorable impact on vegetation (Morgan et al. 2003; Ibáñez et al. 2010). The impact of O₃ exposure on vegetation has been well studied in the last two decades and these works unanimously underlined the fact that O₃ is an important environmental factor that could limit crop yield. Except for a few studies (Dafré-Martinelli et al. 2011; Alves et al. 2011), the effect of ozone on tropical species is still largely unknown, as is the critical ozone level for crops cultivated in tropical regions. A larger number of publications refer to drought for tropical crops, particularly for *Vigna unguiculata* (Ehlers & Hall, 1997). However the combination of drought with another abiotic constraint, particularly with ozone, is still scarcely studied. In this scenario, we investigated the responses of *Vigna unguiculata*, a tropical crop of northeast Brazil, in response to drought, elevated O₃ (120 ppb) and the combination of both, through physiological parameters.

In accordance with Mills et al., (2007) soybean, a *Fabaceae* closely related to *Vigna unguiculata*, is a moderately O₃ sensitive crop with a critical level of 4.3 ppm h O₃ for 5% yield reduction. In our work *Vigna* plants were submitted to a relatively high ozone exposure level that reached an AOT40 of 16 ppm h at the end of O₃ exposure (figure 23A), which is four times higher than the critical level for soybean. At this elevated O₃ exposure level, the growth of *Vigna unguiculata* differed according the experimented cultivar. For EPACE, no significant difference between O₃-treated and control plants were observed in terms of growth, water content and photosynthesis. Conversely, cv 1183 displayed a decrease in the SFW under ozone exposure, when compared to the control plants. The different behavior of these cultivars could be partly explained by a difference of stomata conductance with a tendency for EPACE to close its stomata and reduced the amount of absorbed ozone (see POD₀) (figure

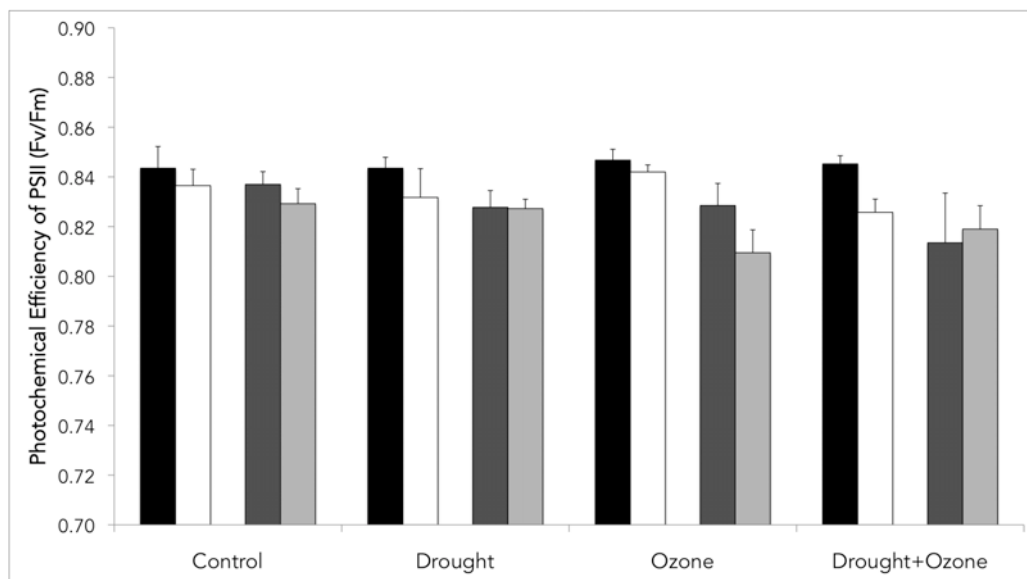


Figure 29. Photochemical efficiency of PSII of *Vigna unguiculata* leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days.

The different experimental times and cultivars are referred as follow: Epace 7 days (black bars), 1183 7 days (white bars), Epace 14 days (dark gray bars) and 1183 14 days (light gray bars).

23B). A lower stomatal conductance for tolerant genotype has been already described in poplar (Di Baccio et al, 2008) in response to ozone. Another explanation could be in the difference of antioxidant cell capacity. Divergent results have been published to link higher ascorbate content with a higher tolerance to ozone. Thus in *Plantago* (Zheng et al, 2000) and snap bean (Burkey et al., 2000), leaf ascorbate was identified as a potential factor in ozone tolerance. By contrast, apoplastic or symplastic ascorbate did not contribute to ozone tolerance in white clover clones (D'Haese, Vandermeiren, Asard, & Horemans, 2005). Our results also seem to rule out such relation between ascorbate and ozone tolerance with higher amounts of ascorbate in the sensitive cultivar (1183) at the end of the O₃ treatment. By contrast, in response to O₃ treatment, the glutathione content had been increased and kept at this level in EPACE while in 1183 it reached again the control value at the end of the O₃ treatment. Apparently, the glutathione content could be related to the tolerance of cv EPACE to ozone. However, D'Haese et al (2005) showed that two differing cultivars of *Trifolium repens* (one O₃-tolerant and the other O₃-sensitive) did not differ in the glutathione content. Further evidence is needed in order to determine if the higher GSH content, as well as its redox status is determinant of O₃ tolerance.

Leaf phenology is a decisive factor that influences ozone sensitivity in plants. It is widely accepted that mature leaves are more sensitive to ozone than younger, expanding ones (Pääkkönen et al. 1996; Strohm et al. 1999; Bagard et al. 2008). Therefore, working with the first trifoliate leaf, which was completely developed at the beginning of the treatments, allowed us to observe ozone injuries. H₂O₂ accumulation was detected in the leaves of O₃-treated plants after 7 days and to a greater extent after 14 days treatment for both cultivars, yet 1183 showed again to be more affected by the ozone exposure regarding the greater extent of H₂O₂ detection on the leaves of this cultivar (figure 27). The higher H₂O₂ level in O₃-exposed plants could be explained by the instability of ozone and its decomposition

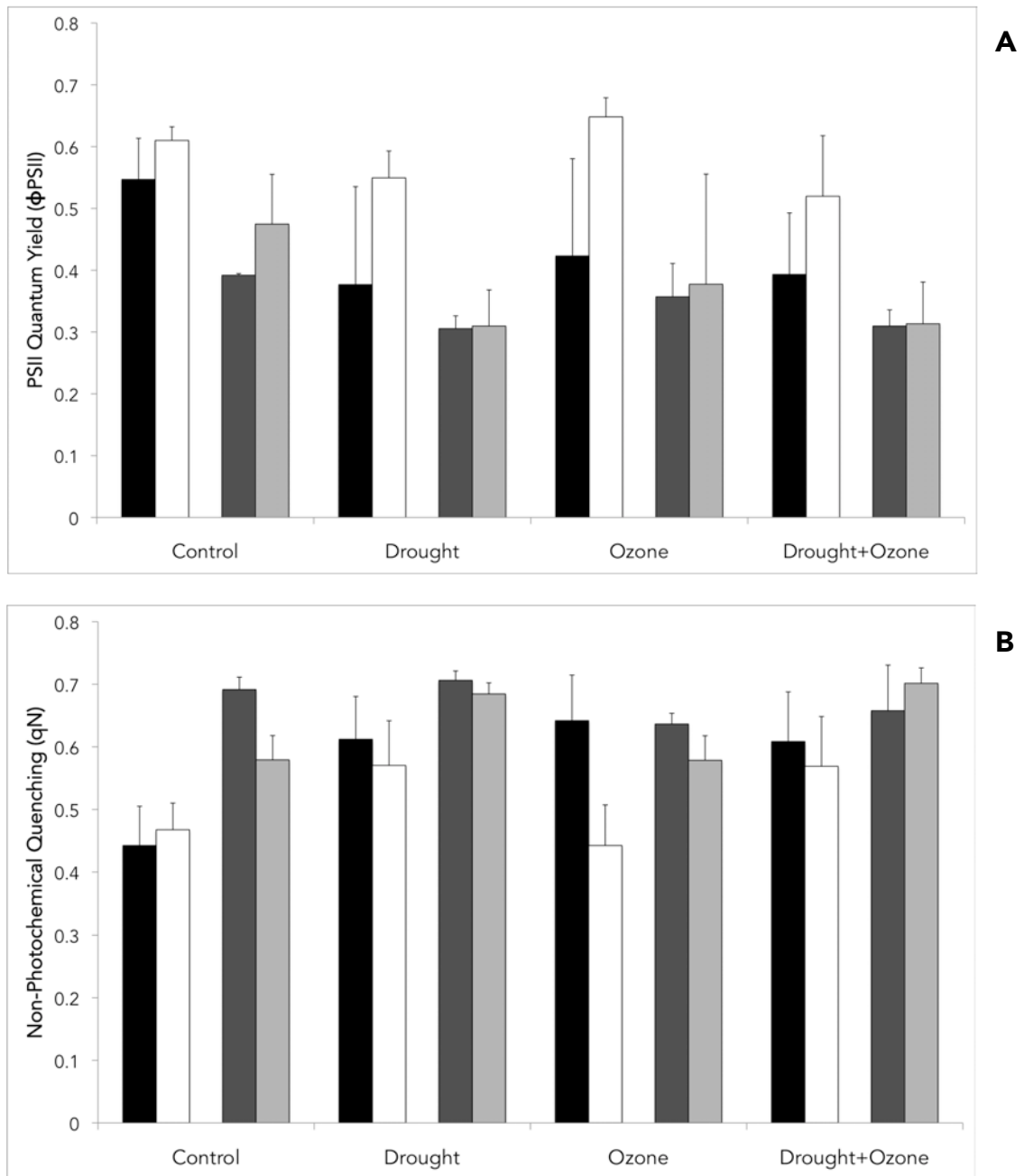


Figure 30. Photosynthesis efficiency of *Vigna unguiculata* leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days. (A) Effective PSII quantum yield (ϕ_{PSII}) and (B) non-photochemical quenching (qN). The different experimental times and cultivars are referred as follow: Epace 7 days (black bars), 1183 7 days (white bars), Epace 14 days (dark gray bars) and 1183 14 days (light gray bars).

within leaf tissues, which leads to the formation of reactive oxygen species (ROS) such as H_2O_2 (Kangasjärvi et al. 1994). In our experiment, ozone also accelerated leaf damage, abscission and senescence (data not show), as mentioned in previous works (Pell et al. 1997; Wittig et al. 2007). We also noted that at the end of the O_3 -exposure period (14 days) a decrease of F_v/F_m and of Φ_{PSII} under ozone was more pronounced for 1183. All these results reinforce that under ozone the 1183 cultivar is more sensitive than EPACE.

Drought stress is known to be one of the most severe stresses to the plants and most of the damage caused by drought is linked to ROS formation. There are many studies that report on increased ROS accumulation and oxidative stress under drought. In fact, under drought, ROS production is enhanced through multiple ways (Dat et al., 2000; Mittler, 2002). For instance, the limitation on CO_2 fixation will reduce NADP^+ regeneration through the Calvin cycle, hence involving an over reduction of the photosynthetic electron transport chain. In our experiment, drought treatment alone affected the relative water content and the shoot fresh weight of both cultivars in the same extent. However, stomatal conductance was slightly differently affected. While the tolerant cultivar (EPACE) showed a more immediate response with a more strong stomatal closure very early, the sensible one (1183) showed a retarded response. However if the sensitive cultivar showed a higher value of stomatal conductance, some growth parameters (SFW & RWC) did not show any difference from the tolerant cultivar (figures 25 and 26). Another, parameter that indicates the difference between the two cultivars is the DAB staining. For plant subjected to drought alone, 1183 plants showed diffused stains after 7 days, and the MDA levels were significantly higher for the D plants at 7 days too. The tolerant cultivar did not show any of these signs. The stomatal closure is frequently suggested as the more important sign of drought symptoms, their closure favors the decrease of water loss, but on the other hand it leads to an impairment of the Calvin cycle and ultimately photo-oxydative damages to the unbalanced light and dark

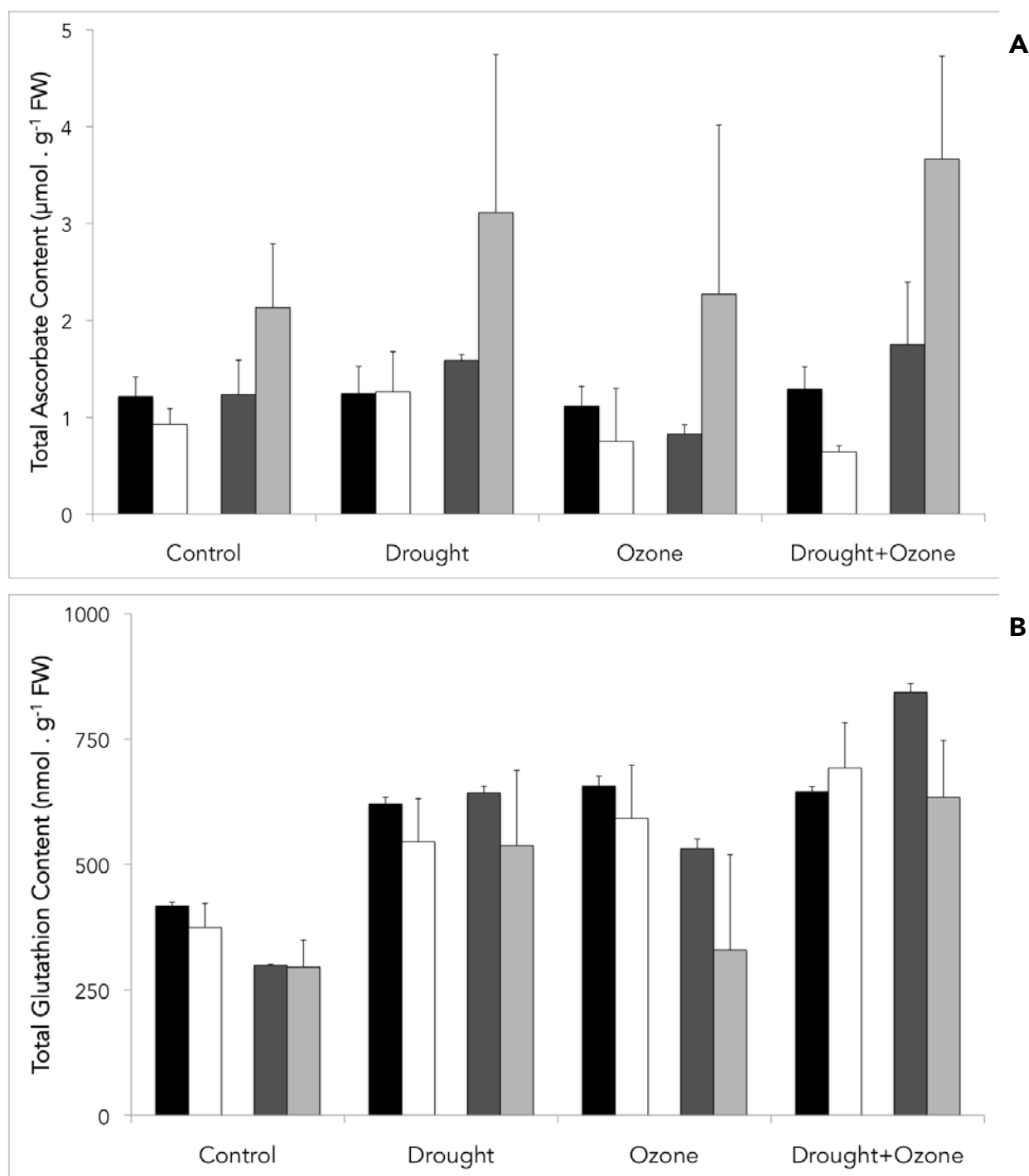


Figure 31. Antioxydant content measurements in *Vigna unguiculata* leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days.

(A) Total ascorbate and (B) total glutathione content. The different experimental times and cultivars are referred as follow: Epace 7 days (black bars), 1183 7 days (white bars), Epace 14 days (dark gray bras) and 1183 14 days (light gray bars).

reactions. Nevertheless, 1183 showed more signs of oxidative damage, than EPACE. Therefore the more important factor to avoid drought-induced oxidative damage is a highly balanced ROS scavenging system. In this regards, the tolerant cultivar, showed no significant differences in the total ascorbate content under drought while the glutathione content was increased since 7 days of stress and this increase was higher on the 14th days. Concerning 1183, a different profile was observed for, the ascorbate content which increased since 7 days and continued on the 14th day. For the glutathione the same profile as EPACE was observed. Anyhow the higher ascorbate content of did not spare 1183 of the oxidative damage. The increase of the glutathione content in both cultivars could indicate a particular role of glutathione metabolism in response to drought. These changes are not necessary linked to Halliwell-Asada cycle regulation if we considered that glutathione reductase activity was not modified in response to drought (Torres-Franklin et al , 2008). However, GSH is the reducing co-substrate for many enzymes involved in ROS detoxification, thus playing a central role as an antioxidant (Noctor et al., 2012). Drought and the combination of drought and ozone, resulted in down-regulation of the photosynthetic linear electron transport in the leaves of EPACE and 1183 cultivars, and an increase in the non-photochemical quenching of fluorescence, which could correspond to heat dissipation in the antenna system (Müller et al., 2001). However, the decrease of F_v/F_m at the end of the stress period in both plant cultivars was very small, suggesting that chloroplasts are protected by mechanisms that dissipate excess excitation energy to prevent damage to the photosynthetic apparatus under adverse conditions (Ibáñez et al., 2010). These results of chlorophyll fluorescence reinforce the assumption that at least under drought and the combination of stresses, a non-photochemical quenching would prevent damages to the photosynthetic apparatus (Ibáñez et al., 2010). Nonetheless, the plants of the 1183 cultivar subjected to drought and the combination of stresses showed some diffuse spots of H₂O₂ content after 7 days. This could be attributed to the difference

of tolerance to drought of the two cultivars. MDA formation resulting from the reaction of ROS with polyunsaturated lipids (Bielski et al. 1982) was perceptible only for the cultivar 1183 after 7 days under drought treatment.

Despite the fact that the two cultivars here studied did not show great differences when subjected to drought alone, it seems that they display different degrees of ozone tolerance. A rather important suggestion of this work is that the combination of the constraints seems to reduce the oxidative damage of ozone on the tissues when compared to O₃ exposition alone. Another important feature for ozone tolerance seems to be the differences of glutathione content on the two cultivars, since the tolerant cultivar showed higher accumulation of glutathione on the leaf tissues when exposed to O₃ and the combination of the two studied constraints lead to an even higher glutathione accumulation.

SEGUNDO CAPÍTULO

**5- INVOLVEMENT OF PLASTID TERMINAL OXIDASE (PTOX)
AND MITOCHONDRIAL UNCOUPLING PROTEINS (AOX
AND PUCP) IN THE RESPONSE OF VIGNA UNGUICULATA
TO COMBINED DROUGHT STRESS AND OZONE
EXPOSURE.**

Prefácio

Este capítulo, tem a forma de um artigo (que já foi submetido à revista *Plant, cell and environment*) cujo objetivo geral consiste em analisar as respostas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (cv. Epace) à seca combinada com exposição a doses elevadas de ozônio, em relação ao metabolismo energético. Até agora, nenhum estudo examinou simultaneamente as proteínas desacopladoras (AOX pUCP, PTOX), sob condições de estresse combinado. O objetivo deste trabalho é contribuir para desvendar a regulação dessas três proteínas em resposta à seca e/ou ozônio, ambos conhecidos por causarem estresse oxidativo. *Vigna unguiculata* é uma leguminosa de importância econômica nas regiões semi-áridas, particularmente na região Nordeste do Brasil (Ehlers & Hall, 1997). Em resposta à seca, vários cultivares já foram caracterizadas de acordo com o seu nível de tolerância (Costa et al., 2007). Epace é considerada uma cultivar tolerante à seca (Torres-Franklin et al., 2007). Nos nossos experimentos, as plantas *Vigna unguiculata* foram submetidos à seca com ou sem exposição ao ozônio (120 ppb) em câmaras de cultivos fitotronicas. A expressão do gene da AOX, pUCP e PTOX foi estudada através da análise de PCR em tempo real (qPCR). O genoma nuclear de *Vigna unguiculata* tem três genes que codificam AOX (*VuAOX1*, *VuAOX2a* e *VuAOX2b*) e seis genes que codificam pUCP (*VuUCP1a*, *VuUCP1b*, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4*, *VuUCP5*). Por outro lado, somente um gene PTOX codificada pelo genoma nuclear, foi encontrado em plantas superiores. Além disso, os parâmetros fisiológicos (RWC, condutância estomática, fluorescência da clorofila) e bioquímicos (MDA e TBARS) foram medidos para avaliar como as plantas foram afetadas pelos tratamentos.

No final deste capítulo também é colocado resultados preliminares sobre a quantificação da proteína da AOX das folhas de *Vigna unguiculata* submetidas às diferentes condições de estresses. Dada a necessidade de consolidar os resultados de outras análises, eles não são apresentados nesta publicação que já foi

submetida. No entanto, estes resultados preliminares suportam as conclusões que foram tiradas a partir de análises de expressão e, como tal, merece ser apresentada neste manuscrito.

Involvement of plastid terminal oxidase (PTOX) and mitochondrial uncoupling proteins (AOX and pUCP) in the response of *Vigna unguiculata* to combined drought stress and ozone exposure.

Authors: Yuri Maia^{1,2,3}, Matthieu Bagard⁴, José Hélio Costa¹, Marie-Noëlle Vaultier^{2,3}, Deborah Moura Rebouças^{1,4}, Pierre Grandjean^{2,3}, Pierre Dizengremel^{2,3}, Anne Repellin, Dirce Fernandes de Melo¹ and Yves Jolivet^{2,3}.

¹ Laboratório de Bioenergética, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Av. Mister Hull, s/n, CEP: 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brasil.

² Université de Lorraine, UMR 1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières, IFR110 EFABA, BP 70239, F-54506, Vandœuvre-Lès-Nancy, France

³ INRA, UMR 1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières, IFR110 EFABA, F-54280, Champenoux, France.

⁴ Université Paris Est Créteil, UMR 7618 Bioemco, 94010, Créteil, France

Key words

Vigna unguiculata (L.) Walp., drought, ozone, alternative oxidase, uncoupling protein, mitochondria, plastid, gene expression

Introduction

Abiotic stresses, especially drought, salinity and temperature, are the primary causes of plant loss worldwide (Vinocur and Altman 2005). For the next decades these constraints are predicted to increase as a result of climate changes and of the subsequent increase in greenhouse gas production. Tropospheric ozone (O_3) is both a greenhouse gas and an air pollutant with detrimental effects on vegetation (Ashmore 2005). Recent papers undoubtedly indicate that O_3 background levels in the troposphere are still increasing (Royal Society, 2008). Chronic O_3 exposure can have detrimental effects on both annual and perennial species, including visible leaf injury, reduction in biomass production, accelerated leaf senescence and altered sensitivity to other stresses (Pell et al. 1997; Wittig et al. 2009; Renaut et al. 2009). Drought could intensify the effects of the other stresses plants are submitted to, particularly in combination with O_3 (Matyssek et al. 2006; Morgan et al. 2003; Ibáñez et al. 2010). The root system is the first organ to sense drought. After perception, a signal sent to the leaves triggers stomatal closure and shifts plant metabolism to a water-saving strategy. This strategy can have many side effects which ultimately lead to an overall increase in Reactive Oxygen Species (ROS) production (Cruz de Carvalho 2008). As for ozone, it enters the leaves through stomata, is rapidly transformed into ROS and triggers detoxification processes (Pell et al. 1997; Dizengremel et al. 2008). Thus, plants under stress conditions are forced to balance ROS production/scavenging, and an imbalance of that ratio induces cell damage (Mittler et al., 2011). Besides being essential for cellular energy metabolism, chloroplasts and mitochondria are considered as the primary sites of ROS generation, since their intrinsic activity is to handle oxygen, as a donor or an acceptor of electrons. They are also target organelles that could function as redox sensors through their capacity to detect cellular energy imbalances. Therefore, under conditions of supraoptimal light or suboptimal CO_2 , photoinhibition of

photosynthesis occurs, leading to overexcitation of chloroplast membranes, damage to photosystem II (PSII) and sometimes photosystem I (PSI) (Vass 2011). Mitochondria can dissipate redox equivalents from chloroplasts through the malate/oxaloacetate shuttle and the photorespiratory pathway and thereby avoid damage to thylakoid membranes, using a non-phosphorylating alternative pathway (AOX), as well as uncoupling proteins (Raghavendra and Padmasree 2003; Sweetlove et al. 2006; Pastore et al. 2007). AOX might redirect carbon metabolism through the control of intracellular concentrations of key respiratory intermediates (Vanlerberghe and McIntosh 1997). Additionally, plant mitochondria harbor an uncoupling protein called pUCP. pUCP was at first thought to be specifically found in animal mitochondria and was only observed in plant mitochondria in 1995 (Vercesi et al. 1995). It can dissipate the electrochemical proton gradient in the presence of fatty acids. A plastidial counterpart of AOX, the plastid terminal oxidase (PTOX) was discovered in 1999 (Carol et al. 1999). Because of its homology with AOX, PTOX is also suggested to shunt the classical electron chain in chloroplasts, which could prevent over-reduction of photosystems by keeping a well-oxidized pool of plastoquinones (McDonald et al. 2011). Consistently, *Arabidopsis* PTOX knockout mutants had their activity restored by AOX substitution (Fu et al. 2012). Nevertheless, the role of PTOX in the prevention of ROS formation is still debated (Stepien and Johnson 2009) and the ways PTOX activity could lower the rate of ROS formation under oxidative stress remain to be determined. Anyhow, recent studies show that PTOX, as well as the alternative plastidial pathway called chlororespiration, are induced under abiotic stresses such as high light, heat and drought (Ibáñez et al. 2010; Sun and Wen 2011).

Up to now, no studies have simultaneously investigated the regulation of these uncoupling proteins (AOX, pUCP, PTOX) in stress conditions. The objective of the present paper is to unravel their regulation under drought, ozone and the

combination of both in *Vigna unguiculata* (L.) Walp EPACE cultivar. *Vigna unguiculata* is a leguminous plant important to support the production of livestock and cereals in semi-arid regions, particularly in the Northeast region of Brazil (Ehlers and Hall, 1997). In response to drought, different cultivars have been characterized according to their level of tolerance (Costa et al. 2007). EPACE is considered as a drought-tolerant cultivar (Torres-Franklin et al. 2007). For this purpose *Vigna unguiculata* plants were submitted to watering withdrawal combined or not to 120 ppb O₃ exposure in phytotronic chambers. Expression of AOX, pUCP and PTOX genes was investigated by qPCR analysis. The nuclear genome of *Vigna unguiculata* carries three genes encoding AOX proteins (*VuAOX1*, *VuAOX2a* and *VuAOX2b*) and six genes encoding pUCP proteins (*VuUCP1a*, *VuUCP1b*, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4*, *VuUCP5*). On the other hand, only one PTOX gene, encoded by the nuclear genome, has been found in higher plants. *VuAOX1* and *2b* are differentially regulated under a wide range of abiotic stresses (Costa et al. 2010), and so is *VuUCP1b* (Garantizado et al. 2011). In addition, physiological (RWC, stomatal conductance, chlorophyll fluorescence) and biochemical (MDA and TBARS) parameters were measured in order to evaluate whether or not and to what extent the plants were affected by the treatments.

Materials and Methods

Plant Material, growth conditions and sampling procedure

Vigna unguiculata seeds of a drought-tolerant cultivar were obtained from the UFC Seeds Bank (cv. EPACE). They were surface-sterilized with $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 0.5% for 5 min and rinsed in tap water before sowing into 5-L plastic pots containing compost (N/P/K 14/16/18, 1.2 kg.m^{-3} , Gramoflor Repiquage) fertilized with 15 g of slow-release nutritive granules (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2; Fertil, Boulogne-Billancourt, France). The plants were grown for three weeks in growth chambers in strictly controlled conditions (14 hrs light with photon irradiance of $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ at the plant level / 10 hrs dark, 25/20°C, 80% humidity). During that period, all the plants were well irrigated with tap water kept at room temperature. After that period, the plants at the same developmental stage were transferred to phytotronic chambers (120 cm wide, 117 cm deep, 204 cm high) under the same conditions as previously described for a one-week acclimation period. The plants were then submitted for 14 more days to the following conditions: O_3 fumigation (120 ppb \pm 10ppb) for 12 hrs daily, watering withdrawal (drought), and a combination of O_3 and drought applied simultaneously. A total set of 52 plants was distributed into eight fumigation chambers: 4 with charcoal-filtered (CF) air and 4 with CF air enriched with O_3 . In each chamber, half of the plants were submitted to watering withdrawal while the other plants were regularly watered with tap water. To sum up, 13 plants were referred to as control plants (C), 13 plants were submitted to watering withdrawal (D), 13 plants were exposed to O_3 and kept well-watered (O), 13 plants were exposed to O_3 and deprived of water for the same time period (D+O), referred to as the combination of the two stresses. The daily ozone fumigation period started 2 hrs after the beginning of the photoperiod and ran until its end. Ozone was generated from pure O_2 using two ozone generators (OZ500;

Fischer, Bonn, Germany and CMG3-3; Innovatec II, Rheinbach, Germany) and continuously monitored by an O₃ analyzer (O341M; Environment S.A., Paris, France). Leaf samples were harvested on the first trifoliate leaf, which was fully developed at the beginning of the treatments. Leaf samples were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis.

Ozone exposure indices

Ozone exposure and dose were evaluated using respectively the concentration-based index AOT40 (ozone exposure accumulated above a concentration threshold of 40 ppb) and the flux-based index POD_Y (Phytotoxic Ozone Dose over an instantaneous flux threshold of Y nmol.m⁻².s⁻¹). Following the notation of Mills et al., (2011) the indices may be written as:

$$AOT40 = \sum_{i=1}^N \max(c_i - 40, 0) \Delta t$$

and

$$POD_Y = \sum_{i=1}^N \max(F_{st,i} - Y, 0) \Delta t$$

The calculation of AOT40 and POD₀ is based on hourly values of ozone concentrations (c_i in ppb) or stomatal fluxes ($F_{st,i}$ in mmol.m⁻²), respectively. N refers to the number of hours to be included in the calculation period and $\Delta t = 1$ hr. Only daylight hours were considered. Stomatal ozone uptake (F_{st}) was calculated as described by Bagard et al. (2008).

Shoot weight, relative water content and stomatal conductance

Shoots (trifoliate leaves, petioles and stems) were collected at the end of the experiment and weighed to obtain shoot fresh weight (SFW) values. The relative water content (RWC) was monitored 3, 7 and 14 days after the stresses were applied and it was calculated according to Weatherley (1950) [$RWC\% = (FW - DW) \times 100/TW$, where FW is fresh weight; DW, dry weight and TW, turgid weight]. Turgid weight was obtained by placing 2-cm diameter leaf discs for 24hrs at 8°C on filter paper imbibed with distilled water. Stomatal responses (g_s) were regularly monitored with an SC-1 leaf porometer (Decagon Devices, Pullman, WA).

DAB staining and MDA assay

Hydrogen peroxide (H_2O_2) accumulation was investigated using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining. DAB solution (1 mg.mL^{-1}) was vacuum-infiltrated into 1-cm diameter leaf discs and the disks were left to impregnate for 24 hrs in the dark. After that, leaf discs were discolored in three successive 95% ethanol baths and stored in glycerol 30%. Pictures were taken with a stereoscopic microscope under 0.8 x magnification (Nikon SMZ1000) coupled with a digital camera (Nikon D70S). The malondialdehyde (MDA) assay was performed according to Hodges et al. (1999).

Chlorophyll fluorescence measurement

Modulated chlorophyll fluorescence emission from the upper surface of the leaf was measured with a Pulse Modulated Chlorophyll Fluorometer (FMS 1, Hansatech,

Norfolk, UK). First, F_o and F_s (minimum fluorescence yield of dark- and light-adapted leaves, respectively), as well as F_m and F_m' (maximum fluorescence yield of dark- and light-adapted leaves, respectively) were obtained by applying a saturating pulse. Effective quantum yield of PSII was calculated according to Genty et al. (1989). The non-photochemical quenching (qN) was calculated according to Kooten & Snel (1990)

Total RNA extraction and real-time RT-PCR

Leaves were ground in liquid nitrogen using mortar and pestle. Total RNA was then extracted using TRIzol Plus RNA Purification Kit (Life Technologies Corporation). After the extraction, RNA (50 μ g) was DNA-digested with Turbo DNA-Free (Invitrogen). Total RNA (1 μ g) was heated to 65 °C for 5 min and then cooled on ice for 2 min. The reverse transcription was performed using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio–Rad). Real-Time PCR reactions were performed with iQ™ SYBR Green Supermix (Bio–Rad) and specific primers for each target reaction (Table 1) in an iCyclerIQ™ Real-Time PCR Detection System (Bio–Rad). Primers were obtained from both gene sequences retrieved from the genespace sequence (GSS) database of Cowpea Genomics Initiative (CGKB) (Chen et al. 2007) and from the NCBI gene bank (Table 1). The reference gene (*VuEF1 α*) showing the highest stability was selected using GeNorm (Vandesompele et al. 2002). The expression data presented in the figures are averaged from 3 biological replicates, in turn averaged from 3 technical replicates. PCR efficiency was between 80% and 110%, depending on primer pairs and on the CT values for each sample that were acquired by iCycler IQ™ software (Biorad).

For each gene, the expression level in treated samples (D, O and D+O) was normalized to the expression level measured in control samples. Target gene

Table 1. Primer pairs designed for real-time PCR.

	Forward		Reverse		
<i>VuAOX1</i>	5'	AAGATGGAGAAGAAGTTGGT	3'	5' TGTATGTCTCCCATGGCCTA	3'
<i>VuAOX2a</i>	5'	CTTCTGATATCCACTTTCAAGGT	3'	5' GGTGTCATGGTAAAGGACTG	3'
<i>VuAOX2b</i>	5'	CTTCAAGGAACGGTATGGG	3'	5' AGAGTGCTGAAACTTCCTC	3'
<i>VuUCP1a</i>	5'	AGCTGGTGATGTAATATCCG	3'	5' CCCAATTCTCAAACCTCCG	3'
<i>VuUCP1b</i>	5'	AAACAGCCTGTGATTGGTGAC	3'	5' CCATTCACACATTGACGTTGTAG	3'
<i>VuUCP2</i>	5'	TCTGGACACAGCTAAGGCC	3'	5' TTCCACAGAGCTGATATACCC	3'
<i>VuUCP3</i>	5'	GTTGGGTATGAGCATCTGAG	3'	5' AGGGCTGGCTATAATCTGAG	3'
<i>VuUCP4</i>	5'	TGGATTGTGCTCTGAAGACG	3'	5' CCTTAAGCAACTTGCGAACC	3'
<i>VuUCP5</i>	5'	TTCTGTTGCATCGAATCCT	3'	5' CTTATAAAGGGCAAGAGGT	3'
<i>VuPTOX</i>	5'	TCCAAATCATCTCCACTTCAC	3'	5' CTTTATCACAGAATCCGTGAG	3'
<i>VuEF1α</i>	5'	GTAACAAGATGGATGCCACC	3'	5' CCACTTTCTTCAAATACGAGGAG	3'

expression was then normalized to the reference gene expression as described in the following formula:

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CT_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CT_{ref}(control-sample)}}$$

where E is the efficiency of the PCR, CT the cycle threshold, *target* the target gene, *ref* the reference gene, *control* the CT of control plants and *sample* the CT of stressed plants (Pfaffl 2001). The heat map and graphs show the ratio in a log₂ scale. Multi Experiment Viewer software (MeV 4.8.1) was used to draw the heat maps and to perform hierarchical clustering analysis (Saeed et al. 2003).

Bioinformatics

Alignments of PTOX sequences were performed using ClustalW2 online tool (Larkin et al. 2007). Alignments were based on *Arabidopsis* (NM_118352) and *Glycine max* (XM_003546123) amino acid sequences deduced from the NCBI gene bank. The phylogenetic tree was constructed using a neighbor-joining algorithm through bootstrap statistical analysis with MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) software (Kumar et al. 2008). The access numbers of the sequences used to build the phylogenetic tree were: *Glycine max* (XM_003546123), *Medicago truncatula* (XM_003594116), *Lotus japonicus* (AK339732), *Ricinus communis* (XM_002518365), *Populus trichocarpa* (XM_002317154), *Arabidopsis thaliana* (NM_118352), *Arabidopsis lyrata* (XM_002867733), *Solanum lycopersicum* (NM_001247582), *Oryza sativa* (NM_001060734), *Brachypodium distachyon* (XM_003580732), *Sorghum bicolor* (XM_002448683), *Zea mays* (NM_001157308), *Selaginella moellendorffii*

(XM_002980011), *Physcomitrella patens* (XM_001766378), *Ostreococcus lucimarinus* (XM_001420267), *Micromonas pusilla* (XM_003061350), *Volvox carteri* (XM_002950337), *Chlamydomonas reinhardtii*PTOX1 (XM_001703414) and PTOX2 (XM_001692548), *Arachis hypogaea*(GO340514.1 and GO257426.1), *Trifolium pretense* (BB922595.1 and BB919345.1) and *Phaseolus acutifolius* (HO779755 and HO808793).

Statistical analysis

For a given parameter at a given time point, the differences between treatments was tested through the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey or Student post-hoc tests ($\alpha = .05$).

Table 2. Indices of ozone exposure (AOT40, in ppm h) and stomatal uptake (POD₀, in mmol.m⁻²) and relative stomatal conductance (g_s, in percent of the control) 3, 7 and 14 days after the beginning of the experiment. *Vigna unguiculata* plants (cv Epace) were exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments. Letters refer to homogenous subsets given by the ANOVA and Tukey's post hoc tests performed at a given time point. Treatments that share a letter were not statistically different (n = 4; α = .05).

	3 days			7 days			14 days		
	AOT40	g _s	POD ₀	AOT40	g _s	POD ₀	AOT40	g _s	POD ₀
Control	-	100	-	-	100	-	-	100	-
Drought	-	60	-	-	40	-	-	20	-
Ozone	2.37	60	1.21±0.12 ^a	6.07	60	2.29±0.48 ^a	16,47	60	3.84±0.59 ^a
Drought+Ozone	2.37	60	1.34±0.49 ^a	6.07	40	2.14±0.46 ^a	16,47	20	2.92±0.45 ^a

Results

Growth and symptoms

Two ozone indices were determined in this study. The first one, AOT40, is based on the external ozone concentration (exposure) while the second one, POD₀, rather indicates stomatal ozone uptake (dose). At the end of the fumigation period, the AOT40 index reached a maximum of 16.47 ppm h (table 2). To calculate the POD₀ index, it is indispensable to take into account stomatal conductance (g_s). The ozone treatment alone tended to lower stomatal conductance, but no significant differences were found (table 2). For plants subjected to combined O₃ exposure and drought (D+O), the evolution of stomatal conductance followed the same profile as drought alone (D), with strong stomatal closure at the end of the treatment (table 2). Consequently, the evolution of POD₀, based on the O₃ flux entering the leaves, tended to be lower in D+O plants than in O plants (table 2). However, even if this tendency was more remarkable 14 days after the stress was applied, no statistically significant values were noted between the two D+O and O treatments.

Relative water content (RWC) and shoot fresh weight SFW were determined on *Vigna unguiculata* plants throughout the experiment (figure 32A and B). D plants and D+O plants had significantly lower RWC values: -10% and -25% on the 7th and the 14th day after the stress was applied, respectively (figure 32A). The same profile was observed for SFW values. Indeed, drought, combined or not with O₃, diminished SFW by 40% and 70% on the 7th and the 14th day after exposure to the constraints, respectively (figure 32B). So drought stress alone drastically impaired the development of the plants and the presence of O₃ did not have any additional effect on these parameters.

Leaf discs were stained with DAB to detect the presence of H₂O₂ as a marker of oxidative stress. After the 3rd day, plants did not show any noticeable difference

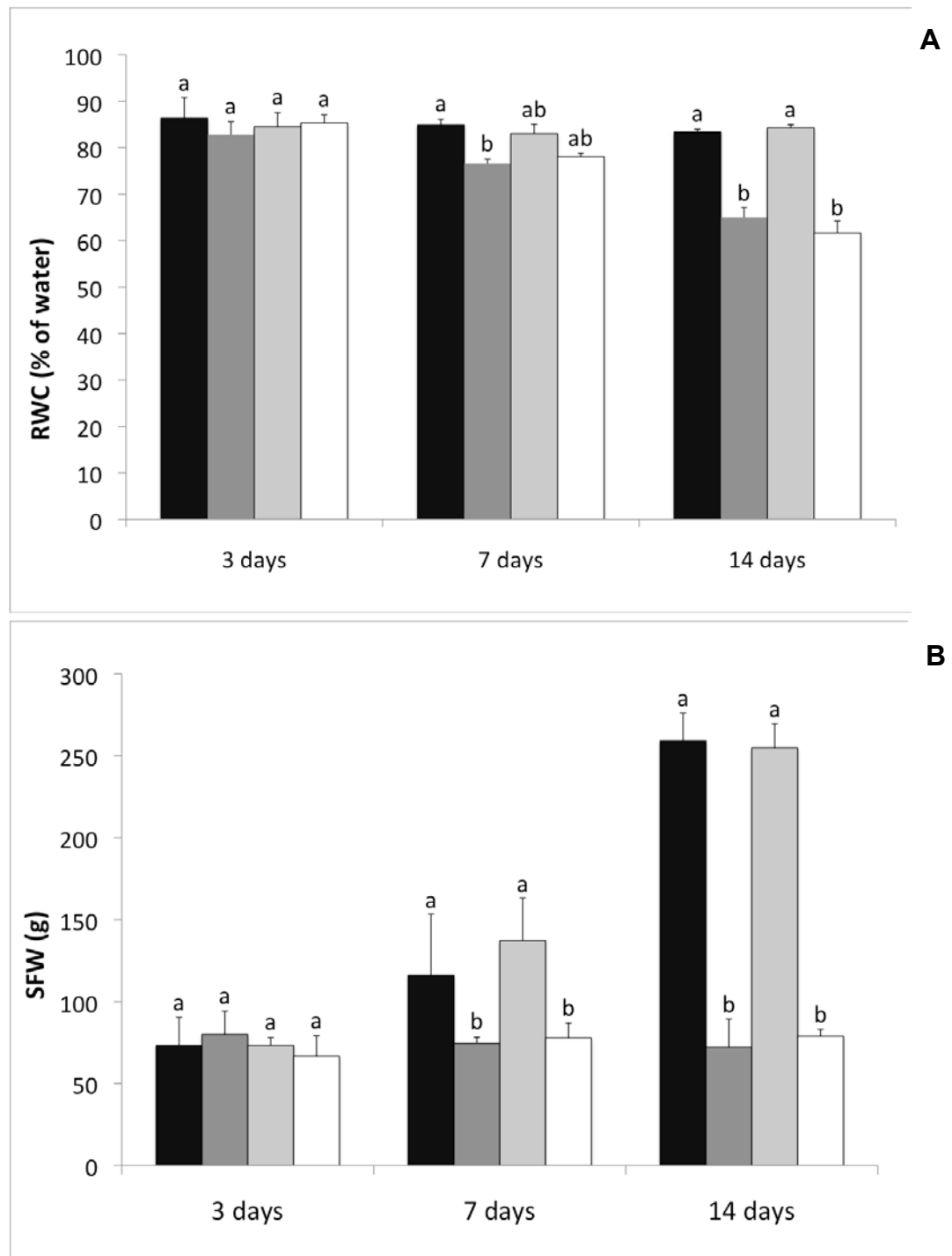


Figure 32. Physiological parameters of *Vigna unguiculata* plants exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 3, 7 or 14 days. (A) Relative water content and (B) shoot fresh weight. Control (black bars), drought (dark gray bars), ozone (light gray bars) and drought + ozone (white bars). Letters refer to homogenous subsets given by the ANOVA and Tukey's post hoc tests performed at a given time point. Treatments that share a letter were not statistically different ($n = 4$; $\alpha = 0.05$).

whatever the treatment applied (figure 33). However, after the 7th day, the plants subjected to O₃ treatment showed a slightly diffuse reddish color, while on the 14th day leaves showed distinct dark red spots (figure 33). After 7 or 14 days treatment, D and D+O leaves displayed much lower levels of H₂O₂ (figure 33). MDA levels were also analyzed to assess the level of lipid peroxidation as a marker of oxidative damage of the leaf tissues. After 3 days, all treatments (D, O and D+O) induced an increase in MDA content as compared to the control leaves (figure 34). After 7 and 14 days, the differences between control and treated plants were not statistically significant, although stressed plants tended to show higher MDA contents (figure 34).

PTOX characterization

A set of 13 mRNA fragments isolated from *Vigna unguiculata* were identified in NVBI and CGBK databases. The *in silico* fragment assembly led to a putative full-length cDNA of 1,369 bp encoding a polypeptide of 331 amino acid residues (Fig 3A). An N-terminal transit peptide (TP), that targets proteins to plastids, was found using SignalP 4.0 software (Petersen et al. 2011) (figure 35). *Vigna* and *Arabidopsis* PTOX protein sequences showed a high degree of homology (67%) and all the amino acids essential for the structure and activity of the protein were conserved (figure 35). In particular, the glutamate and histidine residues (Glu-136, Glu-175, His-178, Glu-227, Glu-296, and His-299) that form the iron-binding site were all present, which is a common feature of PTOX and AOX proteins (Fu et al. 2009). A phylogenetic tree with 23 PTOX protein sequences from plants and other phototrophic organisms was constructed by the neighbor-joining method (figure 36). Sequences from algae, bryophytes, lycophytes and higher plants clustered separately. Among plant PTOXs, sequences from Eudicots and Monocots formed two separate groups. The deduced polypeptide of *V. unguiculata* PTOX clustered

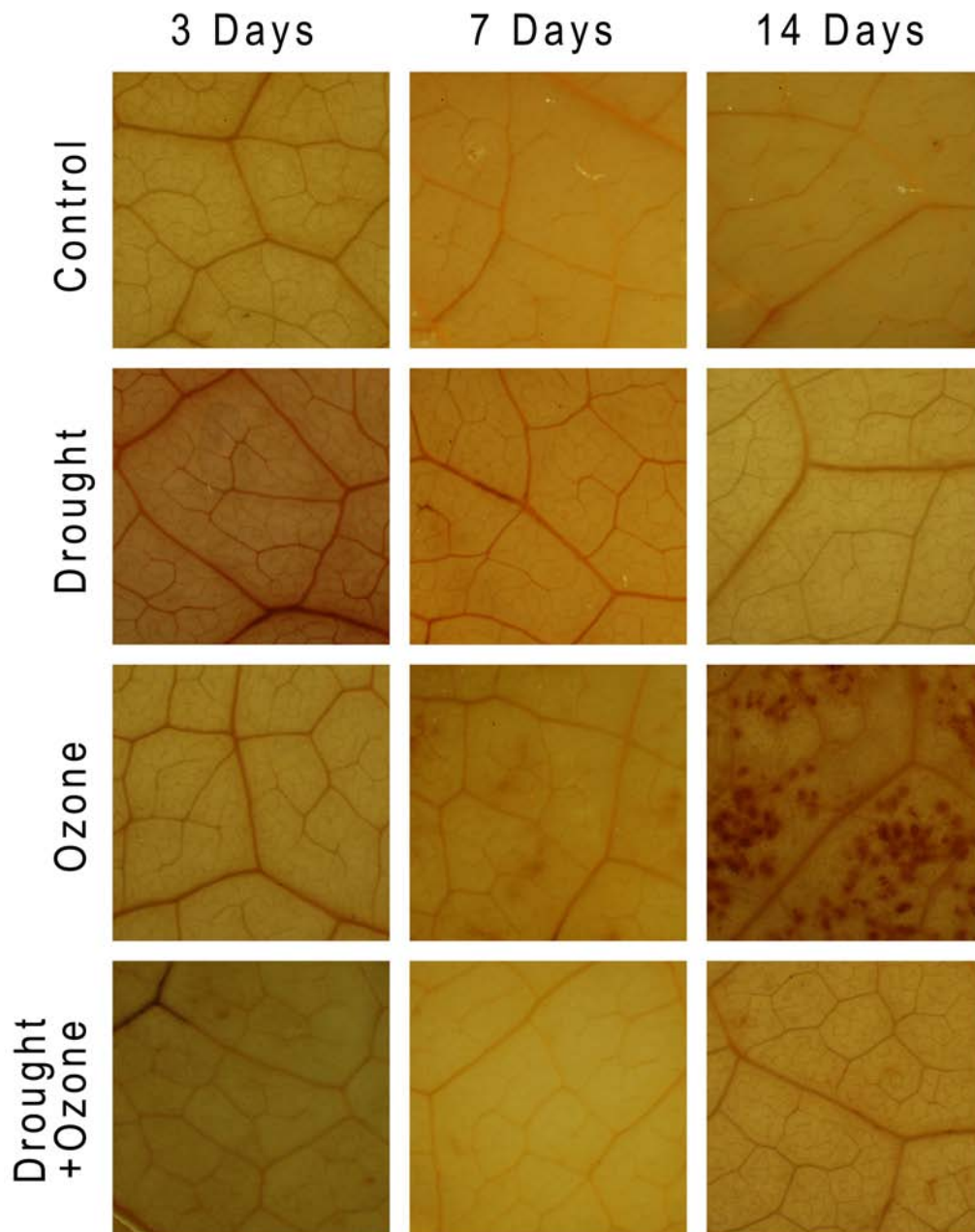


Figure 33. Detection of hydrogen peroxide accumulation using DAB staining of *Vigna unguiculata* (cv Epace) leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days. Pictures are representative of three independent biological replicates. No specific staining was observed in control-treated leaves with ascorbic acid (data not shown). (DAB: 3,3'-diaminobenzidine)

together with PTOX proteins from the closely related Eudicots soybean and *Medicago* (figure 36).

Expression analysis

A hierarchical clustering analysis of gene expression patterns revealed a distinct separation between the chloroplastic (PTOX) and mitochondrial (AOX and pUCP) genes studied (figure 37A). In the AOX gene group, a clear separation between *VuAOX2b* on the one hand and *VuAOX1* and *VuAOX2a*, on the other hand, was noticed. The expression of most pUCP genes (*VuUCP1a*, 2, 3 and 4) was hardly modified in response to the constraints (figure 37A), with the exception of *VuUCP1b* and *VuUCP5*, which showed the strongest responses (figure 37A). Finally, *VuPTOX* expression pattern diverged from the others. The detailed expression patterns *VuPTOX*, *VuAOX1* and *VuUCP1b*, which showed the strongest responses, are shown in Fig. 4B. During the time-course of the experiment, *VuAOX1* expression formed two groups according to the applied stress (figure 37B). The gene was up-regulated in O₃-treated plants, with a 2-fold change after 3 d, a 4-fold change after 7 d, and a 5.7-fold change after 14 d. Meanwhile, *VuAOX1* was also up-regulated after 3 days drought stress, alone or combined with ozone, but was then severely down-regulated, reaching a -5.3-fold change after 14 days. Except after 3 d, *VuPTOX* expression under the different stress conditions displayed a reverse profile as compared to *VuAOX1* (figure 37B). Under O₃, its expression was progressively inhibited and reached -1.6-fold change after 14 days. Drought stress (D and D+O) induced *VuPTOX* expression with a maximum 4-fold change after 7 d. Like *VuAOX1*, *VuUCP1b* was up-regulated after 3 d and 7 d in response to all treatments. After 14 days, *VuUCP1b* up-regulation was maintained under O₃ with a lower variation (2.6-fold change), while its expression was down-regulated (-2-fold change) under drought stress alone. At the same time, the expression of *VuUCP1b* in leaves

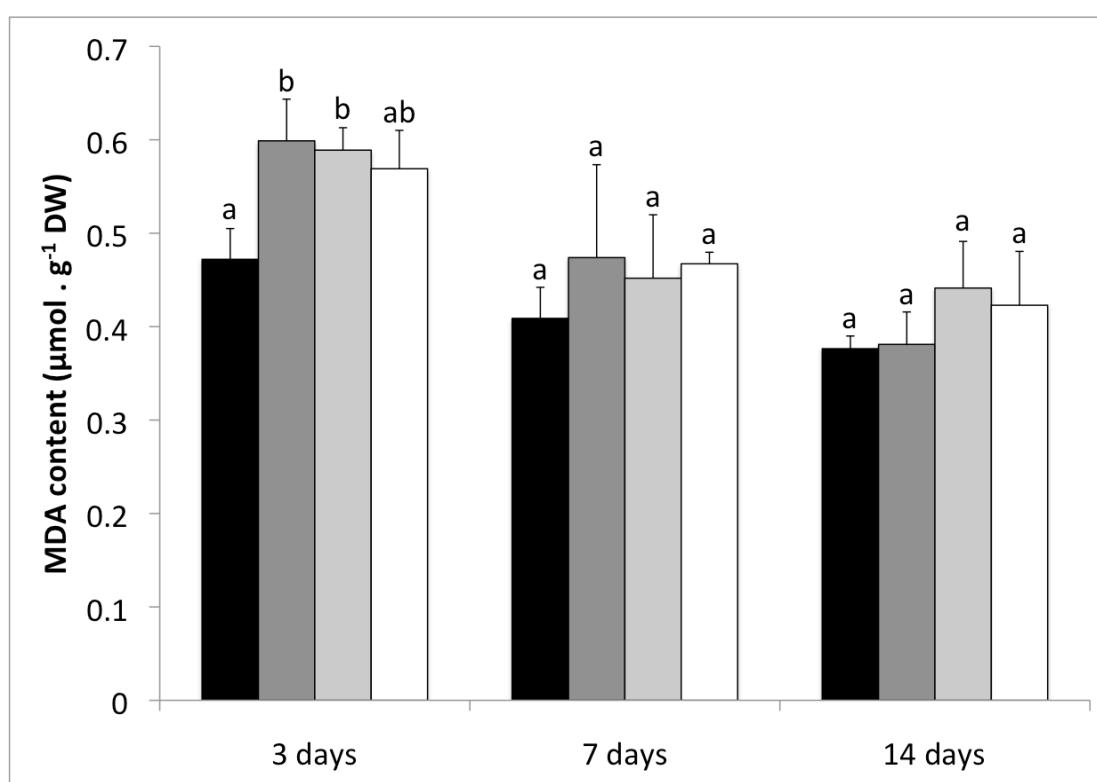


Figure 34. Malondialdehyde content in *Vigna unguiculata* (cv Epace) leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 3, 7 or 14 days.

Control (black bars), drought (dark gray bars), ozone (light gray bars) and drought + ozone (white bars). Letters refer to homogenous subsets given by the ANOVA and Students' post hoc tests performed at a given time point. Treatments that share a letter were not statistically different ($n = 4$; $\alpha = 0.05$).

subjected to the combination of drought and ozone treatments went back to control levels.

Fluorescence analysis

The analysis of PSII chlorophyll fluorescence was carried out to assess the PSII quantum yield (figure 38A) and the non-photochemical quenching (qN) of *Vigna unguiculata* (figure 38B). Under all stress conditions, ϕ_{PSII} tended to decrease after 7 days. After 14 days, only drought applied alone or combined with O₃ exposure maintained a lower ϕ_{PSII} (figure 38A). The non-photochemical quenching (qN) showed an opposite pattern as compared to ϕ_{PSII} after 7 days, with higher values than the control in all treatments (figure 38B). After 14 days, the qN for control plants reached a value close to those determined for the different stresses, only O plants showed a lower value.

```

Vigna      MAAIL---SSSLFASSCLP-----KPLS--HSRTHHTAPP-----LLR----ARASLL 38
Glycine    MAAIF---SSSLFASSPLP-----KPLSSSYSRIHTAPQ-----LFR----ARSSLL 40
Arabidopsis MAAISGISSGTLTISRPLVTLRRSRAAVSYSSSHRLLHHLPLSSRLLLRNNHRVQATIL 60
          ****  *.:* * * . * : * * *:* .:***

Vigna      QDNEEKVIVQDSFPSKSSPLHTTNGKSSVDSISTSFAFEKGIKVEQSVNIFLTDSVIKIL 98
Glycine    QDNEKKVIVHDSFPSKTSPLHTADKSTGGNSINTSAFEKRIKVEQSVNIFLTDSVIKIL 100
Arabidopsis QDDEEKVVVEESFKAETSTGTETLEPNMSSSSTSAFEETWIIKLEQGVNVFLTDSVIKIL 120
          **:***:*.:*** :*: . . . . * .*****. **:*:*:*:*****

Vigna      DTLYNDRYARFYVLEETIARVYFVAFMSVLEMYESFGWRRADYLVHFAESWNEMHETL 158
Glycine    DTLYHDRHYARFFVLEETIARVYFVAFMSVLEMYESFGWRRADYLVHFAESWNEMHETL 160
Arabidopsis DTLYRDRTYARFFVLEETIARVYFVAFMSVLEMYETFGWRRADYLVHFAESWNEMHETL 180
          ****.* ***:*****:*****:*****:*****:*****

Vigna      IMEELGGNAWWFDRFLAQHIAIFYYIMTVLMAISPRMAYHFSECVESSHAFETYDKFLKV 218
Glycine    IMEELGGNAWWFDRFLAQHIAIFYYIMTVLMYAVSPRMAYHFSECVESSHAFETYDKFIKV 220
Arabidopsis IMEELGGSWWFDRFLAQHIATFYFMTVFLMILSPRMAYHFSECVESSHAYETYDKFLKA 240
          *****:***** **:*:*:* :*****:*****:*****:*.

Vigna      QGEELKMKMPPEVAVKYYTGDDLYLFDEFQTSRVPNSRRPKIDNLYDVFVFNIRDDAEHC 278
Glycine    QGDELKMKPAPEVAVNYYTGDDLYLFDEFQTSRVPNSRRPKIENLYDVFVFNIRDDAEHC 280
Arabidopsis SGEELKNMPAPDIAVKYYTGDDLYLFDEFQTSRTPNTRRPVIENLYDVFVFNIRDDAEHC 300
          .*:***:*.:***:***.*****.*****.***:*** *:*****:*****

Vigna      KTMKACQIHGNLRSPHSYAEDDDD---VSVCAMEADCEGIVDCIKKSVNPD PANVK 331
Glycine    KTMKACQTHGNLRSPHSYAEDDDD---SSVCALEADCEGIVDCIKKSVASNPANVK 332
Arabidopsis KTMKACQTLGSLRSPHSILEDDDDTEESGCVVPEEAHCEGIVDCLKKSITS----- 351
          ***:*** *.****** *** . * . **.******:***: .
    
```

Figure 35. Alignment of deduced amino acid sequences of the PTOX protein from *Vigna unguiculata* with previously reported PTOX sequences in *Glycine max* and *Arabidopsis thaliana*.

Amino acid residues observed in all di-iron carboxylate proteins and implied in the iron-binding site are highlighted in black (Fu et al. 2009). The amino acids highlighted in gray in *Vigna* PTOX sequences represent the transit peptide deduced from SignalP 4.0 (Petersen et al. 2011).

Discussion

PTOX characterization

The plastid terminal oxidase (PTOX) was identified in 1999 by two separate research groups (Carol et al. 1999; Wu et al. 1999). PTOX, a plastid-localized plastoquinol oxidoreductase, can be found in a wide variety of phototrophic species including algae and higher plants (Carol and Kuntz 2001; Kuntz 2004). The protein is predicted to play an important role in the reduction of O₂ to H₂O in chloroplasts and could be involved in the chlororespiratory pathway (Cournac et al. 2000). Bioinformatics and molecular evidence indicate that PTOX is encoded by a single gene in the genome of higher plants (Sun and Wen 2011). Our work on EST databases suggests that the *Vigna unguiculata* genome also carries a single gene encoding a PTOX protein, transcribed into an mRNA of 1,369 bp, with a transit peptide that targets the protein to the chloroplasts (figure 35). As found for the *Arabidopsis* gene, the *VuPTOX* gene consists of 9 exons interrupted by 8 introns (Fu et al. 2005). The translated protein is composed of 331 amino acids and shares 67% homology with *Arabidopsis* PTOX and 88% with *Glycine max* PTOX; 20 amino acids are perfectly conserved in the PTOX sequences between the three species. Sequence alignments revealed that 6 out of the 20 conserved amino acids are putative iron-binding residues and are highly conserved in the sequences of all AOX and PTOX proteins examined to date (Fu et al. 2005; Fu et al. 2009). PTOX is proposed to have four α -helices and a di-iron center (Fu et al. 2009). Two of these helices are hydrophobic; they anchor the protein in the thylakoid membrane. Given the ancient nature of the primary endosymbiotic events, the taxonomic distribution of AOX and PTOX is predicted to be widespread. Indeed, the large number of PTOX sequences recently deposited in gene banks supports this expectation. Their broadening distribution also strengthens the hypothesis that PTOXs spread vertically through the prokaryotic and eukaryotic domains (McDonald & Vanlerberghe 2006).

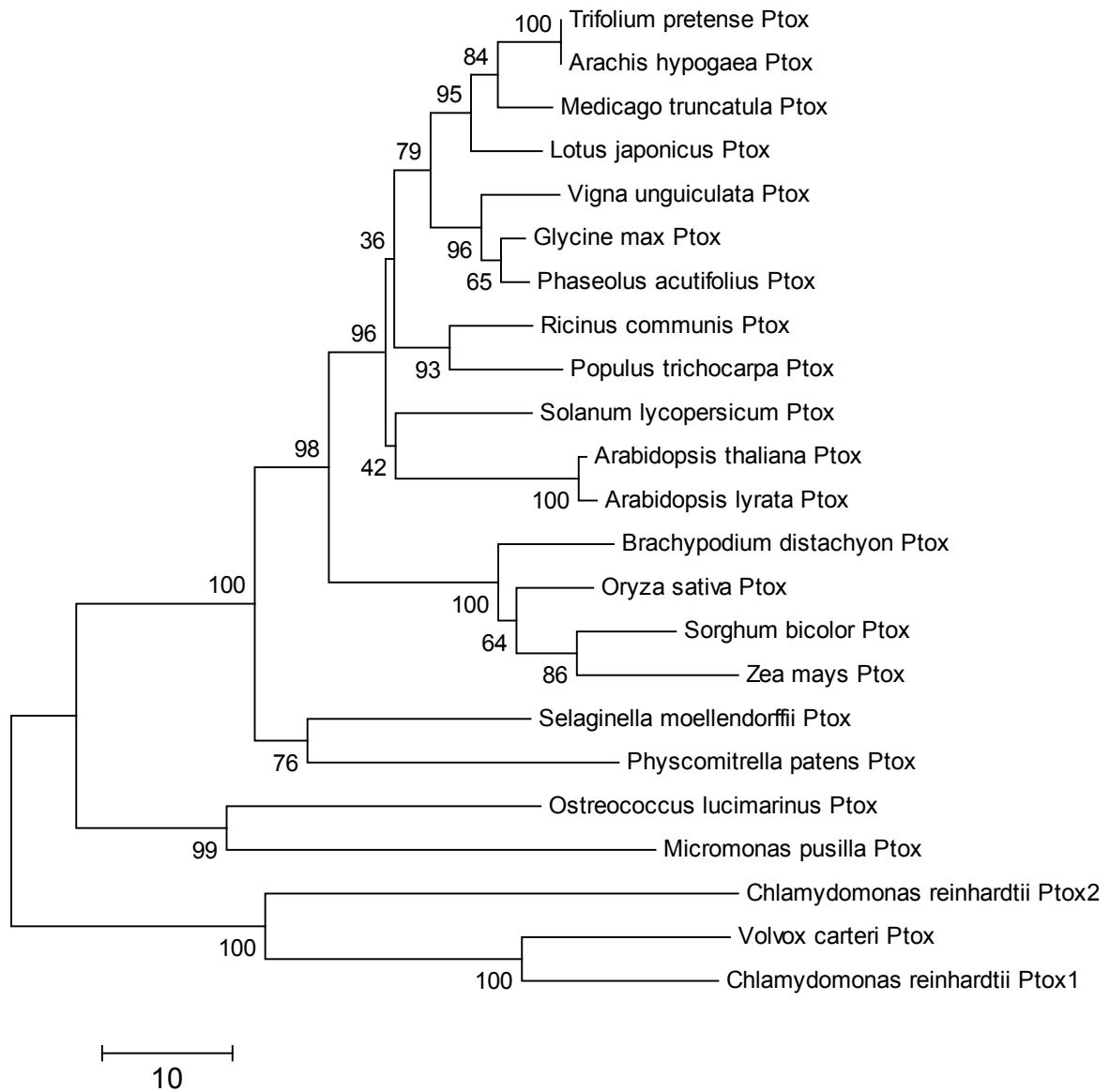


Figure 36. Unrooted phylogenetic tree of various PTOX proteins in plants and bacteria. Phylogenetic tree was constructed using a neighbor-joining algorithm through bootstrap statistical analysis with MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) software (Kumar et al. 2008)

The presence of PTOX sequences in bryophytes, lycophytes and algae suggests that PTOX appeared early in plant evolution (Kuntz, 2004). However, the taxonomic distribution of PTOX in prokaryotes and eukaryotes and its evolutionary history indicate that unlike some other quinol oxidases, PTOX is only present in organisms that exhibit oxygenic photosynthesis (McDonald et al. 2011). In the phylogenetic tree shown in figure 36, PTOX genes from Eudicots and Monocots clearly diverge. Nevertheless, the Fabaceae family, represented here in seven different genera, forms a compact group and shares highly similar PTOX genes. It should also be highlighted that, similarly to AOX genes (Costa et al. 2004), PTOX genes from *Vigna unguiculata* and *Glycine max* are orthologous. The alignment between soybean and *V. unguiculata* orthologous protein pairs (figure 35) confirms the high degree of homology indicated in the phylogenetic tree.

Physiological responses

Nowadays, it is largely accepted that environmental constraints, including drought and ozone exposure, have an unfavorable impact on vegetation (Morgan et al. 2003; Ibáñez et al. 2010). The impact of O₃ exposure on vegetation has been well studied in the last two decades in North America and European countries, and these works unanimously underlined the fact that O₃ is an important environmental factor that could limit crop yield. Except for a few studies (Dafré-Martinelli et al. 2011; Alves et al. 2011), the effect of ozone on tropical species is still largely unknown, as is the critical ozone level for crops cultivated in tropical regions. In this scenario, we investigated the responses of *Vigna unguiculata*, a tropical crop of northeast Brazil, in response to drought, elevated O₃ and the combination of both, through gene expression.

In accordance with Mills et al., (2007) soybean, a Fabaceae closely related to *Vigna unguiculata*, is a moderately sensitive crop with a critical level of 4.3 ppm h O₃ for 5% yield reduction. In this study *Vigna* plants were submitted to a relatively high

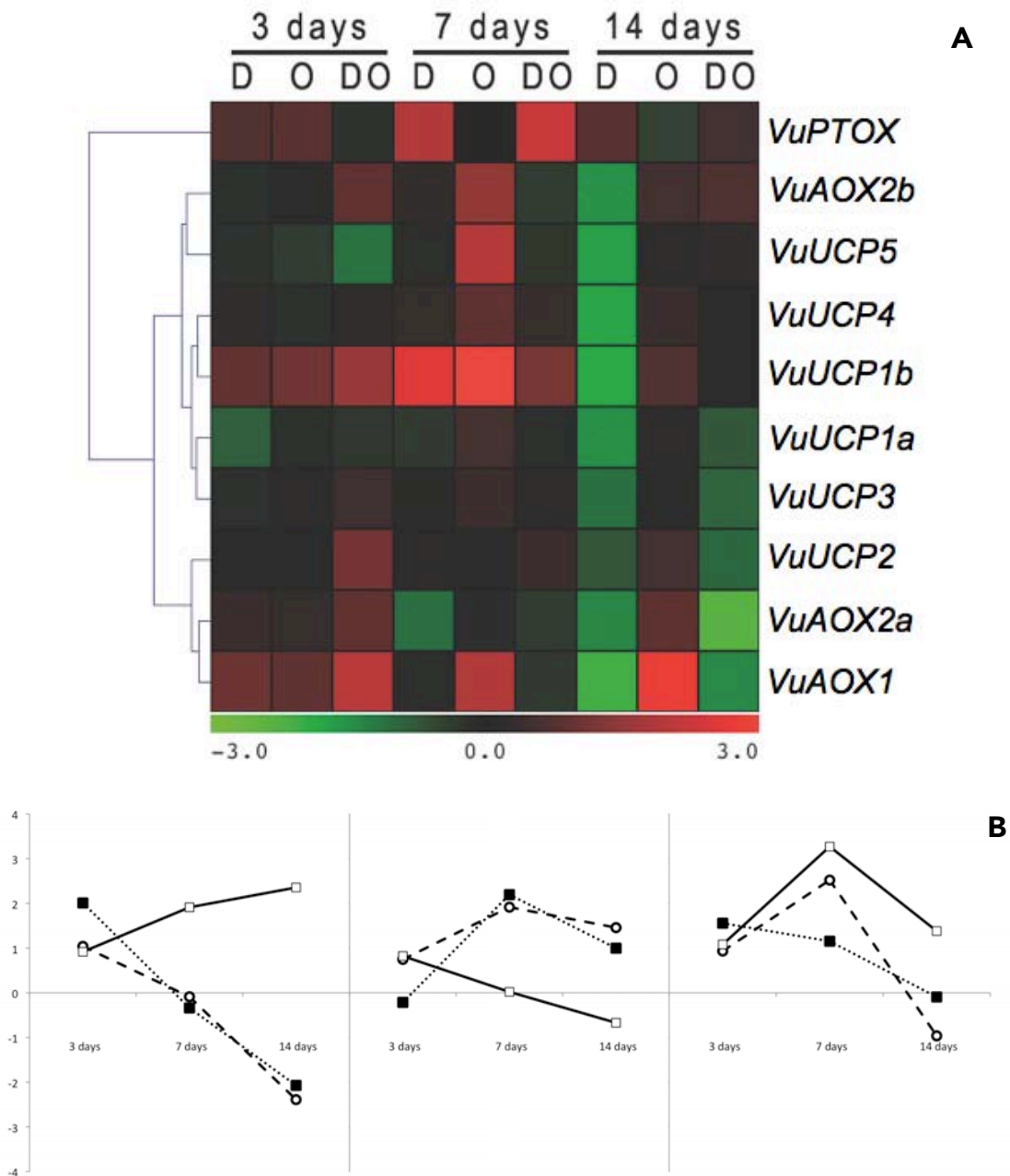


Figure 37. Expression analysis of AOX, PTOX and *pUCP* genes in *Vigna unguiculata* (cv Epace) leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments. (A) Results are presented as a heat map (Multi Experiment Viewer (MeV 4.8.1) software) showing the expression of AOX, PTOX and *pUCP* genes in treated *V. unguiculata* leaves relative to the control on a \log_2 scale (green: down-regulation of gene expression; red: up-regulation of gene expression). Gene expression patterns were submitted to a hierarchical clustering analysis (MeV 4.8.1 software); the resulting tree is shown on the left of the heat map. (B) Relative expression of three selected genes (*VuAOX1*, *VuPTOX* and *VuUCP1b*) relative to the control on a \log_2 scale in plants exposed to drought (open circles), ozone (open squares) and drought + ozone (filled squares) (B). Data are the means of 3 biological replicates and 3 technical replicates.

ozone exposure level that reached an AOT40 of 16 ppm h at the end of O₃ exposure, which is four times higher than the critical level for soybean. However, at this elevated O₃ exposure level, growth of *Vigna unguiculata* plants did not seem to be affected, since no significant difference between O₃-treated and control plants was observed in terms of growth, water content and photosynthesis. Leaf phenology is a decisive factor that influences ozone sensitivity in plants. It is widely accepted that mature leaves are more sensitive to ozone than younger, expanding ones (Pääkkönen et al. 1996; Strohm et al. 1999; Bagard et al. 2008). Therefore, working with the first trifoliate leaf, which was completely developed at the beginning of the treatments, allowed us to observe ozone injuries even if the SFW was not affected. H₂O₂ accumulation was detected in the leaves of O₃-treated plants after 7 days and to a greater extent after 14 days treatment (figure 33). The higher H₂O₂ level in O₃-exposed plants could be explained by the instability of ozone and its decomposition within leaf tissues, which leads to the formation of reactive oxygen species (ROS) such as H₂O₂ (Kangasjärvi et al. 1994). In our experiment, ozone also accelerated leaf damage, abscission and senescence (data not show), as mentioned in previous works (Pell et al. 1997; Wittig et al. 2007). MDA formation resulting from the reaction of ROS with polyunsaturated lipids (Bielski et al. 1982) was perceptible after 3 days O₃ exposure. However, after 7 and 14 days, MDA contents were not significantly different from the control. The formation of oxidized products derived from the catabolism of fatty acids is known to play a role in the induction of many defense genes in plants (Creelman and Mulpuri 2002). This could explain why under O₃ treatment, *VuAOX1*, *VuPTOX* and *VuUCP1b* were up-regulated after 3 days. For *VuAOX1*, up-regulation was maintained throughout the experiment (figure 37B). AOX up-regulation has already been described in response to O₃ exposure (Ederli et al. 2006; Dutilleul et al. 2003). In addition, Costa et al. (2010) showed the presence of cis-elements on *VuAOX1* that respond to H₂O₂. AOX seems to play a crucial role in optimizing metabolic efficiency for the adaptive regulation of growth and

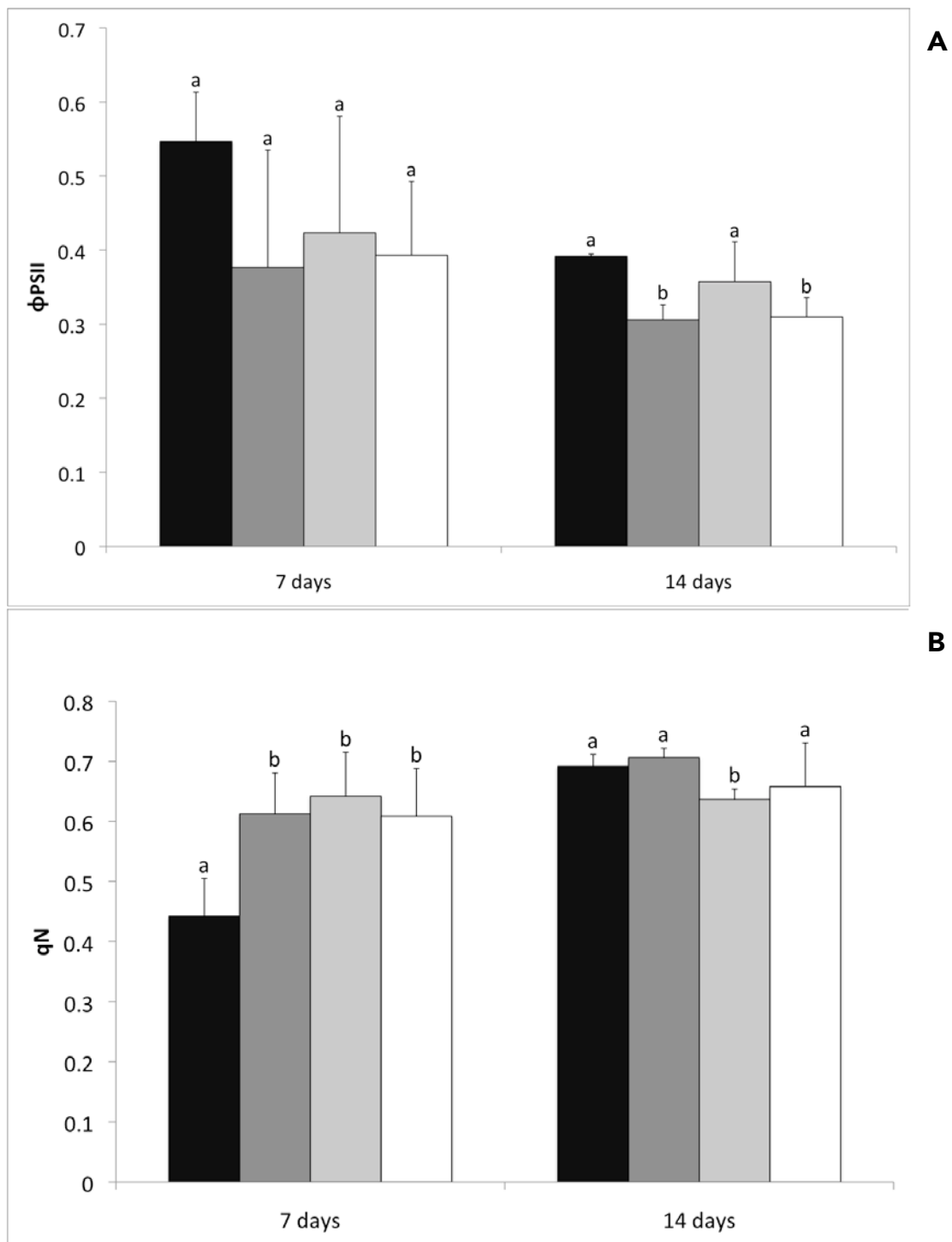


Figure 38: Photosynthesis efficiency of *Vigna unguiculata* (cv Epace) leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days. (A) Effective PSII quantum yield (ϕ_{PSII}) and (B) non-photochemical quenching (qN). Control (black bars), drought (dark gray bars), ozone (light gray bars) and drought + ozone (white bars). Letters refer to homogenous subsets given by the ANOVA and Students' post hoc tests performed at a given time point. Treatments that share a letter were not statistically different ($n = 4$; $\alpha = 0.05$).

development (Arnholdt-Schmitt et al. 2006). The mitochondrial uncoupling protein (*VuUCP1b*) was also up-regulated in response to ozone treatment, with a maximum after 7 days fumigation. Members of the pUCP and AOX families have been shown to be expressed in a time/tissue/stress-dependent manner (Figueira and Arruda 2011). Nonetheless, both enzymes (AOX and pUCP) may well operate together to optimize mitochondrial electron flux and photorespiration rate (Sweetlove et al. 2006). In this regard, *VuPTOX*, the plastidial counterpart of AOX, was up-regulated after only 3 days O₃ exposure, and then down-regulated after 7 and 14 days. The fluorescence analysis showed that PSII tended to decrease after 7 days of O₃ exposure, while qN increased, which could suggest an activation of chlororespiration. In addition, mitochondria could be involved in balancing the redox equivalents from the over-reduced photosystems (Ibáñez et al. 2010; Sweetlove et al. 2006).

Plants subjected to drought or drought combined to O₃ exposure showed a drastic reduction of their RWC (figure 32A) and SFW (figure 32B) values, by 25% and 70%, respectively, when compared to the control. In fully-developed leaves of *Vigna unguiculata* plants subjected to drought stress, Torres-Franklin et al., (2007) found that the RWC dropped from 83% to about 58% of the control values, while leaf water potential decreased from -0.3MPa to -1.5MPa. In our experiment, the RWC reached 60% of the control value, which indicates severe drought stress. This probably explains why growth and biomass production stopped in plants subjected to drought alone or combined with ozone. Even so, drought did not induce H₂O₂ accumulation as ozone did (figure 33). Under drought stress, one of the main threats for chloroplasts is the production of the hydroxyl radical (*HO) in the thylakoid through the "iron-catalyzed" reduction of H₂O₂ by the Haber-Weiss reaction (Cruz de Carvalho 2008). The hydroxyl radical is the ROS with the shortest half-life (~1 ms) but it also has an extremely strong oxidizing potential and reacts with almost any

biological molecule. However, drought was responsible for a higher MDA content in *Vigna unguiculata* leaves 3 days from the beginning of treatments. In this context, we could suggest that plants subjected to drought were able, after a period of cell dysfunction, to set up a series of protection mechanisms to mitigate ROS formation. One of the possible mechanisms could be the increase in *VuPTOX* and *VuUCP1b* expression after 7 days D and D+O treatments. PTOX and pUCP could contribute to limiting ROS formation in chloroplasts and mitochondria, respectively. Previous works reveal that pUCP genes were up-regulated under drought stress (Pastore et al. 2007). Signaling processes following the perception of drought stress could trigger a plastidial response. More specifically, the increase in PTOX activity could be due to an over-oxidized PQ pool. It is already known that PQ redox state can regulate PTOX expression (McDonald et al. 2011). More recently, microarray data revealed that *AtPUMP1* and *AtPUMP5* genes are induced by drought (Vercesi et al. 2006). Several lines of evidence indicate that the uncoupling protein (pUCP) has a prominent role in maintaining mitochondrial functioning under normal and drought conditions (Begcy et al. 2011). Previous studies showed an increase in AOX gene expression, protein content, as well as AOX capacity, in plants subjected to drought (Costa et al. 2007; Bartoli et al. 2005). However, in our experiment, after 7 days and 14 days the AOX genes were down-regulated. Consequently, we can suggest that, unlike PTOX and UCP, AOX is not implied in long-term drought tolerance mechanisms in *Vigna unguiculata*. The fluorescence analysis of the plants subjected to drought combined or not with ozone showed a downward tendency in PSII values for all time-points tested. On the other hand, qN values increased 7 days after the beginning of drought treatments. Taking together the photochemical responses and the up-regulation of the PTOX gene, we can suggest that the chlororespiratory pathway was activated to alleviate the effects of drought on the plant photosynthetic apparatus. Down-regulation of the photosynthetic linear electron

transport, concomitant with the increase in PTOX protein, has been showed in response to drought, heat and high illumination (Ibáñez et al. 2010).

When we compared POD_0 for the plants subjected to O_3 alone or combined with drought at the end of the experiment, no significant difference was found between the two treatments. Consequently, in the time-scale of our experiment, drought did not seem to affect stomatal ozone uptake. Reciprocally, considering that stomatal conductance did not differ between D and D+O treatments, it is difficult to argue that O_3 exposure could deregulate the typical stomatal response to drought stress as recently suggested by Wilkinson and Davies (2010). Overall, our results indicate that the effect of drought stress overruled those of the ozone treatment. Although drought clearly induced stomatal closure, stomatal ozone uptake remained substantial in the plants subjected to the combined stresses. Thus, we can propose that plants subjected to drought set up acclimation processes that can mitigate the oxidative stress induced by ozone uptake. As for drought, a higher expression of the uncoupling proteins (PTOX and pUCP) was detected as a response to combined drought and ozone stresses (figure 37A). Therefore, the up-regulation of these two proteins due to drought stress could also have an important role in preventing ozone-induced ROS formation when the plants are simultaneously subjected to the two constraints.

6- ANÁLISE DE EXPRESSÃO DA AOX (RESULTADOS PRELIMINARES)

Para investigar a expressão de AOX das folhas de *Vigna unguiculata*, um protocolo para a extração de proteínas de membrana foi desenvolvido e descrito em Materiais e Métodos (3.4). Esta técnica de extração mostrou o aparecimento de um sinal mais forte para a proteína de interesse no final do Western blotting.

Os resultados obtidos com as plantas *Vigna unguiculata* expostas durante 14 dias à seca, o ozônio ou à combinação de ambos os estresses são mostrados na Figura 39. O Western blotting revelou a presença de várias bandas. Uma banda fraca entre 75-50 kDa, que é a forma oxidada de AOX (70 kDa) (fig. 39). Abaixo, três bandas muito estreitas e uma massa de cerca de 37kDa que provavelmente correspondem a três diferentes isoformas da AOX em sua forma reduzida (35 kDa) (Figura 39). As outras bandas de peso molecular mais baixo, deve corresponder a proteínas que reagem de forma não específica com o anticorpo dirigido contra a AOX. A intensidade da banda parasita está localizado na altura de 25 kDa (Figura 39). As bandas sugeridas como sendo a AOX foram levemente alteradas nas plantas expostas apenas à seca. Por outro lado, as plantas expostas ao O₃ mostraram comportamento diferente, com o aumento da expressão de uma das bandas e o desaparecimento de outras. No caso das plantas expostas à combinação de ambos ozônio e stress hídrico, uma banda, diferente daquela aumentada em resposta ao O₃ sofreu aumento de intensidade.

Análise da expressão gênica mostrou que *VuAOX1* tem sua expressão fortemente aumentada pelo estresse por ozônio. Os resultados de Western blotting confirmam este resultado, visto que um grande aumento na forma reduzida de AOX foi observado para plantas expostas à O₃ sozinho. Por outro lado, para plantas

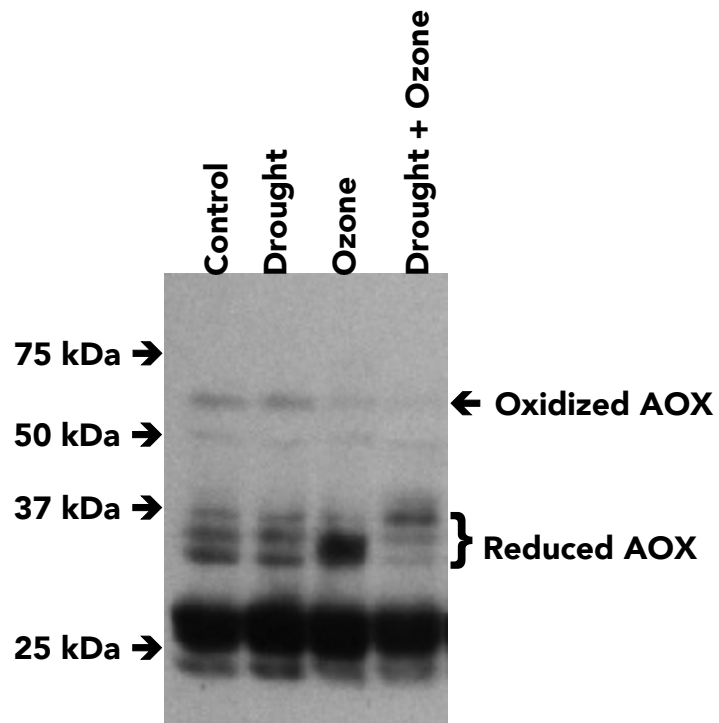


Figure 39: Western blotting of AOX from membrane proteins of *Vigna unguiculata* plants exposed to drought (D), ozone (O) and the combination of both (D+O) during 14 days.

expostas à combinação dos dois estresses, observou-se o aumento da expressão do gene *VuAOX2a*, o que poderia ser consistente com um aumento na sua banda reduzida da AOX, diferente das bandas que sofreram aumento de expressão nas plantas submetidas ao ozônio. O Western blotting da AOX também fornece uma imagem do estado da atividade *in vivo* desta enzima. De fato, a AOX é conhecida por encontrar-se tanto na forma de um dímero (70 kDa) ou na forma monomérica (37 kDa) (Umbach, Ng, & Siedow, 2006). A configuração dimérica (oxidada) da AOX é uma forma inativa da proteína, enquanto que a forma monomérica (reduzida) corresponde a uma forma ativa. Ambas estas configurações são permutáveis, e a transição de uma configuração para a outra é fornecida como um mecanismo para regular a atividade da proteína. Os nossos resultados mostram que a AOX é encontrada principalmente nos tecidos sob a forma reduzida, independentemente do tratamento recebido pelas plantas. Como o ozônio ou uma combinação de estresses também mostram o aumento de expressão das formas reduzidas, o que reforça não apenas a proteína é abundante, mas encontra-se na forma ativa nos tecidos, e pode reduzir a formação de ROS nas mitocôndrias.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As Plantas evoluíram para se adaptar aos ambientes onde estão expostas a uma combinação de estresses. Não podendo se moverem, elas desenvolveram mecanismos específicos para detectar mudanças ambientais específicas e responder as condições de estresses complexas, tentando minimizar os danos. Hoje, a agricultura moderna está enfrentando novos desafios relacionados com o crescimento da população mundial, as consequências das alterações climáticas e do surgimento de novos estresses abióticos, como a poluição atmosférica. Neste contexto, uma das principais preocupações de pesquisa atualmente é compreender os mecanismos intrínscos à plasticidade do metabolismo das plantas e quais mudanças vão permitir a tolerância ou a adaptação das plantas a estes estresses. Algumas Fabaceas, como feijão, lentilha (*Lens culinaris*), tremoço, ervilhas e amendoim são cultivadas pelas suas sementes, que são utilizados para o consumo humano e animal ou para a produção de óleos para uso industrial. As Fabaceas, devido à sua capacidade de fixar o azoto atmosférico, são também essenciais para a regeneração dos solos pobres tanto quanto como alimento fornecendo proteínas, vitaminas e sais minerais necessários para os seres humanos e os animais. Sua cultura pode representar um meio de melhorar as condições de vida dos pequenos agricultores ao redor do mundo. Assim *Vigna unguiculata* é cultivada nas regiões equatoriais e tropicais, usualmente no contexto da agricultura de subsistência.

Os trabalhos com caupi são desenvolvidos no laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará (Brasil), há mais de trinta anos, e concentra-se no estudo do metabolismo energético através de abordagens de Fisiologia Vegetal e Biologia Molecular. Nos últimos anos, a colaboração com a UMR EEF (Nancy, França) e com a Bioemco (Créteil, França), tem sido focada na compreensão do metabolismo energético mitocondrial do caupi a estresses ambientais (salinidade,

déficit hídrico, poluição de ozônio), usando como modelo de pesquisa cultivares de *V. unguiculata* com diferentes graus de sensibilidade aos estresses ambientais. O metabolismo energético relacionada com oxidase alternativa mitocondrial (AOX) foi escolhido como alvo para esses estudos. A AOX tem sido caracterizada bioquímica e molecularmente e suposições sobre o seu papel foram sugeridas (Costa et al., 2004, 2007, 2010; Lima-Júnior et al., 2000). Atualmente, a AOX é considerada uma proteína-chave na reprogramação celular durante o desenvolvimento ou aclimação de plantas aos estresses (Arnholdt-Schmitt, Costa, & Fernandes de Melo, 2006). Mais recentemente, uma colaboração com uma equipa da Universidade de Rosario (Argentina) também ajudou a iniciar um estudo molecular sobre a PTOX, proteína análoga à AOX e localizado nos cloroplastos.

Minha tese está voltada para a pesquisa de marcadores de tolerância à seca e ao ozônio que possam melhorar o crescimento e desenvolvimento do caupi (*Vigna unguiculata*), espécie cultivada de interesse para regiões áridas. Seca e ozônio são dois estresses ambientais cujos efeitos sobre a vegetação são exacerbadas no contexto das mudanças climáticas. Um processo de seleção de cultivares de caupi com base no estudo dos lipídios da membrana levou a seleção do digalactosildiacilglicerol (DGDG) como um potencial marcador de tolerância à seca (Torres-Franklin et al., 2007). Diferenças na indução de sistemas antioxidantes também foram observados para estes cultivares (Contour-Ansel et al., 2006; Torres-Franklin et al., 2007). No meu trabalho, a escolha de potenciais marcadores de tolerância concentrou-se em três proteínas: AOX, PTOX e pUCP. Essas três proteínas podem desempenhar um papel importante no controle da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o seu funcionamento pode ter consequências importantes na geração de energia nas célula.

A interação entre cloroplastos e mitocôndrias é feita através de vários processos, incluindo regulação de processos de produção de energia e controle do equilíbrio

redox celular (para uma revisão recente sobre o assunto ver Nunes-Nesi, Araújo, & Fernie, 2011). Um exemplo para ilustrar esta interação é o envolvimento destas duas organelas no fornecimento do poder redutor (NADH), utilizados nos peroxissomos para a redução da hidroxipiruvate para glicerato durante a fotorespiração (Duttilleul et al., 2003; Igamberdiev, Bykova, Lea, & Gardeström, 2001). A interação entre essas duas organelas, envolve uma sinalização específica com a participação de compostos redox, substratos orgânicos, que são intermediários entre os processos anabólicos (fotossíntese) e processos catabólicos (respiração), tanto quanto a participação dos sistemas desacopladores nos processos oxidativos de síntese de energia, tais como NAD(P) desidrogenase, a oxidase alternativa (AOX), a proteína desacopladora de plantas (pUCP) e a oxidase terminal dos plastídios (PTOX).

Para investigar o envolvimento dessas três proteína marcadoras (AOX PUCP e PTOX) como potenciais marcadores de tolerância, foi conduzido um primeiro experimento para avaliar diferenças na tolerância à seca e/ou ozônio dos dois cultivares de *Vigna unguiculata*: cultivar EPACE e cultivar 1183. A escolha desses dois cultivares foi ditada por seu comportamento em trabalhos anteriores (Torres-Franklin et al., 2007) que foram capazes de diferenciar o cultivar Epace como tolerante a seca, enquanto a 1183 foi dado como sensível. Nas nossas condições experimentais, os dois cultivares são muito pouco diferenciado vis-à-vis a seca, embora os sinais de estresse oxidativo (coloração DAB, indicativo da presença de peróxido de hidrogênio) foram maiores para a cultivar 1183 sob seca e estresse combinado (seca + O₃) e uma maior diminuição no desempenho fotossintético (diminuição da eficiência do PSII, maior quenching não-fotoquímico). As diferenças entre os dois cultivares foram mais pronunciadas, em resposta a tratamento com ozônio e isto pode ser o resultado de um maior influxo de O₃ nas folhas (valores de POD₀). Os resultados para o sistema antioxidante (ascorbato e glutatona), demonstraram que o aumento dos níveis de ascorbato em relação à seca e à seca

combinada com O₃ (14 dias), aparentemente, não foi capaz de impedir a formação de H₂O₂ nas folhas cultivar sensível (1183). Para ambos os cultivares a maior concentração de glutathione nas diferentes condições de estresse pode sugerir que a glutathione tem um papel na prevenção da produção de ROS nas folhas. Deve notar-se que o 1183, cultivar mais sensível ao ozônio difere do cultivar Epace por níveis mais baixos de glutathione a 14 dias de tratamento O₃. O fato é que as diferenças são mínimas entre as duas cultivares, independentemente do estresse aplicado. Provavelmente procurando uma resposta mais acentuada entre as cultivares necessitam de uma investigação mais aprofundada com um número maior de cultivares no contexto das características adaptativas para validar a presença de características adaptativas a um ou outro estresse. Além disso, também deve ser observado que para todas as características estudadas, poucas diferenças entre o tratamento seca em relação a seca e combinada com O₃ foram observadas. As nossas experiências demonstraram claramente que o impacto da seca influencia mais fortemente a resposta da planta apesar de um grande afluxo de O₃ na folha. Seria interessante para mostrar se resultados semelhantes são observados quando O₃ estresse é aplicado antes da seca. Esta situação provavelmente, em condições naturais, pode levar a mudanças na resposta estomática à seca e/ou a capacidade antioxidante das células e trazendo assim um possível impacto de O₃ estresse na resposta das plantas à seca (Wilkinson & Davies, 2009).

Na segunda parte do meu trabalho, foi utilizada a cultivar Epace para estudar possíveis mudanças na expressão de genes que codificam proteínas desacopladoras mitocondriais (AOX e pUCP) e plastidiais (PTOX). Num curto espaço de tempo, tornou-se evidente que estas três proteínas tiveram os seus genes mais super expresso quando submetidas a qualquer um dos tratamentos. Um tempo mais as respostas foram diferentes de acordo com o estresse aplicado. É difícil concluir se isso foi resultado de diferenças na sensibilidade das organelas celulares. No

entanto, podemos concluir que só a seca de longo prazo podem alterar a expressão de PTOX. Esta maior expressão dessa enzima do cloroplasto poderia limitar o aumento na taxa de oxidação do cloroplasto, associada a um desbalanço no funcionamento da cadeia de elétrons do cloroplasto. O₃ não afetou preferencialmente expressão das proteínas mitocondriais no longo prazo e o aumento concomitante na expressão da AOX (principalmente *VuAOX1*) e da pUCP (*VuUCP1b*) pode ser visto como uma forma de evitar condições oxidantes nessa organela e desencadear um processo de morte celular. Como observado em vários parâmetros bioquímicos e fisiológicos, a situação da combinação de estresses está claramente marcada com uma resposta mais importante à seca. O aumento nos genes que codificam para o e PTOX e pUCP mostra a importância potencial destas proteínas para limitar o stress oxidativo em mitocôndrias e cloroplastos, respectivamente, enquanto que a expressão de AOX não é alterado.

Em geral, os nossos resultados sugerem que as diferentes das respostas dos dois cultivares podem ser atribuídas a regulação diferencial do metabolismo energético, bem como uma resposta claramente distinta sobre os níveis de antioxidantes celulares. O estudo da expressão de genes que codificam para as proteínas mitocondriais (AOX e pUCP) e plastidial (PTOX) mostrou que o início da cascata de resposta à seca leva a alterações no metabolismo energético, que conferem prevenção eficaz do stress causado pelo O₃ quando ambos estresses são aplicados simultaneamente. A análise da expressão de genes que codificam para as diferentes proteínas, mostrou que as proteínas implicadas nas respostas à seca são a PTOX nos cloroplastos, e a pUCP em mitocôndrias. No entanto quando o estresse por ozônio é aplicado sozinho, o gene da AOX, *VuAOX1*, parece ser mais importante para a prevenção do estresse oxidativo na mitocôndria.

As observações e os resultados obtidos neste estudo nos leva a identificar dois grandes temas de interesse em pesquisa para desenvolver um quadro abrangente e

para melhorar a compreensão da resposta da planta ao estresse causado pela seca, por O₃ e a combinação da seca com O₃.

- A regulação das proteínas desacopladoras nas mitocôndrias e nos cloroplastos como um mecanismo para evitar a formação de ROS
- A regulação dos sistemas antioxidantes como principal linha de defesa face as ROS.

É bem sabido que o metabolismo energético em plantas envolve a participação de duas organelas (mitocôndrias e cloroplastos) que estão envolvidas na síntese de ATP. Sob condições de estresse ambiental, estas organelas devem desempenhar um papel importante no estabelecimento de uma reprogramação para atingir um novo estado de homeostase celular. No contexto de metabolismo energético, falta ainda a mostrar que a expressão dos diferentes genes estudados correspondem a alterações na função das proteínas *in vivo*. Estudos sobre a quantificação das proteínas desacopladoras, assim como a análise da atividade dessas proteínas *in vivo* (método isotópico) e em organelas isolados devem ser empreendidos. Este trabalho, abre assim, perspectivas de um estudo que incorpora as alterações de transcrições com mudanças na atividade das organelas isoladas e na folha inteira. Começamos esse trabalho, tal abordagem, com a quantificação da AOX, mas estes resultados ainda são preliminares. No entanto, a quantidade de proteína AOX parece seguir o mesmo padrão de expressão de genes (principalmente *VuAOX1*) com uma quantidade mais elevada nas plantas expostas ao O₃ aplicado sozinho. A utilização de anticorpos contra o PTOX está em andamento. Note-se que as vias de sinalização relacionadas ao ozônio e a seca que induzem uma mudança na expressão de genes que codificam estas três proteínas ainda precisam ser esclarecidas. Pode-se perguntar se a sinalização lipídica está envolvida e investigar o possível envolvimento de uma sinalização retrógrada (organela-núcleo) nos

mecanismos de resposta das plantas ao estresse hídrico e provocado pela exposição ao ozônio.

O segundo tema emergente é a pesquisa para a compreensão da resposta adaptativa das plantas ao estresse hídrico e provocado pela exposição ao ozônio e o entendimento dos mecanismos de defesa antioxidante. Os papéis do ascorbato e da glutatona nesta defesa são inegáveis, mas o seu envolvimento (na forma oxidada ou reduzida), sua biossíntese, tanto quanto a regulação de proteínas envolvidas no metabolismo requerem mais trabalhos. Finalmente, o envolvimento de ROS como moléculas sinalizadoras em células devem ser esclarecidas em nossas condições de estresse. Vários estudos têm demonstrado o papel de vários ROS e RNS (espécies reativas de nitrogênio), em resposta ao ozônio e à seca, mas as possíveis interações entre essas vias de sinalização ainda precisam ser definidos nas situações de estresses combinados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdeen, A., Schnell, J., & Miki, B. (2010). Transcriptome analysis reveals absence of unintended effects in drought-tolerant transgenic plants overexpressing the transcription factor. *BMC Genomics*, (11), 69–90.
- Affourtit, C., Albury, M. S., Crichton, P. G., & Moore, A. L. (2002). Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS letters*, 510(3), 121–6.
- Aluru, M., & Rodermel, S. (2004). Control of chloroplast redox by the IMMUTANS terminal oxidase. *Physiologia Plantarum*, 120, 4–11.
- Aluru, M., 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 physiology*, 127(1), 67–77.
- Alves, E.S., Moura, B.B., Pedroso, A.N.V., Tresmondi, F., Domingos, M. (2011) The efficiency of tobacco Bel-W3 and native species for ozone biomonitoring in subtropical climate, as revealed by histo-cytochemical techniques. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*.159(12), 3309–15.
- Andersson, M. E., & Nordlund, P. (1999). A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS letters*, 449(1), 17–22.
- Andrade-Júnior, A. S., Santos, A. A. dos, Sobrinhos, C. A., Bastos, E. A., Melo, F. de B., Viana, F. M. P., Filho, F. R. F., et al. (2002). Cultivo de Feijão-Caupi. *Embrapa*. Retrieved March 9, 2012, from <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/importancia.htm>
- Araújo, J. P. P., & Watt, E. E. (1988). *O caupi no Brasil*. Brasília: EMBRAPA/CNPAF.
- Archibald, J. M., Rogers, M. B., Toop, M., Ishida, K.-I., & Keeling, P. J. (2003). Lateral gene transfer and the evolution of plastid-targeted proteins in the secondary plastid-containing alga *Bigeloviella natans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 7678–83.
- Arnholdt-Schmitt, B., Costa, J. H., & de Melo, D. F. (2006). AOX - a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? *Trends in plant science*, 11(6), 281–7.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 50, 601–639.
- Ashmore, M. R. (2005). Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell and Environment*, 28(8), 949–964.
- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3523–43.
- Atteia, A., van Lis, R., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. ., Martin, W., & Henze, K. (2004). Identification of prokaryotic homologues indicates an endosymbiotic origin for the alternative oxidases of mitochondria (AOX) and chloroplasts (PTOX). *Gene*, 330(null), 143–148.
- Azzu, V., Jastroch, M., Divakaruni, A. S., & Brand, M. D. (2010). The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1797, 785–791.
- Bagard, M., Thiec, D. L., Delacote, E., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Banvoy, J., Gérard, J., Dizengremel, P., et al. (2008). Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. *Physiologia Plantarum*, 559–574.
- Baker, N. R., & Rosenquist, E. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, 55(403), 1607–1621.

- Bartoli, C.G., Gomez, F., Gergoff, G., Guiamét, J.J., Puntarulo, S. (2005) Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *Journal of experimental botany*.56(415), 1269–76.
- Begcy, K., Mariano, E.D., Mattiello, L., Nunes, A.V., Mazzafera, P., Maia, I.G., Menossi, M. (2011) An Arabidopsis mitochondrial uncoupling protein confers tolerance to drought and salt stress in transgenic tobacco plants. *PLoS one*. 6(8), e23776.
- Bennoun, P. (1982). Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(14), 4352–6.
- Bennoun, P. (2002). The present model for chlororespiration. *Photosynth. Res.*, 73, 273–277.
- Berthold, D. A., Andersson, M. E., & Nordlund, P. (2000). New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1460(2-3), 241–254.
- Bielski, B.H.J., Arudi, R.L., Sutherland, M.W. (1982) A Study of the Reactivity of H₂O₂ with Unsaturated Fatty Acids. *The Journal of biological chemistry*.258(8), 4759–4761.
- Bienert, G. P., Møller, A. L. B., Kristiansen, K. a, Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *The Journal of biological chemistry*, 282(2), 1183–92.
- Blum, A. (2011). Drought resistance - is it really a complex trait? *Functional Plant Biology*, 38(10), 753.
- Bohnert, H. J., & Jensen, R. G. (1996). Strategies for engineering water- stress tolerance in plants. *Trends in Biotech*, 14(March), 89–97.
- Borecký, J, Maia, I. G., Costa, A. D., Jezek, P., Chaimovich, H., de Andrade, P. B., Vercesi, A. E., et al. (2001). Functional reconstitution of Arabidopsis thaliana plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMP1) expressed in Escherichia coli. *FEBS letters*, 505(2), 240–4.
- Borecký, Jirí, & Vercesi, A. E. (2005). Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress. *Bioscience reports*, 25(3-4), 271–86. doi:10.1007/s10540-005-2889-2
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., et al. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS letters*, 408(1), 39–42.
- Bouillaud, F., Arechaga, I., Petit, P. X., Raimbault, S., Levi-Meyrueis, C., Casteilla, L., Laurent, M., et al. (1994). A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein. *The EMBO journal*, 13(8), 1990–7.
- 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(1). doi:10.1007/BF00239941
- Carol, P., & Kuntz, M. (2001). A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends in plant science*, 6(1), 31–36.
- Carol, P., Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandmann, G., Mache, R., Coupland, G., et al. (1999). Mutations in the Arabidopsis Gene IMMUTANS Cause a Variegated Phenotype by Inactivating a Chloroplast Terminal Oxidase Associated with Phytoene Desaturation. *The Plant Cell*, 11(January), 57–68.
- Caruso, A., Chefdor, F., Carpin, S., Depierreux, C., Delmotte, F. M., Kahlem, G., & Morabito, D. (2008). Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. *Journal of Plant Physiology*, 165(9), 932–941.
- Cavalheiro, R. A., Fortes, F., Borecký, J., Faustinoni, V. C., & Schreiber, A. Z. (2004). Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(10), 1455–1461. doi:10.1590/S0100-879X2004001000003

- Chaudhuri, M., & Hill, G. C. (1996). Cloning, sequencing, and functional activity of the *Trypanosoma brucei brucei* alternative oxidase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 83(1), 125–129.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003). Review: Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant, 239–264.
- Chen, X., Laudeman, T.W., Rushton, P.J., Spraggins, T. a, Timko, M.P. (2007) CGKB: an annotation knowledge base for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) methylation filtered genomic genespace sequences. *BMC Bioinformatics*. 8, 129.
- Chien, L.-F., Wu, Y.-C., & Chen, H.-P. (2011). Mitochondrial energy metabolism in young bamboo rhizomes from *Bambusa oldhamii* and *Phyllostachys edulis* during shooting stage. *Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale*, 49(4), 449–57.
- Clifton, R., Millar, A. H., & Whelan, J. (2006). Alternative oxidases in *Arabidopsis*: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochimica et biophysica acta*, 1757(7), 730–41.
- Conklin, P. L., & Barth, C. (2004). Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell and Environment*, 27(8), 959–970.
- Considine, M. J., Daley, D. O., & Whelan, J. (2001). The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant physiology*, 126(4), 1619–29.
- Contour-Ansel, D., Torres-Franklin, M. L., Cruz DE Carvalho, M. H., D'Arcy-Lameta, A., & Zuily-Fodil, Y. (2006). Glutathione reductase in leaves of cowpea: cloning of two cDNAs, expression and enzymatic activity under progressive drought stress, desiccation and abscisic acid treatment. *Annals of botany*, 98(6), 1279–87.
- Costa, J. H., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Pham-Thi, A. T., Silva Lima, M. D. G., Dizengremel, P., Jolivet, Y., & Fernandes de Melo, D. (2004). Identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. of two cDNAs encoding mitochondrial alternative oxidase orthologous to soybean alternative oxidase genes 2a and 2b. *Plant Science*, 167(2), 233–239.
- Costa, J. H., Jolivet, Y., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Orellano, E. G., da Guia Silva Lima, M., Dizengremel, P., & Fernandes de Melo, D. (2007). Alternative oxidase regulation in roots of *Vigna unguiculata* cultivars differing in drought/salt tolerance. *Journal of plant physiology*, 164(6), 718–27.
- Costa, J. H., Mota, E. F., Cambursano, M. V., Lauxmann, M. A., de Oliveira, L. M. N., Silva Lima, M. D. G., Orellano, E. G., et al. (2010). Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (*VuAox1* and *2b*) genes in *Vigna unguiculata*. *Journal of plant physiology*, 167(7), 561–70.
- Cournac, L., Josse, E., Joe, T., Rumeau, D., Redding, K., Kuntz, M., Peltier, G. (2000) Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration.
- Cournac, L., Latouche, G., Cerovic, Z., Redding, K., Ravenel, J., & Peltier, G. (2002). In Vivo Interactions between Photosynthesis , Mitorespiration , and Chlororespiration in *Chlamydomonas reinhardtii*, 129(August), 1921–1928.
- Cournac, L., Redding, K., Ravenel, J., Rumeau, D., Josse, E., Kuntz, M., & Peltier, G. (2000). Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *The Journal of biological chemistry*, 275(23), 17256–62.
- Creelman, R. a, Mulpuri, R. (2002) The oxylipin pathway in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*.1, e0012.
- Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior*, 3(3), 156–65.
- D'Haese, D., Vandermeiren, K., Asard, H., & Horemans, N. (2005). Other factors than apoplastic ascorbate contribute to the differential ozone tolerance of two clones of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment*, 28(5), 623–632.

- Dafré-Martinelli, M., Nakazato, R. K., Dias, A. P. L., Rinaldi, M. C. S., & Domingos, M. (2011). The redox state of *Ipomoea nil* "Scarlet O'Hara' growing under ozone in a subtropical area. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(6), 1645–52.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 57(5), 779–95.
- Dietrich, M. O., & Horvath, T. L. (2010). The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan. *Pflugers Arch.*, 459(2), 269–275.
- Dietz, K.-J. (2003). Plant peroxiredoxins. *Annual review of plant biology*, 54, 93–107. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134934
- Divakaruni, A. S., & Brand, M. D. (2011). The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 26(3), 192–205.
- Dizengremel, P. (2001). Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(9), 14.
- Dizengremel, P., Thiec, D. L., Bagard, M., & Jolivet, Y. (2008). Ozone risk assessment for plants: Central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environmental Pollution*, 156, 11–15. doi:10.1016/j.envpol.2007.12.024
- Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, C., Chétrit, P., Foyer, C. H., & Paepe, R. D. (2003). Leaf Mitochondria Modulate Whole Cell Redox Homeostasis, Set Antioxidant Capacity, and Determine Stress Resistance through Altered Signaling and Diurnal Regulation. *Society*, 15(May), 1212–1226.
- Ederli, L., Morettini, R., Borgogni, A., Wasternack, C., Miersch, O., Reale, L., Ferranti, F., Tosti, N., Pasqualini, S. (2006) Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. *Plant physiology*. 142(2), 595–608.
- Ehlers, J. D., & Hall, A. E. (1997). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Field Crops Research*, 53, 187–204.
- El Maarouf, H., Zuily-Fodil, Y., Gareil, M., d' Arcy-Lameta, A., & Pham-Thi, A. T. (1999). Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L. Walp. differing in drought tolerance. *Plant molecular biology*, 39(6), 1257–65.
- Feild, T., Nedbal, L., & Ort, D. (1998). Nonphotochemical reduction of the plastoquinone pool in sunflower leaves originates from chlororespiration. *Plant physiology*, 116(4), 1209–18.
- Fernandes de Melo, D., Jolivet, Y., Façanha, A. R., Gomes Filho, E., Silva Lima, M., & Dizengremel, P. (1994). Effect of salt stress on mitochondrial energy metabolism of *Vigna unguiculata* cultivars differing in NaCl tolerance. *Plant Physiology et Biochemistry*, 32(3), 405–412.
- Fery, R. (2002). Development of improved southernpea varieties for the southern United States: An update on the USDA effort. *Vegetable Association Yearbook (North Carolina Vegetable Growers Association)*, 53.
- Figueira, T.R.S., Arruda, P. (2011) Differential expression of uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase in the plant response to stress. *Journal of bioenergetics and biomembranes*.43(1), 67–70.
- Finnegan, P. M., Whelan, J., Millar, a H., Zhang, Q., Smith, M. K., Wiskich, J. T., & Day, D. a. (1997). Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase. *Plant physiology*, 114(2), 455–66.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., et al. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nature genetics*, 15(3), 269–72.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology*, 155(1), 2–18.
- Fu, A., Aluru, M., Rodermeil, S. (2009) Conserved Active Site Sequences in Arabidopsis Plastid Terminal Oxidase (PTOX). *Journal of Biological Chemistry*.284(34), 22625–22632.

- Fu, A., Liu, H., Yu, F., Kambakam, S., Luan, S., Rodermel, S. (2012) Alternative oxidases (AOX1a and AOX2) can functionally substitute for plastid terminal oxidase in Arabidopsis chloroplasts. *The Plant cell*.24(4), 1579–95.
- Fu, A., Park, S., Rodermel, S. (2005) Sequences Required for the Activity of PTOX (IMMUTANS), a Plastid Terminal Oxidase IN VITRO AND IN PLANTA MUTAGENESIS OF IRON-BINDING SITES AND A CONSERVED SEQUENCE THAT CORRESPONDS TO EXON 8 *. *JournalofBiologicalChemistry*. 280(52), 42489 –42496.
- Garantizado, F.E.A., Costa, J.H., Maia, I.D., Fernandes de Melo, D. (2011) Expressão diferencial dos genes *VuUCP1a* e *VuUCP1b* em caupi sob estresse salino. , 404–408.
- Genty, B., Briantais, J. M., & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990(1), 87–92.
- Gfeller, R. P., & Gibbs, M. (1985). Fermentative Metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: II. Role of Plastoquinone. *Plant physiology*, 77(2), 509–11.
- Godde, D., & Trebst, A. (1980). NADH as electron donor for the photosynthetic membrane of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Archives of Microbiology*, 127(3), 245–252.
- Gomes, C. M., Gall, J. L., Xavier, A. V., & Teixeira, M. (2001). Could a diiron-containing four-helix-bundle protein have been a primitive oxygen reductase? *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 2(7-8), 583 – 7.
- Greene, R. (2002). Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *The Arabidopsis book* (American S., Vol. 1, pp. 1–20). American Society of Plant Biologists. doi:10.1199/tab.0036.1
- Ground-level ozone in the 21st century: future trends , impacts and policy implications. *Science Policy Report 15/08*. (2008).
- Hall, A. E. (2004). Breeding for adaptation to drought and heat in cowpea. *European Journal of Agronomy*, 21(4), 447–454.
- Hansen, L. D., Church, J. N., Matheson, S., McCarlie, V. W., Thygeson, T., Criddle, R. S., & Smith, B. N. (2002). Kinetics of plant growth and metabolism. *Thermochimica Acta*, 388(1-2), 415–425.
- Heath, R. L., & Taylor, G. E. (1997). Physiological Processes and Plant Responses to Ozone Exposure. In H. Sandermann, A. R. Wellburn, & R. L. Heath (Eds.), *Forest Decline and Ozone* (pp. 317–398). doi:10.1007/978-3-642-59233-1_10
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), 604–611.
- Hose, E., Steudle, E., & Hartung, W. (2000). Abscisic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a study using cell- and root-pressure probes. *Planta*, 211(6), 874–882.
- Hourton-Cabassa, C., Rita Matos, A., Zachowski, A., & Moreau, F. (2004). The plant uncoupling protein homologues: a new family of energy-dissipating proteins in plant mitochondria. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale*, 42(4), 283–90. doi:10.1016/j.plaphy.2004.01.007
- Hughes, J., & Criscuolo, F. (2008). Evolutionary history of the UCP gene family: gene duplication and selection. *BMC evolutionary biology*, 8, 306.
- Ibáñez, H., Ballester, A., Muñoz, R., & Quiles, M. J. (2010). Chlororespiration and tolerance to drought, heat and high illumination. *Journal of plant physiology*, 167(9), 732–8.
- IBGE. (2001). *Levantamento sistemático da produção agrícola*. Rio de Janeiro.
- Igamberdiev, A. U., Bykova, N. V., Lea, P. J., & Gardeström, P. (2001). The role of photorespiration in redox and energy balance of photosynthetic plant cells: A study with a barley mutant deficient in glycine decarboxylase. *Physiologia plantarum*, 111(4), 427–438.
- Ingram, J., & Bartels, D. (1996). the Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 47, 377–403.

- Iqbal, A., Khalil, I. a., Ateeq, N., & Sayyar Khan, M. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, 97(2), 331–335.
- Ito-Inaba, Y., Hida, Y., & Inaba, T. (2009). What is critical for plant thermogenesis? Differences in mitochondrial activity and protein expression between thermogenic and non-thermogenic skunk cabbages. *Planta*, 231(1), 121–30.
- Jarmuszkiewicz, W, Sluse-Goffart, C. M., Hryniewiecka, L., & Sluse, F. E. (1999). Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *The Journal of biological chemistry*, 274(33), 23198–202.
- Jarmuszkiewicz, Wieslawa, Behrendt, M., Navet, R., & Sluse, F. E. (2002). Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties and protein expression during vegetative life and starvation-induced early development. *FEBS letters*, 532(3), 459–64.
- Jenkin, M. E., & Clemitshaw, K. C. (2000). Ozone and other secondary photochemical pollutants: chemical processes governing their formation in the planetary boundary layer. *Atmospheric environment*, 34(16), 2499–2527.
- 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(379), 2401–2410.
- Jiménez, A., Hernandez, J. A., Del Rio, L. A., & Sevilla, F. (1997). Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. *Plant physiology*, 114(1), 275–284.
- Johnson, G. N. (2005). Cyclic electron transport in C 3 plants : fact or artefact ? *interactions*, 56(411), 407–416.
- Josse, E.-M., Alcaraz, J.-P., Laboure, A.-M., & Kuntz, M. (2003). In vitro characterization of a plastid terminal oxidase (PTOX). *European Journal of Biochemistry*, 270(18), 3787–3794.
- Josse, E., Simkin, A. J., Gaffé, J., Labouré, a M., Kuntz, M., & Carol, P. (2000). A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiology*, 123(4), 1427–1436.
- Kaneko, T. (2001). Complete Genomic Sequence of the Filamentous Nitrogen-fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *DNA Research*, 8(5), 205–213. doi:10.1093/dnares/8.5.205
- Kangasjärvi, J., Jaspers, P., & Kollist, H. (2005). Signalling and cell death in ozone-exposed plants, (1), 1021–1036.
- Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M., Karjalainen, R. (1994) Plant defense systems induced by ozone. *Plant Cell Environment*.17, 783–794.
- Klingenberg, M. (1990). Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *Trends in biochemical sciences*, 15(3), 108–12.
- 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. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 107(2), 326–31. doi:10.1007/s00122-003-1250-z
- Kooten, O. van, & Snel, J. F. H. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25, 147–150.
- Kreps, J. A., Wu, Y., Chang, H., Zhu, T., Wang, X., Harper, J. F., Mesa, T., et al. (2002). Transcriptome Changes for *Arabidopsis* in Response to Salt , Osmotic , and Cold Stress 1 [w], 130(December), 2129–2141.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K. (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics*.9(4), 299–306.
- Kuntz, M. (2004) Plastid terminal oxidase and its biological significance. *Planta*. 218(6), 896–9.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.

- Laloi, M. (1999). Plant mitochondrial carriers: an overview. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 56(11-12), 918–44.
- Lambers, H. (1982). Cyanide-resistant respiration: A non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Physiologia Plantarum*, 55(4), 478–485.
- Lance, C., Chauveau, M., & Dizengremel, P. (1985). The cyanide-resistant pathway of plant mitochondria. In R. Douce & D. A. Day (Eds.), *Higher plant cell respiration*. Berlin: Springer Verlag.
- 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) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*.23(21), 2947–8.
- Lee, B., & Wang, J. (2006). Concentration variation of isoprene and its implications for peak ozone concentration. *Atmospheric Environment*, 40(28), 5486–5495. doi:10.1016/j.atmosenv.2006.03.035
- Lee, D. S., Köler, I., Grobler, E., Rohrer, F., Sausen, R., Gallardo-Klenner, L., Olivier, J. G. J., et al. (1997). Estimations of global NO_x emissions and their uncertainties. *Atmospheric environment*, 31(12), 1735–1749.
- Li, F., Vallabhaneni, R., Yu, J., Rocheford, T., & Wurtzel, E. T. (2008). The Maize Phytoene Synthase Gene Family: Overlapping Roles for Carotenogenesis in Endosperm, Photomorphogenesis, and Thermal Stress Tolerance. *Plant Physiology*, 147(July), 1334–1346.
- Lima-Júnior, A., Fernandes, D., Melo, D., Hélio, J., Graciela, E., & Jolivet, Y. (2000). Effect of pH on CN-resistant respiratory activity and regulation on *Vigna unguiculata* mitochondria. *Plant Physiology et Biochemistry*, 38, 765–771.
- Mackenzie, S., & McIntosh, L. (1999). Higher plant mitochondria. *The Plant cell*, 11(4), 571–86.
- Mailloux, R. J., & Harper, M.-E. (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free radical biology & medicine*, 51(6), 1106–15.
- Maione, T. E., & Gibbs, M. (1986). Hydrogenase-Mediated Activities in Isolated Chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology*, 80(2), 360–3.
- Matyssek, R., Le Thiec, D., Löw, M., Dizengremel, P., Nunn, a J., Häberle, K.-H. (2006) Interactions between drought and O₃ stress in forest trees. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*.8(1), 11–7.
- Maxwell, D. P., Wang, Y., & McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 8271–8276.
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence — a practical guide, 51(345), 659–668.
- McDonald, A. E. (2008). Alternative oxidase: an inter-kingdom perspective on the function and regulation of this broadly distributed “cyanide-resistant” terminal oxidase. *Functional Plant Biology*, 35(7), 535. doi:10.1071/FP08025
- McDonald, A. E., & Vanlerberghe, G. C. (2006). Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase. *Biochemistry*, 1, 357 – 364.
- McDonald, A.E., Ivanov, Alex G, Bode, R., Maxwell, Denis P, Rodermeil, S., Hüner, N.P. a (2011) Flexibility in photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX). *Biochimicaetbiophysicaacta*. 1807(8), 954–67.
- Meeuse, B. J. D. (1975). Thermogenic Respiration in Aroids. *Annual Review of Plant Physiology*, 26(1), 117–126.
- Mills, G, Buse, A., Gimeno, B., Bermejo, V, Holland, M. (2007) A synthesis of AOT40-based response functions and critical levels of ozone for agricultural and horticultural crops. . 41, 2630–2643.
- Mills, G., Pleijel, H., Büker, P., Braun, S., Emberson, L., Harmens, H., Simpson, D., et al. (2011). Chapter 3: Mapping Critical Levels for Vegetation Recent. *Mapping Manual 2004* (pp. 0–114).
- Mitchell, P. (1961). Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature*, 191(4784), 144–148. doi:10.1038/191144a0

- Mittler, R. (2002). Oxidative stress , antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405–410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490–8. doi:10.1016/j.tplants.2004.08.009
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., et al. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in plant science*, 16(6), 300–9.
- Moore, A. L., & Siedow, J. N. (1991). The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, 1059, 121–140.
- Moore, A. L., Albury, M. S., Crichton, P. G., & Affourtit, C. (2002). Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends in plant science*, 7(11), 478–81.
- Moore, A. L., Umbach, A. L., & Siedow, J. N. (1995). Structure-function relationships of the alternative oxidase of plant mitochondria: A model of the active site. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 27(4), 367–377.
- Morgan, P. B., Ainsworth, E. A., & Long, S. P. (2003). How does elevated ozone impact soybean? A meta-analysis of photosynthesis, growth and yield. *Plant, Cell and Environment*, 26(8), 1317–1328.
- Morgan, P. B., Mies, T. A., Bollero, G. A., Nelson, R. L., & Long, S. P. (2005). Season-long elevation of ozone concentration to projected 2050 levels under fully open-air conditions substantially decreases the growth and production of soybean. *New Phytologist*, 2050. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01679.x
- Morgan, P.B., Ainsworth, E.A., Long, S P (2003) How does elevated ozone impact soybean? A meta-analysis of photosynthesis, growth and yield.*Plant, Cell and Environment*.26(8), 1317–1328.
- Munns, R., & Sharp, R. (1993). Involvement of Abscisic Acid in Controlling Plant Growth in Soil of Low Water Potential. *Australian Journal of Plant Physiology*, 20(5), 425.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Mimuro, M., Miyashita, H., Tsuchiya, T., Sasamoto, S., et al. (2003). Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 10(4), 137–45.
- Nicholls, D. G., & Rial, E. (1999). A history of the first uncoupling protein, UCP1. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 31(5), 399–406.
- Nixon, P. J. (2000). Chlororespiration. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 355(1402), 1541–7. doi:10.1098/rstb.2000.0714
- Niyogi, K. K. (2000). Safety valves for photosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 3(6), 455–60.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., et al. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, cell & environment*, 35(2), 454–84.
- Nunes-Nesi, A., Araújo, W. L., & Fernie, A. R. (2011). Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis. *Plant physiology*, 155(1), 101–7.
- Pääkkönen, E., Metsärinne, S., Holopainen, T., & Kärenlampi, L. (1996). The ozone sensitivity of birch (*Betula pendula*) in relation to the developmental stage of leaves. *New Phytologist*, 132(1), 145–154.
- Palmieri, L., Picault, N., Arrigoni, R., Besin, E., Palmieri, F., & Hodges, M. (2008). Molecular identification of three *Arabidopsis thaliana* mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms: organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization. *The Biochemical journal*, 410(3), 621–9.
- Parent, B., Hachez, C., Redondo, E., Simonneau, T., Chaumont, F., & Tardieu, F. (2009). Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. *Plant physiology*, 149(4), 2000–12.
- Pastore, D., Trono, D., Laus, M.N., Fonzo, N.D., Flagella, Z. (2007) Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress A case study: durum wheat mitochondria. . 58(2), 195–210.

- Paterson, A. H. (2006). Leafing through the genomes of our major crop plants: strategies for capturing unique information. *Nature reviews. Genetics*, 7(3), 174–84.
- Pell, E. J., Schlagnhauer, C. D., & Arteca, R. N. (1997). Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 264–273.
- Peltier, G., & Cournac, L. (2002a). Chlororespiration. *Annual review of plant biology*, 53, 523–550.
- Peltier, G., Ravenel, J., & Verméglio, A. (1987). Inhibition of a respiratory activity by short saturating flashes in *Chlamydomonas*: Evidence for a chlororespiration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 893(1), 83–90.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*. 8(10), 785–6.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45.
- Pottorff, M., Wanamaker, S., Ma, Y. Q., Ehlers, J. D., Roberts, P. a, & Close, T. J. (2012). Genetic and Physical Mapping of Candidate Genes for Resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* Race 3 in Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *PLoS one*, 7(7), e41600.
- Purvis, A. C. (1997). Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 100(1), 165–170.
- Purvis, A. C., & Shewfelt, R. L. (1993). Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiologia Plantarum*, 88(4), 712–718.
- Queval, G., & Noctor, G. (2007). A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Analytical Biochemistry*, 363(1), 58–69.
- Quin, F. M. (1997). Introduction. In B. B. Sing, D. R. Mohan Raj, K. E. Dashiell, & L. E. N. Jackai (Eds.), *Advances in cowpea research* (Ibadan: II., p. ix–xv).
- Raghavendra, A.S., Padmasree, K. (2003) Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends in Plant Science*.8(11), 546–553.
- Rao, M. V., & Davis, K. R. (2001). The physiology of ozone induced cell death. *Planta*, 213(5), 682–90.
- Renaut, J., Bohler, S., Hoffmann, L., Sergeant, K., Ahsan, N., Jolivet, Y., Dizengremel, P., et al. (2009). The Impact of atmospheric composition on plants: A case study of ozone and poplar. *Mass Spectrometry Reviews*, 28, 495–516.
- Reynolds, M. P., & Ortiz, R. (2010). Climate change and crop production. In M. P. Reynolds (Ed.), *CABI Climate Change Series*. Wallingford: Cabi.
- Ricquier, D., & Kader, J.-C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: A sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 73(3), 577–583.
- Röbelen, G. (1968). Genbedingte Rotlicht-Empfindlichkeit der Chloroplastendifferenzierung bei Arabidopsis. *Planta*, 80(3), 237–254. doi:10.1007/BF00392394
- Roberts, C. W., Roberts, F., Henriquez, F. L., Akiyoshi, D., Samuel, B. U., Richards, T. A., Milhous, W., et al. (2004). Evidence for mitochondrial-derived alternative oxidase in the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: a potential anti-microbial agent target. *International Journal for Parasitology*, 34(3), 297–308.
- Rocap, G., Larimer, F. W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N. A., Arellano, A., et al. (2003). Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature*, 424(6952), 1042–7.
- Rockström, J., & Falkenmark, M. (2000). Semiarid Crop Production from a Hydrological Perspective: Gap between Potential and Actual Yields. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(4), 28.
- Rosso, D., Ivanov, A. G., Fu, A., Geisler-lee, J., Hendrickson, L., Geisler, M., Stewart, G., et al. (2006). IMMUTANS does not act as a stress-induced safety valve in the protection of the photosynthetic apparatus of Arabidopsis during steady-state photosynthesis. *Plant physiology*, 142, 574–585.

- Rowland, F. S. (2006). Stratospheric ozone depletion. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 361(1469), 769–90.
- Royal Society (2008) *Ground-level ozone in the 21st century: future trends , impacts and policy implications. Science Policy Report 15/08.*
- Rumeau, D., Peltier, G., & Cournac, L. (2007). Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Environment*, 1041–1051.
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., et al. (2003) TM4: A Free, Open-Source System for Microarray Data Management and Analysis. *BioTechniques*. 34(2), 374–377.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(3), 1319–24.
- Scherer, S. (1990). Do photosynthetic and respiratory electron transport chains share redox proteins? *Trends in Biochemical Sciences*, 15(12), 458–462.
- Siedow, J. N., Umbach, A. L., & Moore, A. L. (1995). The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS letters*, 362(1), 10–4.
- Simmonds, P. G., Derwent, R. G., Manning, a. L., & Spain, G. (2004). Significant growth in surface ozone at Mace Head, Ireland, 1987–2003. *Atmospheric Environment*, 38(28), 4769–4778.
- Singh, B. B., & Tarawali, S. A. (1997). Cowpea and its improvement: Key to sustainable mixed crop/livestock farming systems in West Africa. In C. Renard (Ed.), *Crop residues in sustainable mixed crop/livestock farming system* (pp. 79–100). Wallingford, UK: ICRISAT/ILRI/CABI.
- Singh, S. K., & Raja Reddy, K. (2011). Regulation of photosynthesis, fluorescence, stomatal conductance and water-use efficiency of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under drought. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 105(1), 40–50.
- Skulachev, V. P. (1999). Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 31(5), 431–45.
- Smith, J. A. C., & Griffiths, H. (1993). *Water Deficits: Plant Responses from Cell to Community* (p. 364). Lancaster: Bios Scientific Publishers.
- Stanford, N. P., Santos, D. R., Silva, V. M., Santos, C. E. R. ., & Monteiro, M. C. (1990). Fixação do N₂ e matéria seca do caupi em dois solos do semi-árido brasileiro submetidos à deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 14, 283–290.
- Stechmann, A., Hamblin, K., Pérez-Brocal, V., Gaston, D., Richmond, G. S., van der Giezen, M., Clark, C. G., et al. (2008). Organelles in Blastocystis that Blur the Distinction between Mitochondria and Hydrogenosomes. *Current Biology*, 18(8), 580–585. doi:10.1016/j.cub.2008.03.037
- Stenmark, P., & Nordlund, P. (2003). A prokaryotic alternative oxidase present in the bacterium *Novosphingobium aromaticivorans*. *FEBS Letters*, 552(2-3), 189–192. doi:10.1016/S0014-5793(03)00920-7
- Stepien, P., & Johnson, G. N. (2009). Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte *Arabidopsis* and the halophyte *thellungiella*: role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. *Plant physiology*, 149(2), 1154–65.
- Strohm, M., Eiblmeier, M., Langebartels, C., Jouanin, L., Polle, a., Sandermann, H., & Rennenberg, H. (1999). Responses of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase or glutathione reductase to acute ozone stress: visible injury and leaf gas exchange. *Journal of Experimental Botany*, 50(332), 365–374.
- Sun, X., Wen, T. (2011) Physiological roles of plastid terminal oxidase in plant stress responses. *Journal of Biosciences*.36(5), 951–956.
- Suzuki, T., Hashimoto, T., Yabu, Y., Kido, Y., Sakamoto, K., Nihei, C., Hato, M., et al. (2004). Direct evidence for cyanide-insensitive quinol oxidase (alternative oxidase) in apicomplexan parasite

- Cryptosporidium parvum: phylogenetic and therapeutic implications. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), 1044–1052.
- Sweetlove, L.J., Lytovchenko, A., Morgan, M., Nunes-Nesi, A., Taylor, N.L., Baxter, C.J., Eickmeier, I., Fernie, A.R. (2006) Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.103(51), 19587–92.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2004). *Fisiologia vegetal*. (Artmed, Ed.) (Terceira E., p. 719). Porto Alegre.
- Tanudji, M., Sjöling, S., Glaser, E., & Whelan, J. (1999). Signals required for the import and processing of the alternative oxidase into mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 274(3), 1286–93.
- Tilney-Bassett, R., & Almouslem, A. (1989). Variation in plastid inheritance between pelargonium cultivars and their hybrids, 63(2), 145–153.
- Timko, M. P., Rushton, P. J., Laudeman, T. W., Bokowiec, M. T., Chipumuro, E., Cheung, F., Town, C. D., et al. (2008). Sequencing and analysis of the gene-rich space of cowpea. *BMC genomics*, 9, 103.
- Torres-Franklin, M. L., Contour-Ansel, D., Zuily-Fodil, Y., & Pham-Thi, A.-T. (2008). Molecular cloning of glutathione reductase cDNAs and analysis of GR gene expression in cowpea and common bean leaves during recovery from moderate drought stress. *Journal of plant physiology*, 165(5), 514–21.
- Torres-Franklin, M.-L., Gigon, A., de Melo, D.F., Zuily-fodil, Y., Pham-Thi, A.-T., Fernandes de Melo, D. (2007) Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. *Physiologia plantarum*. 131(2), 201–210.
- Umbach, A. L., Ng, V. S., & Siedow, J. N. (2006). Regulation of plant alternative oxidase activity: a tale of two cysteines. *Biochimica et biophysica acta*, 1757(2), 135–42.
- 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. *The Plant cell*, 11(9), 1743–54.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2000). Two-component systems in plant signal transduction. *Trends in plant science*, 5(2), 67–74.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), RESEARCH0034.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L. (1997) ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*.48, 703–734.
- Vasquez-Tello, A., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A. T., & Vieira da Silva, J. B. (1990). Electrolyte and Pi Leakages and Soluble Sugar Content as Physiological Tests for Screening Resistance to Water Stress in Phaseolus and Vigna Species. *Journal of Experimental Botany*, 41(7), 827–832.
- Vass, I. (2011) Role of charge recombination processes in photodamage and photoprotection of the photosystem II complex. *Physiologia plantarum*. 142(1), 6–16.
- Vercesi, A. E., Borecký, J., Maia, I. D. G., Arruda, P., Cuccovia, I. M., & Chaimovich, H. (2006). Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annual review of plant biology*, 57, 383–404.
- Vercesi, A. E., Martins, I. S., Silva, M. A. P., Leite, H. M. F., Cuccovia, I. M., & Chaimovich, H. (1995). PUMPing Plants. *Nature*, 375, 24.
- Vinocur, B., & Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, (16), 123–132.
- Vinocur, B., Altman, A. (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*. (16), 123–132.
- Wagner, A. M., & Moore, A. L. (1997). Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Bioscience reports*, 17(3), 319–33.

- Wagner, A. M., Krab, K., Wagner, M. J., & Moore, A. L. (2008). Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: the role of the alternative oxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1777(7-8), 993–1000.
- Weatherley, P. E. (1950). Studies in the water relations of the cotton plant. I. The field measurement of water deficits in leaves. *New Phytologist*, 49(1), 81–97.
- Wetzel, C. M., Jiang, C. Z., Meehan, L. J., Voytas, D. F., & Rodermel, S. R. (1994). Nuclear-organelle interactions: the immutans variegation mutant of Arabidopsis is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 6(2), 161–75.
- Wilkinson, S., & Davies, W. J. (2009). Ozone suppresses soil drying- and abscisic acid (ABA)-induced stomatal closure via an ethylene-dependent mechanism. *Plant, cell & environment*, 32(8), 949–59.
- Wilkinson, S., & Davies, W. J. (2010). Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, cell & environment*, 33(4), 510–25.
- Wittig, V. E., Ainsworth, E. A., Naidu, S. L., Karnosky, D. F., & Long, S. P. (2009). Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis. *Global Change Biology*, 15(2), 396–424.
- Wittig, V.E., Ainsworth, E.A., Long, Stephen P (2007) To what extent do current and projected increases in surface ozone affect photosynthesis and stomatal conductance of trees? A meta-analytic review of the last 3 decades of experiments. *Plant, cell & environment*.30(9), 1150–62.
- 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. *The Plant Cell*, 11(1), 43–55.
- Xu, Z., Zhou, G., & Shimizu, H. (2010). Plant responses to drought and rewatering. *Plant signaling & behavior*, 5(6), 649–54.
- Yip, J. Y. H., & Vanlerberghe, G. C. (2001). Mitochondrial alternative oxidase acts to dampen the generation of active oxygen species during a period of rapid respiration induced to support a high rate of nutrient uptake. *Physiologia plantarum*, 112(3), 327–333.