



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**DEBORAH MOURA REBOUÇAS**

**ESTUDO DO METABOLISMO DE LIPÍDIOS DE MEMBRANA E DA EXPRESSÃO  
DOS GENES RELACIONADOS EM CULTIVARES DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP  
SOB ESTRESSES ABIÓTICOS COMBINADOS (SECA/OZÔNIO)**

**FORTALEZA**

**2014**

DEBORAH MOURA REBOUÇAS

ESTUDO DO METABOLISMO DE LIPÍDIOS DE MEMBRANA E DA EXPRESSÃO DOS  
GENES RELACIONADOS EM CULTIVARES DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP SOB  
ESTRESSES ABIÓTICOS COMBINADOS (SECA/OZÔNIO)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Bioquímica. Área de concentração:  
Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dirce Fernandes de Melo

FORTALEZA

2014

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

- 
- R24e      Rebouças, Deborah Moura.  
            Estudo do metabolismo de lipídios de membrana e da expressão dos genes relacionados em cultivares de *vigna unguiculata* (L.) walp sob estresses abióticos combinados (seca/ozônio) / Deborah Moura Rebouças. – 2014.  
            162 f. : il., color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.  
            Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.  
            Orientação: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo.  
            Coorientação: Dr. Matthieu Bagard.
1. Lipídeos de Membrana. 2. Feijão-caupi. 3. Plantas - Efeito da seca. I. Título.

DEBORAH MOURA REBOUÇAS

ESTUDO DO METABOLISMO DE LIPÍDIOS DE MEMBRANA E DA EXPRESSÃO DOS  
GENES RELACIONADOS EM CULTIVARES DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP SOB  
ESTRESSES ABIÓTICOS COMBINADOS (SECA/OZÔNIO)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Bioquímica. Área de concentração:  
Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 31/10/2014

BANCA EXAMINADORA



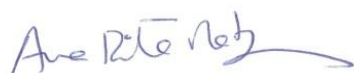
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Dirce Fernandes de Melo  
(Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC



Dr. Matthieu Bagard  
(Co-orientador)

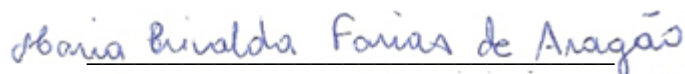
Université Paris-Est Créteil – UPEC



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Rita Matos  
Universidade de Lisboa



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



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Erivalda Farias de Aragão  
Universidade Estadual do Ceará - UECE

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Professora Dirce**. Fui acolhida em seu laboratório em 2006 como estudante de iniciação científica; fiz mestrado e, com isso, estabelecemos laços não apenas de orientadora e orientanda, mas mais do que isso. Mesmo antes de saber se eu conseguiria passar na seleção de doutorado em Bioquímica da UFC, estando ainda no final do mestrado, ela me convidou para fazer parte do projeto de colaboração entre o nosso laboratório e o da França, com a idéia de eu ir para lá fazer uma parte do meu doutorado. Ela me deu todo o apoio para que eu pudesse crescer pessoal e profissionalmente em um país tão diferente do nosso, sempre com palavras de conforto, mencionando os seus 3 C: calma, coragem e confiança. Ela cuidou de tudo no Brasil para que eu conseguisse prorrogar a minha estadia na França. Quando voltei ao Brasil, ela continuou a me dar todo o apoio que eu precisei em relação ao meu trabalho de tese, às aulas que eu ministrei ou às disciplinas que eu cursei. Grande parte da minha formação eu devo à Professora Dirce!

Agradeço a **Professora Anne Repellin**. Quando fui trabalhar em seu laboratório na França, ela me acolheu “de braços abertos”. Agradeço por ela ter me ajudado com toda sua experiência e seu conhecimento, marcando reuniões para me guiar no andamento do trabalho, indo até mesmo para a bancada me ensinar a extrair lipídios. Agradeço por ela sempre me elogiar como estudante e quando eu estava dominando a língua francesa; por sempre corrigir “a tempo e à hora” meus relatórios, resumos de congressos, artigo e tese; por resolver o que precisasse para que eu pudesse obter a cotutela do doutorado; por ser simpática e amável, se preocupando comigo.

Agradeço ao **Matthieu Bagard**. Ele foi parte fundamental no desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Palavras não são o suficiente para expressar o meu agradecimento por sua disponibilidade, sua ajuda intelectual e seu incentivo profissional. Gostaria de lhe agradecer por seu profissionalismo como co-orientador; por me guiar no desenrolar do trabalho experimental, buscando soluções para os problemas encontrados; por me repassar seu conhecimento científico, encorajando meu trabalho; por ajudar nas minhas apresentações em congressos e na escrita do artigo e da tese; por me ensinar o que eu precisava saber para o bom andamento da pesquisa; por me ajudar com o meu lado pessoal; por disponibilizar seu tempo para

o que eu precisasse, inclusive vindo ao Brasil para me ajudar e por, mesmo de longe, continuar me dando todo o suporte necessário para a finalização deste trabalho.

Agradeço também ao **Yuri**, na época colega de doutorado e agora doutor. Quando comecei os experimentos em Nancy (França), foi ele quem me deu todo o suporte científico e técnico, ensinando-me o trabalho experimental e o realizando juntamente comigo. Eu lhe agradeço por todo o apoio durante o meu doutorado, não apenas profissionalmente, mas também pessoalmente, em um período em que tudo era novo para mim. Agradeço pela sua amizade, pelos seus ensinamentos, pelas risadas nas horas de trabalho, por fazer o trabalho se tornar mais fácil e divertido, por me ouvir e me aconselhar.

Sou grata ao **Professor Hélio**, quem também me ajudou bastante no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por sua ajuda com o desenho de “primers” para os estudos de expressão gênica; agradeço pelos seus ensinamentos em biologia molecular e bioinformática; agradeço pela sua participação na correção do artigo e agradeço pelos momentos de descontração vivenciados no laboratório.

Tenho muito a agradecer ao **Professor Yves Jolivet**, que me acolheu em seu laboratório em Nancy durante 3 meses para que eu pudesse iniciar o trabalho experimental. Quero lhe agradecer não apenas pela sua acolhida, mas também pela sua gentileza. Além disso, agradeço pela sua disponibilidade para as reuniões que tivemos a respeito do andamento dos experimentos e dos artigos, pela sua participação na correção das publicações e pelos seus ensinamentos tão valiosos.

Gostaria também de agradecer as outras pessoas do laboratório de Nancy que tive a oportunidade de conhecer, que me acolheram tão bem e que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, seja com o conhecimento científico, com o apoio técnico, com a companhia em congressos ou com a convivência de cada dia. São eles: **Pierre Dizengremel, Marie-Paule, Marie-Noëlle, Joëlle, Stéphane, Dominique, Morgane e Ata**, dentre outros.

Com meu retorno a Créteil (França), tive a oportunidade de conviver com pessoas maravilhosas no laboratório em que eu passei a maior parte do doutorado. Agradeço em especial a **Mme. Phan-Thi** pelos seus ensinamentos em relação aos lipídios e por sua disponibilidade em passar um dia na bancada para me ensinar as técnicas a serem utilizadas. Agradeço a **Yasmin Zuilly-Fodil** por sua simpatia, seus ensinamentos valiosos e seus conselhos. Agradeço a **Daniel**

**Laffray** pela sua acolhida, seu bom humor, sua simpatia e seus ensinamentos. Agradeço a **Luis** pela sua acolhida, sua simpatia e sua disponibilidade em me ajudar na pesquisa. Agradeço a **Agnès Gigon** pela sua simpatia, seus conselhos e sua disponibilidade em ajudar. Agradeço a **Christophe** pela sua disponibilidade em ajudar e por transmitir seu conhecimento sempre que eu precisava (ele tinha um pdf para tudo!) e também pela sua mania de organização (que não era pouca!) que tornava o laboratório propício para o trabalho. Agradeço a **Chantal, Juliette, Manuel, Mireille, Mixa** e **Nicolas** por contar sempre com sua simpatia no laboratório. Agradeço às secretárias: **Fryni Grekis** por sua simpatia, sua gentileza e sua ajuda e **Agnès Massias** por ter sido sempre tão gentil comigo. Gostaria também de agradecer a **Pascale** por ter me proporcionado momentos de descontração, sempre me fazendo rir com suas cantorias, além de cuidar tão bem das vidrarias do laboratório, facilitando nosso trabalho. Agradeço a **Lili** por nos permitir melhores condições de trabalho ao deixar o laboratório sempre tão limpo e a **Gilberte** pelos momentos de descontração que tivemos juntas. Eu não poderia deixar de agradecer aos estagiários que passaram pelo laboratório e me ajudaram de alguma forma no desenvolvimento da tese, seja por terem trabalhado diretamente comigo: **Karima** e **Stéphanie**; por terem me ensinado a metodologia de clonagem: **Olivier**; ou por terem me proporcionado momentos de descontração: **Nacera, Ariana, Battle** e **Fatima**.

Gostaria de agradecer de forma especial aos meus colegas de doutorado na França (alguns já são doutores). Com eles, o desenvolvimento do trabalho de tese se tornou especial e até mais fácil. A convivência dentro do laboratório, na sala dos estudantes, na hora do almoço ou de um café era sempre muito agradável. Eles participaram do meu desenvolvimento profissional e também pessoal, pois aprendi muito com eles. Agradeço ao **Rafiq** por me ensinar muito sobre as técnicas de biologia molecular, por me fazer companhia quando íamos embora do laboratório, por sempre estar disposto a ajudar até mesmo em questões relacionadas à vida estudantil de estrangeiros. Ele nos fez falta após retornar ao seu país. Agradeço ao **Ruben** por ter sido tão prestativo quando eu precisava de sua ajuda. Eu sempre recorria a ele quando eu não sabia utilizar algum programa de computador ou quando o computador tinha algum problema, além de tirar dúvidas sobre os experimentos. Nunca conheci alguém tão disposto a ajudar, além de divertido, principalmente quando se juntava ao **Marien**. Marien era outro doutorando que não posso deixar de agradecer, principalmente pela sua ajuda com os protocolos e com os cálculos. Com sua inteligência, sempre estava disposto a me ajudar e tornava os dias de trabalho mais

engraçados. Agradeço ao **Ahmed** por sua ajuda com as questões da vida de estudante, por me fazer companhia na hora dos experimentos no laboratório e deixar o clima mais descontraído, por se preocupar se os meus experimentos estavam dando certo ou se eu estava bem, por me ouvir, por me aconselhar e por me fazer aprender a língua francesa com sua maneira rápida de falar (a partir do momento que eu pude lhe compreender, tive certeza que eu sabia o francês!). Quero agradecer a **Maha** por ter se tornado uma amiga tão especial dentro e fora do laboratório, pela sua companhia ao voltarmos para casa, pela sua gentileza em sempre trazer comidas tão gostosas para degustarmos, pela sua paciência em me ouvir e me aconselhar. Agradeço também a **Elodie** por sua forma tão gentil de me tratar, por sempre estar disposta a me ajudar, por se esforçar para nos convencer em fazer “happy hour” entre os estudantes. Por último, agradeço ao **Biet** por ter sido tão gentil comigo e por ter me encorajado no estudo com os lipídios.

Venho também agradecer ao presidente da Universidade da França: **Bernard Saint Girons** e ao diretor da Escola Doutoral SIE: **Denis Duhamel** por terem permitido a cotutela do meu doutorado ao assinarem a Convenção. Agradeço a **Luc Abbadie** por me acolher no UMR 7618 (iEES Paris) e a **Philippe Mora** por me acolher na equipe IPE e pela sua gentileza sempre que eu precisei de sua assinatura. Agradeço de forma especial a secretária da Escola Doutoral SIE **Brigitte David** pela sua disponibilidade em realizar minhas matrículas, em resolver a burocracia relacionada a minha cotutela, em responder minhas dúvidas e também pela sua simpatia, seu bom humor e sua paciência.

O período que eu passei na França durante o meu doutorado se tornou menos difícil devido ao apoio dos amigos brasileiros que eu adquiri nesse período. Dentre eles, agradeço em especial a: **Shirley, Marcela, Gisele, Maira, Luis Fernando, Tarcísio, Herbet, Cecília, Antônio, Rafael, Evelyn, Helena, Eliana, Osamu, Karen, Juliana, Davi, Américo, Roberta e Camila.**

As pessoas que pertencem ao Laboratório de Bioenergética e os demais membros do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular merecem também todo o meu agradecimento. Estas pessoas me apoiaram e me ajudaram de uma forma ou de outra durante o meu doutorado, estando no Brasil ou na França, longe de todos. Dentre estas pessoas, quero agradecer em primeiro lugar a minha amiga **Neuzinha**. Agradeço pela sua ajuda e seu apoio não só durante o período em que eu estava no Brasil, mas principalmente no período em que eu estava na França, sendo de fundamental importância para o meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço em



seguida as minhas amigas da pós-graduação pelo suporte dado mesmo quando eu estava longe, pelos momentos de descontração e pelos preciosos conselhos. São elas: **Andresiane, Bia, Camila, Carine, Carol, Georgia, Kátia, Lívia, Mirele** e **Nila**. Agradeço também aos meninos do laboratório por todo o apoio e pelos momentos de descontração. São eles: **Edson Garantizado, Flávio, Henrique, Pedro** e em especial ao **Edson Rocha** pela sua gentileza e paciência de me ensinar a parte de bioinformática do meu trabalho. Obrigada a **Michelle** pela ajuda em todas as questões burocráticas do laboratório, facilitando o nosso trabalho, e pelos momentos de descontração. Agradeço as professoras **Alana, Erika** e **Luciana** por terem me apoiado e me aconselhado durante esses anos e também a **Malu** por ter me servido de exemplo para o trabalho com os lipídios na França. Agradeço também a **Adolph, Dalton, Izabel, Janaína, Joanna, Karine, Karol, Luis Matheus** e **Nayara**, estudantes de iniciação científica do laboratório, por todo o apoio e pelos bons momentos compartilhados. Agradeço também aos **colegas do Departamento**, principalmente ao **Adilton**, a **Natássia** e a **Vivi** pelo apoio, pelos conselhos e pelos bons momentos vivenciados. Agradeço a **Teka** e a **Nêga** por proporcionarem a limpeza e a higiene do nosso ambiente de trabalho. Agradeço ao nosso coordenador **Prof. Márcio Ramos** por todo o apoio, pelo profissionalismo e pelos seus ensinamentos durante esses anos e à secretária da pós-graduação **Fátima** pela sua disponibilidade em resolver as burocracias relacionadas as minhas matrículas e em responder as minhas inúmeras dúvidas. Agradeço também aos demais funcionários do Departamento pelo apoio todas as vezes que eu necessitava. São eles: **Daniel, Edberto, Gildemar** e **Gilmar**.

Agradeço ao **CNPq** pela concessão da bolsa no período de tese no Brasil e à **CAPES** pela concessão da bolsa no período de tese na França.

Agradeço aos demais membros da banca pela valiosa participação. São eles: **Professora Ana Rita**, que disponibilizou seu tempo vindo de Portugal e foi de fundamental importância para as observações em relação aos lipídios, além de ter aceito escrever um relatório sobre minha tese na condição de “Rapporteur”; **Professor Ivan**, que também disponibilizou seu tempo, vindo de São Paulo e agregando valiosos conselhos no que diz respeito à Biologia Molecular, bem como participando como “Rapporteur” da tese; **Professora Erivalda**, que, através de seus conselhos, colaborou, de uma maneira geral, para uma boa escrita da tese.

Agradeço a **minha família: Joselino (pai), Rosalba (mãe), Bruna (irmã) e Roberto (irmão)** por ter me apoiado durante esses anos e ter suportado a distância para que eu pudesse realizar meu doutorado no exterior.

Por fim, agradeço a **Deus** por ter me dado forças e iluminação para a realização e concretização deste trabalho.

“Eu encontrei o sentido da razão que me leva  
A cada passo diante do palco  
Eu encontrei o sentido da vida que eu levo  
E eu gosto” (O sentido da vida, Tal)

## RESUMO

As mudanças climáticas globais são responsáveis pelo aumento da frequência de episódios de seca e de elevadas concentrações de ozônio troposférico, que podem ocorrer simultaneamente, reduzindo o crescimento das plantas, limitando a produção agrícola e afetando o suprimento de alimentos para a crescente população mundial. Esses estresses ambientais podem levar à superprodução de espécies reativas de oxigênio, promovendo o estresse oxidativo e causando desequilíbrio metabólico. As membranas celulares são os primeiros alvos de danos induzidos por estresses e a preservação da integridade celular através da remodelação dos lipídios de membrana é essencial para a sobrevivência da planta sob condições adversas. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da seca, do ozônio e dos estresses combinados em dois cultivares de feijão-de-corda dotados de diferentes graus de tolerância à seca: EPACE-1 (tolerante) e IT83-D (sensível) através de respostas fisiológicas e de um estudo focado no teor e na composição de lipídios de membrana, assim como na expressão de genes relacionados à biossíntese e à degradação desses lipídios. A seca e o ozônio (120 ppb), isolados ou combinados, foram aplicados nas plantas após três semanas de germinação, durante duas semanas. Após 7 e 14 dias de tratamentos, parâmetros fisiológicos foram determinados. Os lipídios extraídos de folhas foram analisados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa. O acúmulo de transcritos (*VuMGD1*, *VuMGD2*, *VuDGD1*, *VuDGD2*, *VuCLS*, *VuFAD7*, *VuFAD8*, *VuPLD1* e *VuPAT1*) foi detectado em folhas por PCR em tempo real. Em ambos os cultivares, a seca inibiu o crescimento e a fotossíntese através do fechamento estomático, o que pareceu envolver a expressão gênica da fosfolipase D (*VuPLD1*). O ozônio causou injúria foliar e degradação de galactolipídios, principalmente em IT83-D. Neste cultivar, os danos implicaram no aumento da relação DGDG:MGDG e da expressão de *VuDGD2*. Além disso, uma diminuição parcial no teor de fosfolipídios em resposta ao ozônio foi associada ao aumento da expressão de *VuPLD1*, sugerindo-se uma substituição de fosfolipídios por DGDG. Diferentemente, o cultivar EPACE-1 em presença de ozônio, concomitantemente com a degradação de galactolipídios, mostrou um aumento nos teores de lipídios de reserva e de DPG (cardiolipina). A combinação dos estresses levou a resultados semelhantes aos encontrados com a seca aplicada isoladamente, em ambos os cultivares, o que provavelmente reflete a forte restrição da absorção de ozônio devido ao fechamento dos estômatos induzido pela seca. Em conclusão, os presentes resultados ressaltam o

proeminente papel dos lipídios de membrana nos processos de ajustamento metabólico que ocorrem para regular a tolerância das plantas à seca e ao ozônio.

**Palavras-chave :** Estresses combinados. Lipídios de membrana. Ozônio. Seca. *Vigna unguiculata*.

## ABSTRACT

### **Study of the membrane lipid metabolism and associated genes in *Vigna unguiculata* (L.) Walp under combined abiotic stress (drought/ozone)**

Global climate changes are responsible for the increased frequency of episodes of drought and high concentrations of tropospheric ozone, which can occur simultaneously reducing plant growth, limiting agricultural production and affecting the food supply for an increasing world population. These environmental stresses can lead to the overproduction of reactive oxygen species, promoting oxidative stress and causing metabolic imbalance. Cell membranes are the primary targets of damage induced by stresses and the preservation of cell integrity through remodeling of membrane lipids is essential for plant survival under adverse conditions. The objective of this study was to investigate the effects of drought, ozone and the combined stresses in two cowpea cultivars with different degrees of drought tolerance: EPACE-1 (tolerant) and IT83-D (susceptible) through physiological responses and a study focused on the content and composition of membrane lipids, as well as on the expression of genes related to the biosynthesis and degradation of these lipids. Drought and ozone (120 ppb), isolated or in combination, were applied on three-week-old seedlings during two weeks. After 7 and 14 days of treatments, physiological parameters were determined. Lipids extracted from leaves were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry. Transcript accumulation (*VuMGD1*, *VuMGD2*, *VuDGD1*, *VuDGD2*, *VuCLS*, *VuFAD7*, *VuFAD8*, *VuPLD1* and *VuPAT1*) was detected in leaves by real time PCR. In both cultivars, drought inhibited the plant growth and photosynthesis through stomatal closure, which appeared to involve the gene expression of phospholipase D (*VuPLD1*). Ozone caused foliar injury and degradation of galactolipids, mainly in IT83-D. In this cultivar, the damage resulted in an increase in DGDG:MGDG ratio and in *VuDGD2* expression. Furthermore, a partial decrease in the phospholipids content in response to ozone was associated with an increase in *VuPLD1* expression, suggesting a replacement of phospholipids by DGDG. Differently, EPACE-1 cultivar in the presence of ozone, concomitantly with the degradation of galactolipids, showed an increase in storage lipids and DPG (cardiolipin) contents. The two stresses in combination led to results similar to those observed in response to the drought treatment alone, in both cultivars, which likely reflected the severe restriction of ozone uptake

resulting from drought-induced stomatal closure. In conclusion, the present results highlight the prominent role of membrane lipids in the metabolic adjustments that occur for the plant tolerance to drought and ozone.

**Keywords :** Combined stresses. Drought. Membrane lipids. Ozone. *Vigna unguiculata*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Distribuição de ozônio na atmosfera de acordo com a altitude.....	32
Figura 2 -	Representação esquemática do ciclo do ozônio troposférico.....	33
Figura 3 -	Histórico e previsão das concentrações troposféricas de ozônio de 1840 a 2100.....	34
Figura 4 -	Aspectos mais importantes dos efeitos do ozônio nas folhas das plantas.....	40
Figura 5 -	Mapas de previsão mostrando a evolução da seca global nos próximos anos.....	43
Figura 6 -	Ilustração da resposta das plantas à seca.....	50
Figura 7 -	Modelo dos efeitos da produção de etileno induzida por ozônio no fechamento dos estômatos induzido por ABA.....	53
Figura 8 -	Estrutura dos glicerofosfolipídios.....	56
Figura 9 -	Estrutura dos galactolipídios e de um sulfolipídio.....	57
Figura 10 -	Pranchas botânicas representando <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.....	72
Figura 11 -	Câmara de germinação onde as plantas foram cultivadas durante duas semanas sob condições controladas de luz ( $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no nível das plantas durante 14 horas), temperatura (25/20 °C dia/noite) e umidade (UR 80%).....	74
Figura 12 -	Câmaras fitotrônicas onde as plantas foram submetidas a um período de aclimatação de uma semana e submetidas aos diferentes tratamentos por 14 dias.....	75
Figura 13 -	As diferentes classes de lipídios visualizadas sob luz UV após pulverização com primulina na placa de CCF.....	81
Figura 14 -	Visão simplificada da disposição das amostras em uma placa de qPCR.....	94
Figura 15 -	Massa seca da parte aérea de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.....	97



Figura 16 -	Teor relativo de água de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.....	98
Figura 17 -	(a). Rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) e (b). Rendimento máximo do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.....	99
Figura 18 -	Condutância estomática ( $g_s$ ) de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.....	100
Figura 19 -	Deteção de peróxido de hidrogênio com uma coloração de DAB nas folhas de <i>Vigna unguiculata</i> (cultivares EPACE-1 e IT83-D) expostas aos seguintes tratamentos: controle (C), seca (S), ozônio (O), ozônio + seca (OS).....	103
Figura 20 -	Teor de lipídios totais de folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.....	104
Figura 21 -	Teor de MGDG (a) e de DGDG (b) nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.....	108
Figura 22 -	Relação DGDG:MGDG nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.....	109
Figura 23 -	Relação AG totais : AG membranares nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.....	113
Figura 24 -	Teor de fosfolipídios nas folhas de plantas EPACE-1 (a) e IT83-D (b) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.....	115
Figura 25 -	Sequências nucleotídicas (em preto) e de aminoácidos (em azul) deduzidas do cDNA de <i>VuCLS</i> que codifica a cardiolipina sintase em	

	<i>V.unguiculata</i> .....	122
Figura 26 -	Alinhamento da cardiopina sintase (CLS) de <i>Vigna unguiculata</i> (Vu) e de outros representantes da ordem Fabales.....	124
Figura 27 -	Árvore filogenética das sequências de aminoácidos da cardiopina sintase (CLS) em uma espécie representativa de dicotiledôneas, uma espécie representativa de monocotiledôneas e espécies representativas da ordem Fabales.....	125
Figura 28 -	Expressão relativa de genes implicados no metabolismo dos lipídios nas folhas de plantas EPACE-1 (a, b) e IT83-D (c, d) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.....	128

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes selecionados para análise de expressão; produto gênico; sequências (senso e anti-senso) dos oligonucleotídios específicos de <i>V. unguiculata</i> utilizados como iniciadores nas reações de qPCR; tamanho esperado dos fragmentos amplificados por reação de qPCR; N° de acesso no GenBank.....	92
Tabela 2 - Genes de referência testados; produto gênico; sequências dos oligonucleotídios específicos de <i>V. unguiculata</i> utilizados como iniciadores nas reações de qPCR; tamanho esperado dos fragmentos amplificados por reação de qPCR; N° de acesso no GenBank.....	93
Tabela 3 - Média de 12 horas de concentração de ozônio, índice de exposição ao ozônio (AOT40, concentrações de ozônio acumuladas acima de um limiar de 40 ppb) e absorção estomática (POD <sub>0</sub> , dose fitotóxica de ozônio expressa como fluxo estomático de ozônio acumulado), onde as plantas de feijão-de-corda (cultivares EPACE-1 e IT83-D) foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle (C), seca (S), ozônio (O), ozônio + seca (OS).....	102
Tabela 4 - Composição em ácidos graxos dos lipídios totais nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle (C), seca (S), ozônio (O), ozônio + seca (OS).....	106
Tabela 5 - Composição em ácidos graxos de MGDG (a) e de DGDG (b) nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle (C), seca (S), ozônio (O), ozônio + seca (OS).....	111
Tabela 6 - Composição em ácidos graxos de PC (a), PG (b), PI (c), PE (d), PA (e) e DPG (f) nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle (C), seca (S), ozônio (O), ozônio + seca (OS).....	118

## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
AG	Ácidos graxos
AGT	Ácidos graxos totais
Ah	<i>Arachis hypogaea</i>
ANOVA	Análise de variância
AOT40	<i>Accumulated ozone exposure over a threshold of 40 ppb</i> (dose cumulativa de ozônio acima do limiar de concentração de ozônio de 40 ppb)
APX	Ascorbato peroxidase
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BHT	Hidroxitolueno butil
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Controle
Ca	<i>Cicer arietinum</i>
CAT	Catalase
Cc	<i>Cajanus cajan</i>
cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar dos RNA mensageiros
CDP	Citidina-difosfato
CFC	Clorofluorcarburetos
CLS	Cardiolipina sintase
COV	Compostos orgânicos voláteis
Ct	Número de ciclos necessários para atingir o limiar de detecção
CTP	Citidina-trifosfato
DAB	3,3'-diaminobenzina tetrahydroclorido
DAG	Diacilglicerol
DGDG	Digalactosildiailglicerol
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfato
DPG	Difosfatidilglicerol

DTT	Ditiotreitol
E.R.	Expressão relativa
EMAG	Ésteres metílicos de ácidos graxos
EPACE	Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Ceará
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EST	<i>Expressed sequence tag</i> (marcador de sequência transcrita)
FAD	<i>Fatty acid desaturase</i>
F <sub>O3</sub>	Fluxo estomático de ozônio
F <sub>S</sub>	Fluorescência no estado estacionário
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	Rendimento quântico máximo do fotossistema II
Gm	<i>Glycine max</i>
g <sub>O3</sub>	Condutância estomática ao ozônio
g <sub>s</sub>	Condutância estomática ao vapor de água
IPTG	Isopropil- β-D-tiogalactopiranosídeo
La	<i>Lupinus angustifolius</i>
LAH	Lipídio acil-hidrolases
LB	Meio de cultura Luria Bertani
Lj	<i>Lotus japonus</i>
LN	Lipídios neutros
MDA	Malondialdeído
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MF	Massa fresca
MGDG	Monogalactosildiacilglicerol
MS	Massa seca
MSPA	Massa seca da parte aérea
MT	Massa a plena turgescência
Mt	<i>Medicago truncatula</i>
NIST	<i>National Institute of Standards Technology</i>
O	Ozônio
Os	<i>Oryza sativa</i>
OS	Ozônio + seca

PA	Ácido fosfatídico
PAT	<i>Patatin-like lipid acyl -hydrolase</i>
PC	Fosfatidilcolina
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (amplificação em cadeia pela polimerase)
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PGP	Fosfatidil-glicerolfosfato
PI	Fosfatidilinositol
PLA1	Fosfolipase A1
PLA2	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
PLD	Fosfolipase D
POD <sub>0</sub>	<i>Phytotoxic ozone dose above a threshold of 0 nmol.m<sup>-2</sup></i> (fluxo estomático de ozônio acumulado acima de um limiar de 0 nmol.m <sup>-2</sup> )
ppb	Partes por milhão, em volume
PPFD	<i>Photosynthetic photon flux density</i> (densidade de fluxo de fótons fotossintéticos)
PS	Fosfatidilserina
PSII	Fotossistema II
Pv	<i>Phaseolus vulgaris</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
Rubisco	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase
S	Seca
SIR	<i>Single-ion-recording</i>
SQDG	Sulfoquinivosil-diacilglicerol
TAE	Tris, Acetato, EDTA
TAG	Triacilglicerol
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tp	<i>Trifolium pratense</i>
TRA	Teor Relativo de Água
UDP-Gal	Uridina difosfato galactose

UV	Ultra violeta
Va	<i>Vigna angularis</i>
Vu	<i>Vigna unguiculata</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
X-GAL	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D- galactopiranosídeo
$\Phi_{PSII}$	Rendimento quântico do fotossistema II
16:0	Ácido palmítico; ácido hexadecanóico
16:3	Ácido hexadeca-trienóico
18:0	Ácido esteárico; ácido octadecanóico
18:1	Ácido oléico; ácido cis-9-octadecamonoenóico
18:2	Ácido linoléico; ácido cis-9,12-octadecadienóico; ômega 6
18:3	Ácido linolênico; ácido cis-9,12,15-octadecatrienóico; ômega 3

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>30</b>
<b>2.1</b>	<b>O ozônio</b>	<b>30</b>
<i>2.1.1</i>	<i>O ozônio estratosférico</i>	<i>30</i>
<i>2.1.2</i>	<i>O ozônio troposférico</i>	<i>30</i>
<i>2.1.2.1</i>	<i>Formação do ozônio</i>	<i>30</i>
<i>2.1.2.2</i>	<i>Evolução das concentrações em ozônio troposférico</i>	<i>33</i>
<i>2.1.3</i>	<i>Efeitos tóxicos do ozônio troposférico sobre as plantas</i>	<i>35</i>
<i>2.1.3.1</i>	<i>Sintomas fenotípicos</i>	<i>35</i>
<i>2.1.3.2</i>	<i>Produção de biomassa</i>	<i>35</i>
<i>2.1.3.3</i>	<i>Fotossíntese e condutância estomática</i>	<i>35</i>
<i>2.1.3.4</i>	<i>Senescência foliar</i>	<i>37</i>
<i>2.1.4</i>	<i>A ação do ozônio nas células</i>	<i>37</i>
<i>2.1.4.1</i>	<i>Difusão nos tecidos foliares e estresse oxidativo</i>	<i>37</i>
<i>2.1.5</i>	<i>Respostas das plantas ao ozônio</i>	<i>38</i>
<i>2.1.5.1</i>	<i>A detoxificação</i>	<i>38</i>
<b>2.2</b>	<b>A seca</b>	<b>41</b>
<i>2.2.1</i>	<i>Definição e características</i>	<i>41</i>
<i>2.2.2</i>	<i>Efeitos da seca sobre as plantas</i>	<i>44</i>
<i>2.2.2.1</i>	<i>Sintomas fenotípicos</i>	<i>44</i>
<i>2.2.2.2</i>	<i>Produção de biomassa</i>	<i>44</i>
<i>2.2.2.3</i>	<i>Condutância estomática e fotossíntese</i>	<i>44</i>
<i>2.2.2.4</i>	<i>Senescência foliar</i>	<i>45</i>
<i>2.2.2.5</i>	<i>Integridade dos sistemas membranares</i>	<i>46</i>
<i>2.2.3</i>	<i>A ação da seca nas células</i>	<i>46</i>
<i>2.2.3.1</i>	<i>Percepção e sinalização do estresse hídrico</i>	<i>46</i>
<i>2.2.3.2</i>	<i>Produção de EROs e estresse oxidativo</i>	<i>47</i>
<i>2.2.4</i>	<i>Respostas das plantas à seca</i>	<i>48</i>
<i>2.2.4.1</i>	<i>Estratégias de adaptação</i>	<i>48</i>



2.2.4.2	<i>Respostas celulares</i>	49
<b>2.3</b>	<b>Os estresses combinados</b>	<b>51</b>
<b>2.3.1</b>	<b><i>Características</i></b>	<b>51</b>
<b>2.3.2</b>	<b><i>Incidência do ozônio e da seca em escala mundial</i></b>	<b>51</b>
<b>2.3.3</b>	<b><i>Interação do ozônio e da seca combinados em escala celular</i></b>	<b>52</b>
<b>2.4</b>	<b>Os lipídios de membrana</b>	<b>54</b>
<b>2.4.1</b>	<b><i>Generalidades sobre os lipídios</i></b>	<b>54</b>
<b>2.4.2</b>	<b><i>Os lipídios de membrana dos vegetais</i></b>	<b>55</b>
2.4.2.1	<i>Glicerolipídios: fosfolipídios e glicolipídios</i>	55
<b>2.4.3</b>	<b><i>Biossíntese dos lipídios membranares</i></b>	<b>57</b>
2.4.3.1	<i>Vias procariótica e eucariótica</i>	57
2.4.3.2	<i>As dessaturases de ácidos graxos (FADs)</i>	58
2.4.3.3	<i>Biossíntese da fosfatidilcolina (PC)</i>	59
2.4.3.4	<i>Biossíntese do fosfatidilglicerol (PG)</i>	60
2.4.3.5	<i>Biossíntese do difosfatidilglicerol (DPG ou Cardiolipina)</i>	60
2.4.3.6	<i>Biossíntese da fosfatidiletanolamina (PE)</i>	61
2.4.3.7	<i>Biossíntese da fosfatidilserina (PS)</i>	61
2.4.3.8	<i>Biossíntese do fosfatidilinositol (PI)</i>	62
2.4.3.9	<i>Biossíntese do monogalactosildiacilglicerol (MGDG)</i>	62
2.4.3.10	<i>Biossíntese do digalactosildiacilglicerol (DGDG)</i>	63
<b>2.4.4</b>	<b><i>Degradação dos lipídios de membrana</i></b>	<b>64</b>
2.4.4.1	<i>Fosfolipase D</i>	64
2.4.4.2	<i>Lipídio acil-hidrolase tipo patatina</i>	65
<b>2.4.5</b>	<b><i>Efeitos do ozônio sobre os lipídios de membrana</i></b>	<b>66</b>
<b>2.4.6</b>	<b><i>Efeitos da seca sobre os lipídios de membrana</i></b>	<b>67</b>
<b>2.5</b>	<b><i>Vigna unguiculata (L.) Walp</i></b>	<b>69</b>
<b>2.5.1</b>	<b><i>Descrição</i></b>	<b>69</b>
2.5.1.1	<i>Classificação botânica e origem</i>	69
<b>2.5.2</b>	<b><i>Importância econômica e nutricional</i></b>	<b>69</b>
2.5.2.1	<i>Cultura de subsistência</i>	69
2.5.2.2	<i>Valor nutritivo</i>	70

2.5.2.3	<i>Fixação de nitrogênio</i>	70
2.5.3	<b>Clima</b>	70
2.5.3.1	<i>As capacidades de resistência à seca</i>	70
2.5.3.2	<i>Impacto do ozônio sobre o feijão-de-corda</i>	71
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	73
3.1	<b>Material vegetal</b>	73
3.2	<b>Condições de cultura e tratamentos</b>	73
3.2.1	<i>Procedimento de fumigação de ozônio</i>	75
3.3	<b>Análises fisiológicas</b>	76
3.3.1	<i>Medida da massa seca da parte aérea</i>	76
3.3.2	<i>Medida do teor relativo de água</i>	76
3.3.3	<i>Medida da fluorescência da clorofila</i>	76
3.3.4	<i>Medida da condutância estomática ao vapor de água</i>	77
3.3.5	<i>Índices de exposição ao ozônio e de dose de ozônio</i>	78
3.3.6	<i>Acumulação de peróxido de hidrogênio nas folhas</i>	79
3.4	<b>Análises bioquímicas</b>	79
3.4.1	<i>Extração dos lipídios totais de folhas de feijão-de-corda</i>	79
3.4.2	<i>Separação das classes lipídicas por cromatografia de camada fina</i>	80
3.4.3	<i>Metilação dos ácidos graxos</i>	81
3.4.4	<i>Análise dos ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa</i>	82
3.5	<b>Análises moleculares</b>	83
3.5.1	<i>Extração de RNA total</i>	83
3.5.2	<i>Síntese do DNA complementar por transcrição reversa</i>	85
3.5.3	<i>Desenho dos iniciadores da cardiolipina sintase de <u>Vigna unguiculata</u> para clonagem</i>	85
3.5.4	<i>Amplificação do cDNA da cardiolipina sintase por PCR semi-quantitativa</i>	86
3.5.5	<i>Clonagem e sequenciamento do cDNA da cardiolipina sintase</i>	87
3.5.5.1	<i>Ligação de produtos de amplificação de PCR em um vetor de clonagem plasmídico</i>	87

3.5.5.2	<i>Transformação de bactérias competentes</i>	87
3.5.5.3	<i>Reação de PCR sobre colônias bacterianas</i>	88
3.5.5.4	<i>Minipreparação de DNA plasmídico</i>	89
3.5.5.5	<i>Sequenciamento do DNA</i>	89
3.5.6	<i>Análise das sequências de nucleotídeos de VuCLS por bioinformática</i>	90
3.5.7	<i>Desenho dos iniciadores da cardiolipina sintase de <u>Vigna unguiculata</u> para PCR em tempo real</i>	90
3.5.8	<i>Análise da expressão de genes do metabolismo dos lipídios por PCR em tempo real</i>	91
3.5.9	<i>Análises estatísticas</i>	95
4	<b>RESULTADOS</b>	96
4.1	<b>Respostas fisiológicas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> à seca e ao ozônio</b>	96
4.2	<b>Índices de exposição ao ozônio e de dose de ozônio, lesões foliares e acumulação de peróxido de hidrogênio nas folhas</b>	101
4.3	<b>Teor de lipídios totais nas folhas de feijão-de-corda</b>	104
4.4	<b>Composição em ácidos graxos dos lipídios totais</b>	105
4.5	<b>Teor de galactolipídios nas folhas de feijão-de-corda</b>	107
4.6	<b>Relação DGDG:MGDG</b>	109
4.7	<b>Composição em ácidos graxos dos galactolipídios</b>	110
4.8	<b>Proporção de lipídios neutros nas folhas de feijão-de-corda</b>	112
4.9	<b>Teor de fosfolipídios nas folhas de feijão-de-corda</b>	114
4.10	<b>Composição em ácidos graxos dos fosfolipídios</b>	116
4.11	<b>Identificação do gene de <i>Vigna unguiculata</i> codificando para uma cardiolipina sintase</b>	121
4.12	<b>Expressão dos genes codificadores das enzimas implicadas no metabolismo dos lipídios de membrana nas folhas de feijão-de-corda</b>	126
5	<b>DISCUSSÃO</b>	129
5.1	<b>Respostas fisiológicas e moleculares à seca</b>	129
5.2	<b>Respostas fisiológicas e moleculares ao ozônio</b>	131
5.3	<b>Diferenças de sensibilidade ao ozônio entre os cultivares</b>	132

<b>5.4</b>	<b>Participação de DGD2 e de PLD<math>\alpha</math> na remodelagem da membrana sob ozônio em IT83-D</b>	<b>134</b>
<b>5.5</b>	<b>Papel da cardiolipina na tolerância ao ozônio em EPACE-1</b>	<b>135</b>
<b>5.6</b>	<b>Atenuação pela seca dos efeitos do ozônio através da redução de sua absorção estomática</b>	<b>136</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>138</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>139</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>157</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Estima-se que a população mundial deverá crescer acima de 9 bilhões em menos de 40 anos. Além disso, padrões médios de vida também estão aumentando, impactando o consumo de alimentos, a demanda por grãos para alimentação do gado e, em última análise, o uso de terras agrícolas. Portanto, para atender a essas exigências, há uma necessidade óbvia e urgente de aumentar ainda mais a produtividade das colheitas (COMINELLI *et al.*, 2012). No entanto, as mudanças climáticas globais representam um sério desafio para a produção agrícola em todo o mundo, afetando o crescimento e a produtividade das plantas, causando perdas anuais estimadas em bilhões de dólares (MITTLER; BLUMWALD, 2010; NELSON *et al.*, 2014). O aumento da temperatura e a precipitação alterada estão entre os principais componentes das mudanças climáticas globais atualmente e ambos contribuem para aumentar regionalmente a frequência e a intensidade dos episódios de seca. A disponibilidade de água constitui um fator limitante da produtividade das plantas, e a seca, em particular, é considerada um dos estresses abióticos mais maléficos no rendimento das culturas (ARAUS *et al.*, 2002). A poluição do ar é outro aspecto da perturbação antropogênica do ambiente, sendo o ozônio troposférico considerado o poluente mais prejudicial para as plantas (WILKINSON *et al.*, 2012). Como as altas temperaturas e irradiância promovem tanto a produção de ozônio como o déficit hídrico, a ocorrência de elevada exposição ao ozônio durante os episódios de seca é comum em regiões semiáridas. Com isso, as plantas pertencentes a essas regiões desenvolveram mecanismos elaborados para detectar as variações de seu ambiente e responder a essas mudanças através de ajustes apropriados.

Dada a importância das membranas celulares na percepção dos estresses, sendo os primeiros alvos de espécies reativas de oxigênio, a manutenção da sua integridade é então um elemento-chave para a tolerância das plantas, já que os lipídios de membrana podem atuar na remodelação da fluidez dessas membranas e na reorganização dos componentes celulares (UPCHURCH, 2008).

No presente trabalho, foram examinados os efeitos da seca, do ozônio e da combinação de ambos os estresses sobre o feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], que é uma leguminosa essencial nas regiões semiáridas dos trópicos e subtropicais, representando a principal fonte econômica e de alimento no Nordeste do Brasil (SPRENT; ODEE; DAKORA,

2010). Equanto o impacto do estresse hídrico sobre o feijão-de-corda tem sido amplamente documentado (CRUZ DE CARVALHO; LAFFRAY; LOUGUET ,1998; MONTEIRO DE PAULA *et al.*, 1990; MATOS *et al.*, 2001; TORRES-FRANKLIN *et al.*, 2007, 2009), os efeitos da exposição crônica ao ozônio e de interação entre o ozônio e a seca no cultivo dessa leguminosa ainda não foram bem explorados. O estudo comparativo de dois cultivares com diferenciada sensibilidade ao estresse hídrico permitiu testar se a tolerância à seca pôde ser correlacionada com uma maior tolerância ao ozônio (CRUZ DE CARVALHO; LAFFRAY; LOUGUET ,1998). Para tanto, além da caracterização das respostas fisiológicas relacionadas à produção de biomassa, às trocas gasosas e à fotossíntese dos dois cultivares, uma atenção específica foi dada para o teor de lipídios de membrana (galactolipídios: MGDG e DGDG; fosfolipídios: PC, PG, PE, PI, PA e cardiolipina), sua composição em ácidos graxos e o grau de insaturação, bem como a expressão de genes associados à biossíntese (MGDG sintase, DGDG sintase, cardiolipina sintase, dessaturases de ácidos graxos) e à degradação (fosfolipase D e lipídio acil-hidrolase tipo patatina) desses lipídios. Além disso, para o estudo da expressão do gene da cardiolipina sintase, o cDNA correspondente foi clonado, sequenciado e caracterizado pelo uso de técnicas de bioinformática.

A partir dessa proposta, o estudo dos efeitos da seca, do ozônio e da combinação de ambos sobre os lipídios de membrana e seu metabolismo pode ser essencial para identificação de lipídios indicadores de tolerância a esses estresses. Portanto, é evidente que há urgente necessidade na compreensão dos processos de adaptação desencadeados pelas plantas em resposta a situações desfavoráveis, considerando sobretudo a premência do aumento da produção agrícola em função do crescimento da população mundial. Dessa forma, o presente trabalho representa uma contribuição importante no âmbito da compreensão dos mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares de adaptação das plantas a condições adversas. Tal conhecimento é fundamental para aplicação biotecnológica com vistas à produção de plantas resistentes aos referidos estresses.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 O ozônio**

A molécula de ozônio ( $O_3$ ) é uma variedade alotrópica do oxigênio, composta de três átomos, presente naturalmente na atmosfera. Esses três átomos de oxigênio estão espacialmente dispostos de modo a formar um triângulo isósceles de 1,278 Å com um ângulo de 116,8°. À temperatura ambiente, o  $O_3$  é um gás incolor altamente eletrofílico com potencial de oxido-redução de 2,076 V. Em contato com meio aquoso, o  $O_3$  possui meia-vida muito curta e se decompõe rapidamente para formar espécies reativas de oxigênio, que são muito reativas (VON GUNTEN, 2007).

#### ***2.1.1 O ozônio estratosférico***

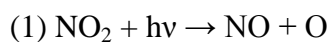
O ozônio estratosférico (entre 15 e 35 km de altitude) constituinte da camada de ozônio representa aproximadamente 80% do conteúdo global de ozônio da atmosfera e protege a biosfera dos efeitos nocivos da radiação solar absorvendo as radiações UV-B ( $200 < \lambda < 320$  nm) (Figura 1). Os clorofluorcarbonos (CFC) e outros poluentes do ar que se difundem na camada de ozônio são responsáveis pela destruição dessa camada, o que aumenta a quantidade de raios UV que atingem a superfície da terra e afetam negativamente a maioria dos organismos vivos (ROWLAND, 2006; SOLOMON, 1999).

#### ***2.1.2 O ozônio troposférico***

##### ***2.1.2.1 Formação do ozônio***

Ao contrário do ozônio estratosférico, que protege contra a radiação solar ultravioleta de ondas curtas, o ozônio troposférico (entre 0 e 15 km de altitude) é um poluente atmosférico e um gás de efeito estufa (Booker et al., 2009) (Figura 1).

O ozônio troposférico é formado pela interação entre os raios UV do sol e os dióxidos de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) resultantes de atividades antropogênicas (como indústria e transportes em zonas urbanas). O  $\text{NO}_2$  absorve raios UV e sofre decomposição em monóxido de nitrogênio ( $\text{NO}$ ) e oxigênio ativo ( $\text{O}^2\cdot$ ) (reação 1) que, em contato com o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), produz ozônio ( $\text{O}_3$ ) (reação 2). A reação é reversível quando o  $\text{O}_3$  e o  $\text{NO}$  reagem para formar  $\text{O}_2$  e  $\text{NO}_2$  (3). No entanto, compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos principalmente de fontes naturais, como pelas plantas e também pela indústria, podem formar espécies reativas de oxigênio (radicais como  $\text{HO}_2\cdot$  ou  $\text{RO}_2\cdot$ ) que vão competir com o  $\text{O}_3$  na formação de  $\text{NO}_2$  (reação 4), o que faz que o  $\text{O}_3$  se acumule na atmosfera, sendo transportado para zonas rurais e florestas. As 4 referidas reações abaixo discriminadas, envolvidas na produção de ozônio, são mais intensas sobretudo na primavera e no verão, estações caracterizadas pelas condições atmosféricas de alta temperatura, alta irradiância e baixa velocidade do vento (FINAISON-PITTS; PITTS, 1993; JENKIN; CLEMITSHAW, 2000) (Figura 2).



*onde M é um parceiro de colisão não afetado pela reação*

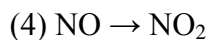
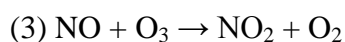
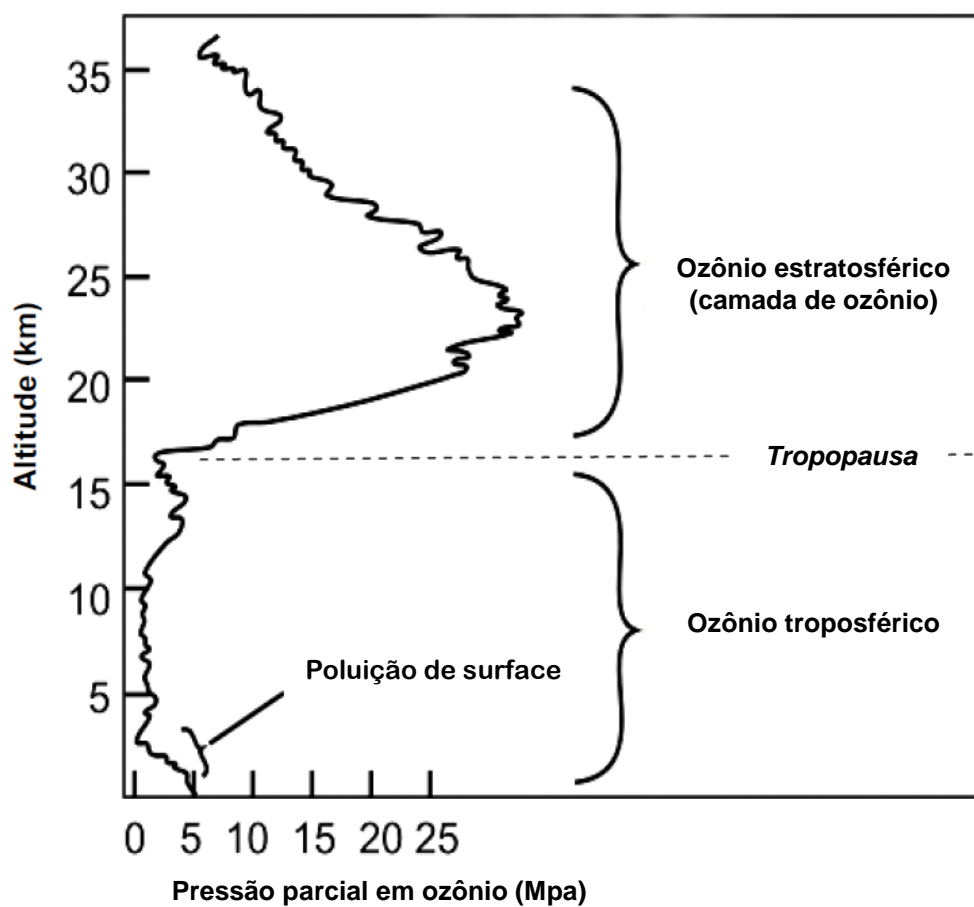


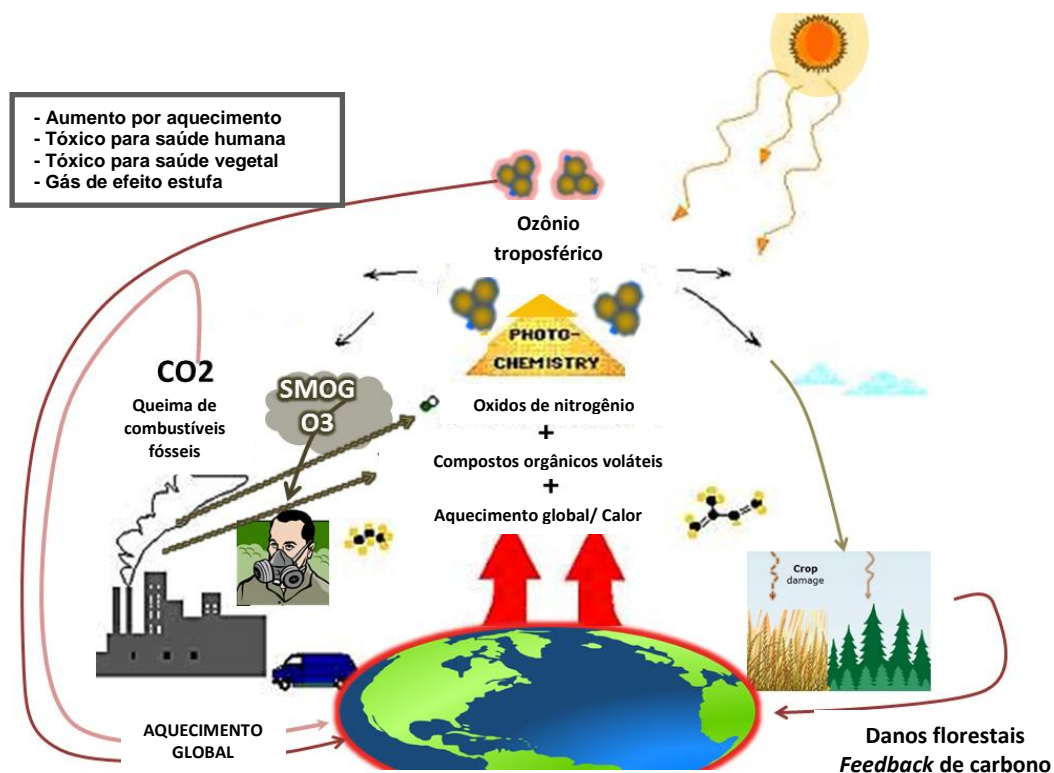


Figura 1 - Distribuição de ozônio na atmosfera de acordo com a altitude.



Fonte: NASA - *Earth Observing System (EOS) Science Plan*.

Figura 2 - Representação esquemática do ciclo do ozônio troposférico.

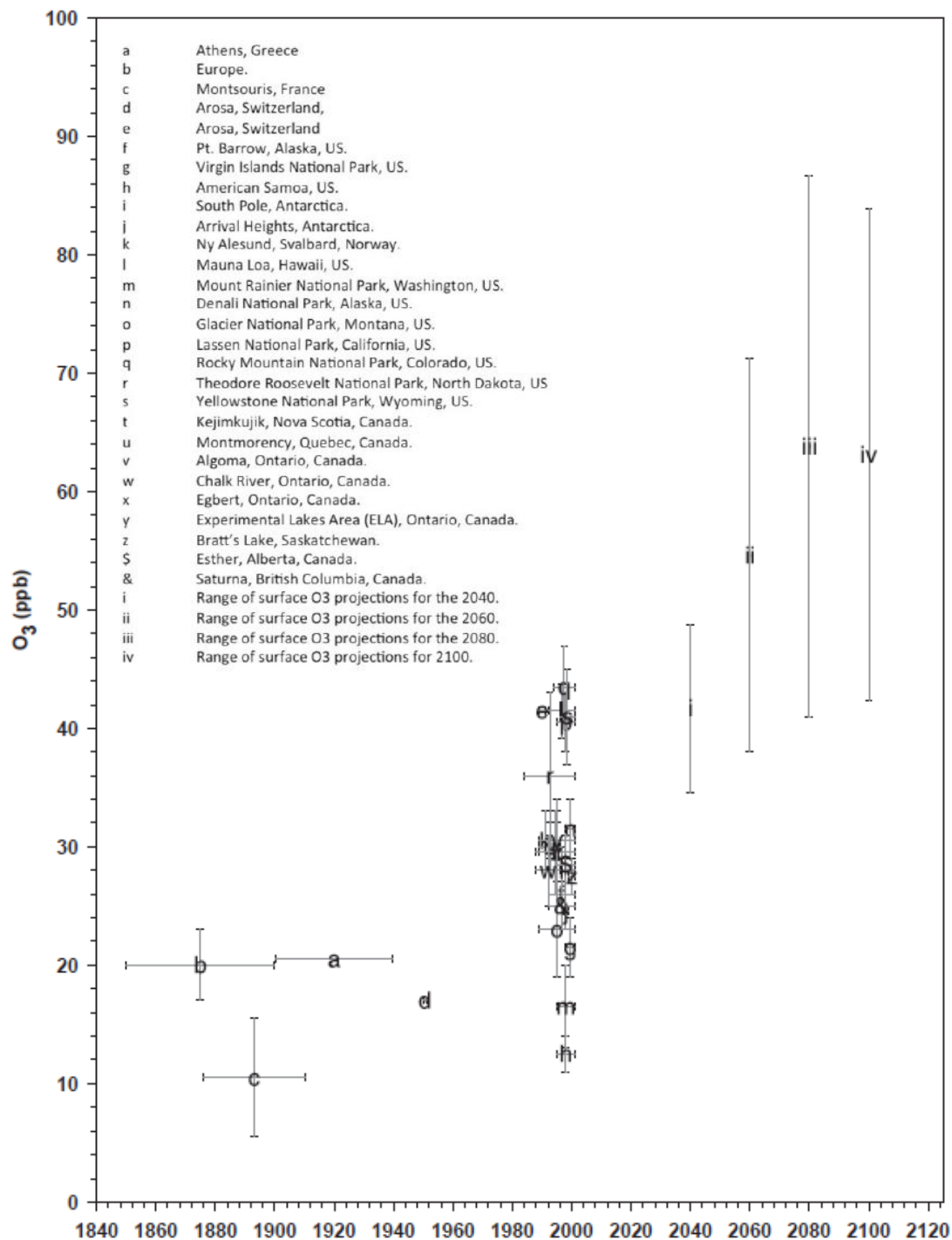


Fonte: *Climate change and food security*.

### 2.1.2.2 Evolução das concentrações em ozônio troposférico

A evolução do ozônio troposférico ao longo do tempo (Figura 3) é alvo de interesse por parte dos pesquisadores, uma vez que o ozônio é um gás que gera efeito estufa e aumentos significativos em suas concentrações ao longo do século passado contribuíram para mudanças climáticas (PARRISH *et al.*, 2012). A escala do problema tem crescido ao longo dos últimos 25 anos, como resultado do aumento da densidade populacional, da industrialização e das atividades ligadas ao transporte em muitas partes do mundo, especialmente nos países menos desenvolvidos (FISCUS *et al.*, 2005).

Figura 3 - Histórico e previsão das concentrações troposféricas de ozônio de 1840 a 2100.



Valores históricos (a, b, c, d), medidas recentes (e & ) e projeções do GIEC (i, ii, iii, iv). As barras de erros correspondem aos desvios-padrão indicados nas fontes de publicação.

Fonte: Vingarzan (2004).

A concentração média de ozônio troposférico é maior no hemisfério norte, urbanizado e industrializado, do que no hemisfério sul (OLTMANS *et al.*, 2006). Em regiões temperadas do hemisfério norte, a concentração de ozônio durante o dia atinge valores que variam entre 20 e 45 ppb, com variabilidade dependente da localização geográfica, da altitude e da extensão da influência humana (VINGARZAN, 2004). Do período pré-industrial ao ano 2000, a concentração média de ozônio aumentou aproximadamente de 38 nmol.mol<sup>-1</sup> para 50 nmol.mol<sup>-1</sup>. Projeções futuras quanto a essa concentração indicam que em 2100 o teor de ozônio atinja o valor de 80 nmol.mol<sup>-1</sup> (FISCUS *et al.*, 2005).

### ***2.1.3 Efeitos tóxicos do ozônio troposférico sobre as plantas***

O ozônio troposférico pode danificar as plantas, causando impactos ecológicos e econômicos significativos, que variam desde a diminuição de produtividade até a morte da planta (PAOLETTI; MANNING, 2007).

#### ***2.1.3.1 Sintomas fenotípicos***

As consequências mais visíveis de poluição pelo ozônio troposférico sobre a vegetação são os danos que se manifestam como manchas cloróticas ou necróticas na superfície das folhas em forma de pontos, que podem se fundir para formar áreas lesionadas maiores (Figura 4). Esses sintomas foram confirmados em 27 espécies vegetais que cresceram em campos agrícolas de toda Europa e são causados por indução de radicais livres da morte celular não-regulada e/ou programada (MILLS *et al.*, 2011). Tais lesões visíveis são responsáveis pela redução da produção agrícola, mesmo que ocorram no início da fase vegetativa de crescimento das culturas (WILKINSON *et al.*, 2012).

#### ***2.1.3.2 Produção de biomassa***

A exposição crônica ao ozônio é responsável pela redução da biomassa vegetal e pelas perdas significativas de crescimento e de rendimento para numerosas espécies de

importância agronômica (WILKINSON *et al.*, 2012). A redução na biomassa da raiz (o que indiretamente reduz o rendimento) é devido à diminuição da translocação de carbono da parte aérea para a raiz via floema, ou alteração no teor hormonal, como o etileno, que controla o crescimento das raízes (WILKINSON; DAVIES, 2010). Redução induzida pelo ozônio na biomassa da raiz causa indiretamente impacto na parte aérea e conseqüentemente na produção de grãos via redução da capacidade da planta para absorver nutrientes e água necessários para o crescimento e o rendimento vegetal (WILKINSON *et al.*, 2012).

No ano 2000, estimou-se que a perda de produtividade induzida pelo ozônio em 23 culturas de 47 países europeus, que foi aproximadamente de  $6,7 \pm 2,5$  milhões/ano, isto é, correspondeu a 2% da produção agrícola desse ano (HOLLAND *et al.*, 2006). Considerando que 20% é o valor estimado na perda da produção agrícola na Europa, 5% ou mais desse valor deve-se à poluição pelo ozônio (MILLS *et al.*, 2007). A concentração crescente de ozônio, ao longo dos anos, deverá reduzir cada vez mais o rendimento das culturas devido ao estresse oxidativo nos tecidos foliares e reprodutivos (FISCUS *et al.*, 2005).

### 2.1.3.3 Fotossíntese e condutância estomática

Dentre os interesses de estudo dos efeitos danosos do ozônio nas plantas, está a fotossíntese. Em geral, a exposição crônica ao ozônio causa perdas da capacidade fotossintética devido, principalmente, à redução da eficiência de carboxilação diretamente relacionada com a perda de atividade da Rubisco ou a uma diminuição da sua concentração nas folhas, resultando num aumento da concentração interna de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) e no fechamento estomático (BAGARD *et al.*, 2008; DIZENGREMEL, 2001; FISCUS *et al.*, 2005; LEITAO *et al.*, 2007; PELL *et al.*, 1994) (Figura 4). No entanto, existe um efeito direto do ozônio sobre o funcionamento de células-guarda, levando a alterações na dinâmica dos estômatos, gerando diminuição do rendimento fotossintético e da condutância estomática (LOMBARDOZZI *et al.*, 2012). Contudo, a redução da capacidade fotossintética é parcialmente compensada pelo estímulo da respiração através da atividade da PEPC (DGHIM *et al.*, 2012; DIZENGREMEL, 2001).

O ozônio também tem efeitos nocivos no transporte fotossintético de elétrons, especialmente na função do PSII (FISCUS *et al.*, 2005). Estudos com *Phaseolus vulgaris*

mostraram diminuição significativa de  $F_v/F_m$ , que representa a eficiência de captura da energia de excitação pelo PSII nas folhas adaptadas ao escuro, sugerindo danos ou desativação do fotossistema (GUIDI *et al.*, 2000, 2002).

#### 2.1.3.4 Senescência foliar

Um dos efeitos mais comuns do ozônio é promover a senescência foliar (PELL *et al.*, 1997). Morgan *et al.* (2003) atribuíram a perda de produtividade da soja à senescência acelerada, representada pela diminuição do teor de clorofila das folhas expostas ao ozônio. A degradação da clorofila e da Rubisco poderia ser resultado direto da exposição ao ozônio, iniciando a senescência foliar, ou poderia resultar do disparo da senescência foliar pelo ozônio por outras vias (PELL *et al.*, 1994).

### 2.1.4 A ação do ozônio nas células

#### 2.1.4.1 Difusão nos tecidos foliares e estresse oxidativo

Durante a luz do dia, quando a fotossíntese está ativa e quando não há seca extrema, os estômatos das folhas estão amplamente abertos para permitir a absorção do  $\text{CO}_2$  e a liberação do  $\text{O}_2$ . Ao mesmo tempo, as moléculas de ozônio entram nas folhas das plantas por meio dos estômatos. Assim, os estômatos são a primeira barreira mecânica de defesa no controle da entrada de ozônio nas plantas (RENAUT *et al.*, 2009) (Figura 4). Dentro das folhas, o ozônio é altamente reativo e pode interagir rapidamente com água, tióis, compostos fenólicos e metais de transição no apoplasto e com as paredes e membranas celulares gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), radical perhidroxila ( $\text{HOO}\cdot$ ), radical superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), radical hiperóxido ( $\cdot\text{O}_2\text{H}$ ) ou oxigênio singlete ( $^1\text{O}$ ) (FISCUS *et al.*, 2005; LANGEBARTELS *et al.*, 2002; ASHMORE, 2005; WITTIG *et al.*, 2009, 2007). Essas EROs podem reagir com os lípidos de membrana para gerar peróxidos lipídicos, que podem desencadear uma série de reações que produzem intermediários oxigenados reativos. Esses radicais livres nocivos e seus produtos reagem com proteínas, DNA e lípidos de membrana

causando redução da atividade fotossintética, vazamento de eletrólitos, aceleração da senescência e efeitos adversos nos processos metabólicos, geralmente associados à exposição ao ozônio (SHARMA; DAVIS, 1997). No entanto, sob condições controladas, EROs são moléculas de sinalização produzidas pelas reações que ocorrem nas cadeias de transporte de elétrons dos cloroplastos, durante a fotossíntese, das mitocôndrias, durante a respiração celular, bem como dos peroxissomos, durante a fotorrespiração (ASADA, 2006; BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010; DEL RIO *et al.*, 2006). A ação das EROs como moléculas tóxicas e/ou de sinalização depende do delicado equilíbrio entre sua produção e sua eliminação. Por causa dos papéis multifuncionais das EROs, é necessário que as células controlem firmemente o teor de EROs para prevenir o dano oxidativo e permitir a sinalização celular (MITTLER, 2006; SHARMA *et al.*, 2012).

### **2.1.5 Respostas das plantas ao ozônio**

#### **2.1.5.1 A detoxificação**

A principal resposta bioquímica das plantas como estratégia adaptativa a qualquer tipo de estresse ambiental é o aumento das atividades e das quantidades de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, guaiacol peroxidase, ascorbato peroxidase, etc) e seus metabólitos ou de antioxidantes não enzimáticos (ascorbato, glutathione, carotenóides, tocoferóis e compostos fenólicos) (SHARMA *et al.*, 2012; SHARMA; DAVIS, 1997). Apesar de concentrações elevadas de ozônio serem tóxicas para os organismos vivos, as plantas desenvolveram reações de adaptação eficazes, permitindo-lhes desintoxicar esse poluente do ar (FISCUS *et al.*, 2005; KANGASJÄRVI *et al.*, 1994).

Entre os antioxidantes não enzimáticos, o ácido ascórbico apoplástico constitui a primeira linha de defesa contra o ozônio (DIDYK; BLUM, 2011; FISCUS *et al.*, 2005; SHARMA; DAVIS, 1997) (Figura 4). Ele é primeiramente sintetizado no interior das células (SMIRNOFF *et al.*, 2001), seguido do transporte do citoplasma para o espaço extracelular por transportadores específicos localizados na membrana plasmática (HOREMANS *et al.*, 2000). O ácido ascórbico no apoplasto das folhas é um fator importante na detoxificação do ozônio extracelular e de EROs, na proteção das membranas plasmáticas contra danos oxidativos e na

prevenção de lesões visíveis. Pode ser usado tanto como um eliminador químico direto do ozônio ou como um substrato para as enzimas extracelulares (por exemplo, a ascorbato peroxidase) que atenuam as quantidades de EROs e, por conseguinte, afetam a propagação do sinal inicial de ozônio (FISCUS *et al.*, 2005; SHARMA; DAVIS, 1997). Vários estudos têm mostrado uma correlação entre o ascorbato apoplástico e as concentrações de ozônio da atmosfera (LUWE *et al.*, 1993). A exposição ao ozônio levou ao aumento dos teores de ascorbato apoplástico nas folhas de *Sedum album* (GREPPIN; CASTILLO, 1988) e nas folhas de trigo (FANGMEIER *et al.*, 1994). Esses e outros resultados sugerem que o ascorbato provavelmente desempenha um papel importante na concessão de resistência ao estresse oxidativo imposto pela exposição ao ozônio. No entanto, a quantidade de ácido ascórbico no apoplasto de folhas pode ser bastante pequena em determinadas espécies vegetais, o que sugere que o sequestro extracelular de ozônio e de EROs pelo ascorbato não deve ser um fator significativo em todas as plantas (FISCUS *et al.*, 2005).





## 2.2 A seca

### 2.2.1 Definição e características

A seca é um evento climático extremo, recorrente na Terra, caracterizada por precipitações pluviométricas abaixo do esperado durante meses ou anos, muitas vezes acompanhada com temperaturas elevadas. O período seco é temporário e ocorre em muitas partes do mundo, mesmo em regiões úmidas. Essa seca meteorológica induz outros tipos de seca: hidrológica e agrícola. A seca hidrológica é caracterizada pela redução da vazão de rios e do armazenamento de água em aquíferos, lagos ou reservatórios abaixo dos valores médios obtidos ao longo de anos precedentes. Já a seca agrícola é caracterizada pelos solos secos decorrentes da seca meteorológica, com alta taxa de evaporação, levando à redução da produção agrícola (DAI, 2010).

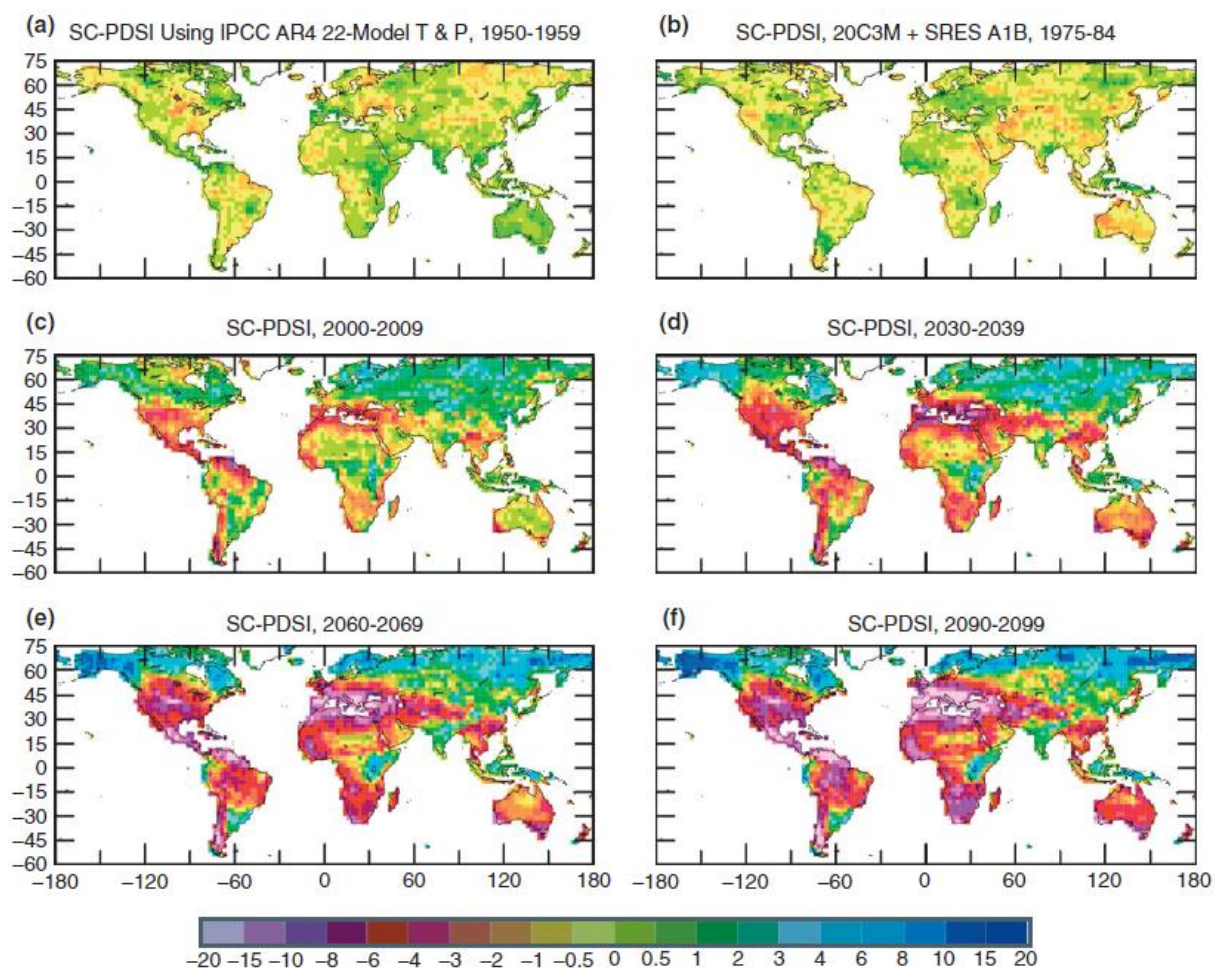
A seca impacta tanto os recursos hídricos de superfície quanto os subterrâneos e pode levar à diminuição da oferta de água, à má qualidade da água, e, conseqüentemente, a más colheitas e redução de produtividade, além de afetar uma série de atividades econômicas e sociais (MISHRA; SINGH, 2010).

Nos últimos anos, as secas intensas têm sido observadas em todos os continentes, afetando grandes áreas da Europa, África, Ásia, Austrália, América do Sul, América Central e América do Norte (LE COMTE, 1997) (Figura 5). Em regiões secas, como Austrália, África do Norte, América do Sul e partes da China e da América do Norte, as precipitações anuais ocorrem durante apenas 25 dias. Mesmo em locais onde a pluviometria é mais presente, como no Noroeste dos Estados Unidos e da Europa, é interessante notar que a maior parte da precipitação total anual geralmente ocorre em menos de 80 dias. Além disso, as fortes chuvas ocorrem raramente e são poucos milímetros por dia. Áreas onde a maioria da precipitação anual ocorre entre 10 a 15 dias são menos vulneráveis às secas (SUN *et al.*, 2006). Em 1988, uma forte seca ocorreu na região Central e Leste dos Estados Unidos, com perdas muito graves para a agricultura e indústrias relacionadas. Cerca de 67% da precipitação anual normalmente ocorre em cerca de 20-30 dias no Sudeste dos Estados Unidos, 30-40 dias no Nordeste e 40-55 dias no Noroeste, enquanto que no Sudoeste seco, a maior parte da precipitação anual geralmente ocorre em menos de 10 dias.

Assim, no Sudoeste seco, a falta de chuvas fortes podem ter um impacto significativo no clima deste ano, razão pela qual as áreas secas são vulneráveis à seca. As análises mostram que a alteração no número de dias de chuva é mais importante do que a variação da intensidade da produção de seca em 1988 (SUN *et al.*, 2006).

A maior variabilidade de dias chuvosos é encontrada em regiões áridas e semi-áridas, enquanto que as mudanças de dias de ano para ano são geralmente pequenas em áreas úmidas. Isso é consistente com a idéia de que as secas são muito menos prováveis de ocorrer em regiões úmidas do que em regiões secas, enfatizando a importância de episódios de chuvas fortes na determinação da disponibilidade de água por região (SUN *et al.*, 2006).

Figura 5 - Evolução da seca ao longo dos anos.



Os mapas mostram o potencial da seca atual e no futuro em todo o mundo ao longo das décadas indicadas, com base nas projeções atuais das emissões futuras de gases de efeito estufa. Os mapas usam o Índice *Palmer Drought Severity*, que atribui os números positivos quando as condições são excepcionalmente úmidas para uma determinada região, e os números negativos quando as condições são excepcionalmente secas.

Fonte: Dai (2010).

## ***2.2.2 Efeitos da seca sobre as plantas***

Os efeitos fisiológicos da seca nas plantas incluem o fechamento dos estômatos, a diminuição da atividade fotossintética, a alteração da elasticidade da parede celular e até mesmo a geração de metabólitos tóxicos, causando a morte da planta (AHUJA *et al.*, 2010).

### ***2.2.2.1 Sintomas fenotípicos***

O efeito da seca pode resultar em alterações morfológicas que afetam a parte aérea ou subterrânea: redução da área foliar e do número de perfilhos, ondulação das folhas e/ou melhor desenvolvimento do sistema radicular (SLAMA *et al.*, 2005).

### ***2.2.2.2 Produção de biomassa***

Um dos efeitos fisiológicos da seca sobre as plantas são a redução do crescimento vegetativo, em especial o crescimento da parte aérea. Em geral, o crescimento da folha é mais sensível do que o crescimento das raízes. A redução da expansão foliar é favorável às plantas sob condições de déficit hídrico, já que a área foliar é exposta, resultando numa transpiração reduzida. No que diz respeito à raiz, o crescimento relativo pode causar uma melhoria, o que facilita a capacidade do sistema de raízes extrair mais água das camadas profundas do solo (MAHAJAN; TUTEJA, 2005).

### ***2.2.2.3 Condutância estomática e fotossíntese***

A primeira resposta de quase todas as plantas à escassez aguda de água é o fechamento de seus estômatos para evitar a perda de água através da transpiração. Essa reação funciona mais ou menos precocemente ao aparecimento do período de seca, de acordo com a estratégia inerente (e aclimatação) das plantas a um estresse hídrico (CRUZ DE CARVALHO, 2008). O fechamento dos estômatos pode resultar da evaporação direta da água a partir das

células-guarda, sem a participação metabólica. Esse processo de fechamento estomático é referido como fechamento hidropassivo. O fechamento dos estômatos também pode ser metabolicamente dependente e envolve processos que resultam na inversão dos fluxos de íons que causam a abertura dos estômatos. Esse processo de fechamento dos estômatos, que requer íons e metabólitos, é conhecido como fechamento hidroativo e parece ser regulado por ABA. O ABA favorece o efluxo de íons  $K^+$  das células-guarda, o que causa perda da pressão de turgor, levando ao fechamento dos estômatos. O fechamento nem sempre depende da percepção dos sinais de déficit hídrico resultante das folhas. Na verdade, o fechamento também responde diretamente à dessecação do solo antes mesmo de existir uma redução significativa na pressão de turgescência do mesofilo foliar (MAHAJAN; TUTEJA, 2005).

A limitação estomática foi geralmente aceita como principal determinante da redução da fotossíntese sob estresse hídrico. Isso foi atribuído a uma diminuição tanto na taxa de fotossíntese das folhas quanto na concentração interna de  $CO_2$ , o que, finalmente, inibe o metabolismo fotossintético total (REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004). Foi demonstrado que a diminuição da taxa de fotossíntese sob seca é principalmente devido à deficiência em  $CO_2$ , já que a eficiência fotoquímica poderia ser trazida ao normal após rápida transição das folhas para um ambiente rico em  $CO_2$  (MEYER; GENTY, 1998). Além disso, a diminuição dos níveis intracelulares de  $CO_2$  resulta na superredução dos componentes da cadeia de transporte de elétrons, e os elétrons são transferidos ao oxigênio no fotossistema I, o que produz EROs (LI; SHERMAN, 2000). Além disso, foi relatado que a redução na atividade da Rubisco resulta em fotossíntese limitada em condições de seca severa (BOTA; FLEXAS; MEDRANO, 2004).

#### 2.2.2.4 *Senescência foliar*

A senescência foliar induzida pela seca ocorre progressivamente e é caracterizada por alterações macroscópicas, celulares, bioquímicas e moleculares específicas. O amarelecimento das folhas (isto é, a degradação da clorofila) e as alterações específicas na ultraestrutura celular (por exemplo, a condensação da cromatina, o inchaço do tilacóide, a acumulação de plastoglobulos), no metabolismo (por exemplo, a degradação de proteínas, a peroxidação

lipídica) e na expressão dos genes ocorrem durante a senescência foliar nas plantas vítimas de seca. As citocininas e o ABA mostraram estar envolvidos na regulação da senescência das folhas induzida pela seca, embora o papel potencial de outros hormônios vegetais não deva ser excluído. As espécies reativas de oxigênio, cuja concentração aumenta durante a senescência das folhas induzida pela seca, são também conhecidas por serem reguladoras desse processo que é importante para evitar grandes perdas por transpiração, contribuindo para a manutenção do balanço hídrico na planta (MUNNE-BOSCH; ALEGRE, 2004).

#### *2.2.2.5 Integridade dos sistemas membranares*

A pressão exercida sobre a membrana é um dos efeitos graves da seca envolvidos na fisiologia das plantas. Numa situação em que o déficit de água torna-se muito intenso ou prolongado, as plantas podem murchar, as células podem sofrer retração e isso pode levar a estresse mecânico sobre as membranas celulares. A remoção de água da membrana perturba a estrutura normal da bicamada e resulta numa membrana excepcionalmente porosa quando ressecada. O estresse no interior da bicamada lipídica pode também resultar no deslocamento de proteínas da membrana, o que contribui para a perda da integridade membranar, a seletividade, a perturbação da compartimentação celular e a perda de atividade das enzimas. Além de danos à membrana, proteínas citosólicas e organelas podem apresentar uma atividade reduzida ou podem ainda sofrer uma desnaturação completa quando desidratadas. A elevada concentração de eletrólitos celulares devido à desidratação do protoplasma também pode causar distúrbios no metabolismo celular (MAHAJAN; TUTEJA, 2005).

### *2.2.3 A ação da seca nas células*

#### *2.2.3.1 Percepção e sinalização do estresse hídrico*

A adaptação das plantas às mudanças no estado hídrico do ambiente exige a detecção rápida e sensível da situação de estresse (GOLLDACK *et al.*, 2014). De fato, o aumento da produção de EROs celular é captado pela planta como um sinal de aviso que desencadeia um

ciclo de defesa e de respostas de aclimação, o que permite que a planta se adapte às alterações do ambiente (CRUZ DE CARVALHO, 2008). Proteínas receptoras e sensores localizados nas membranas desempenham um papel importante nas diferentes vias de sinalização pela transmissão de informações a suas proteínas-alvo citoplasmáticas através dos processos catalíticos tais como a fosforilação. A sinalização da membrana plasmática levantou a hipótese de estar envolvida no processo inicial da percepção do estado hídrico no exterior da célula (OSAKABE, 2014). Crescentes evidências do envolvimento dos lipídios de sinalização na detecção primária das mudanças ambientais e na iniciação e regulação de cascatas de sinalização hormonal têm surgido. O ABA é também considerado um sinal chave envolvido na regulação da resposta das plantas a diferentes estresses, em particular no funcionamento da regulação estomática de plantas submetidas ao déficit hídrico (WILKINSON; DAVIES, 2002). Curiosamente, a interação entre a sinalização dependente de ABA e as vias do metabolismo lipídico mantém a estrutura e a função das membranas celulares. Assim, a alteração do metabolismo lipídico primário desencadeada por ABA ajuda a enfatizar a reorganização das membranas adaptadas aos estresses e a manter o fornecimento de energia celular nas condições de estresse abiótico e de limitação do abastecimento de água (GOLLDACK *et al.*, 2014).

#### 2.2.3.2 *Produção de EROs e estresse oxidativo*

O aumento da produção de EROs conduz a estresse oxidativo nas plantas em crescimento. Sob seca, essa produção é aumentada de várias maneiras. A limitação da assimilação de CO<sub>2</sub> devido ao fechamento dos estômatos permitirá reduzir a regeneração de NADP<sup>+</sup> através do ciclo de Calvin, causando assim superredução da cadeia fotossintética de transporte de elétrons e resultando na produção acelerada de EROs no cloroplasto. Durante a fotossíntese e em caso de seca, há maior vazamento dos elétrons ao oxigênio pela reação de Mehler. No entanto, é muito difícil avaliar a parte de EROs gerada pela reação de Mehler daquela gerada por fotorrespiração. De fato, a via fotorrespiratória também é aumentada, em particular, quando a oxigenação da ribulose 1,5-bisfosfato é máxima devido à limitação da fixação do CO<sub>2</sub>. O cloroplasto é um compartimento celular muito firme contra EROs devido a diferentes enzimas de detoxificação e a metabólitos presentes. Entretanto, em virtude da seca, uma das reais ameaças



para o cloroplasto é a produção do radical hidroxila nos tilacóides pela redução do peróxido de hidrogênio pela SOD e pelo ascorbato. O radical hidroxila é a ERO que tem uma meia-vida mais curta, mas também tem um potencial de oxidação muito forte para reagir com praticamente todas as moléculas biológicas. Além disso, não há nenhuma reação enzimática conhecida para remover o altamente reativo radical hidroxila e sua acumulação inevitavelmente levará a reações adversas que danificam as membranas tilacoidais e o aparelho fotossintético, o que causa o estresse oxidativo (CRUZ DE CARVALHO, 2008; SHARMA *et al.*, 2012).

#### **2.2.4 Respostas das plantas à seca**

A adaptação das plantas à seca é um processo complexo que envolve muito mais mudanças do que apenas um crescimento atenuado. Trata-se, no âmbito celular, da regulação da expressão gênica, de aumentos transitórios da concentração de ABA, do acúmulo de solutos compatíveis e proteínas protetoras, do aumento dos níveis de antioxidantes e da remoção de canais de consumo de energia. Todas essas modificações são essenciais para restabelecer a homeostase após o desequilíbrio causado pelo estresse (CONDE *et al.*, 2011) (Figura 6).

##### **2.2.4.1 Estratégias de adaptação**

As plantas respondem à deficiência hídrica e se adaptam às condições semi-áridas por alterações fisiológicas, bioquímicas, anatômicas e morfológicas, incluindo transições na expressão gênica. As plantas também se adaptam a diferentes tipos de estratégias de vida para enfrentar e resistir à seca. Duas dessas estratégias são a prevenção e a tolerância à seca. A prevenção da seca é a capacidade da planta em manter o potencial hídrico alto nos tecidos em condições de seca, enquanto que a tolerância à seca é a capacidade de uma planta em manter as suas funções normais mesmo com baixo potencial de água nos tecidos. A prevenção é geralmente obtida por alterações morfológicas na planta, como a redução da condutância estomática, a redução da superfície foliar, o amplo desenvolvimento do sistema radicular e aumento das relações raiz/parte aérea. Por outro lado, a tolerância é conseguida através de mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares específicos das células e dos tecidos, incluindo a

expressão de genes específicos e a acumulação de proteínas específicas sob seca (LEVITT, 1980; REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004).

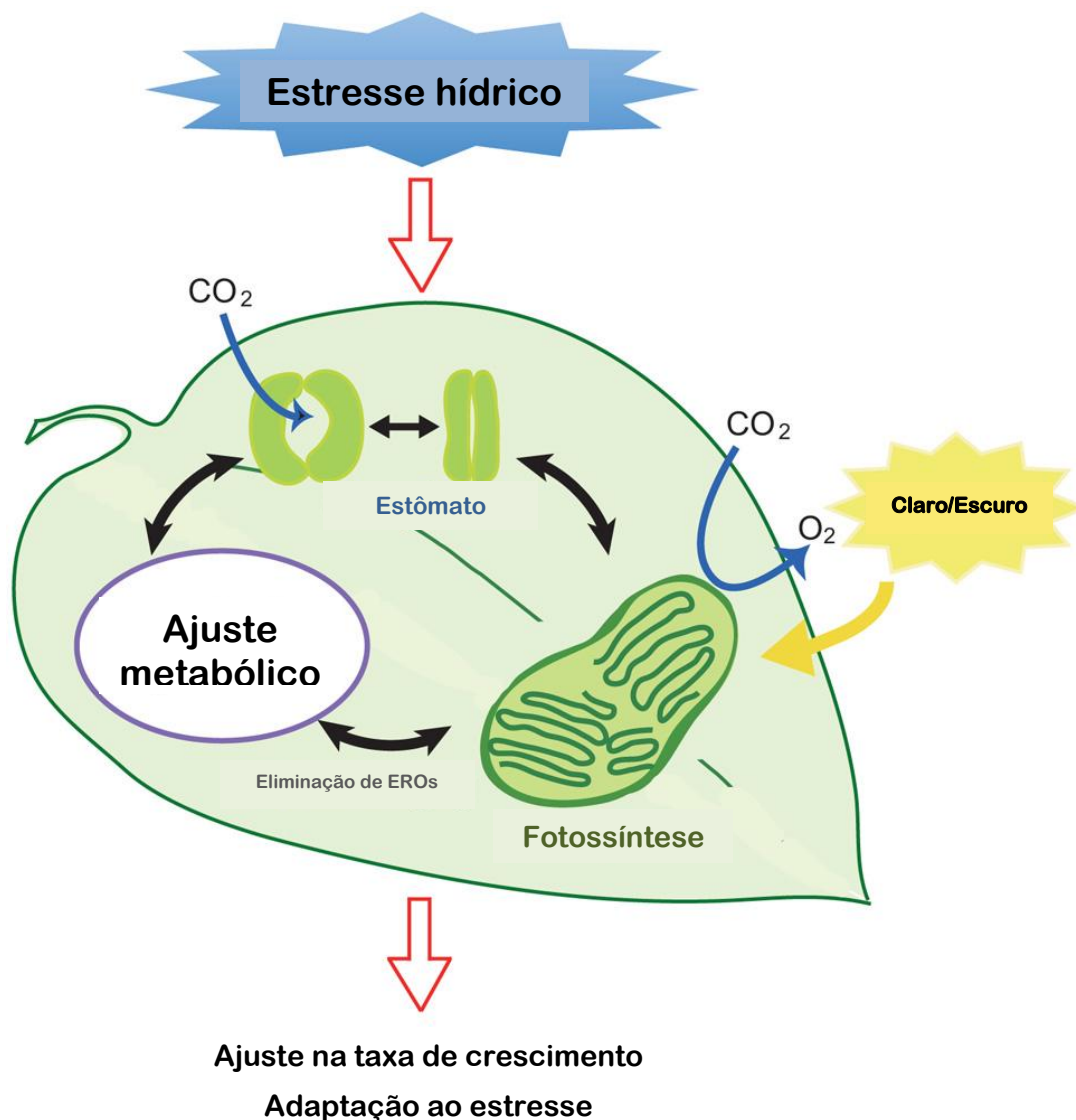
#### 2.2.4.2 Respostas celulares

Para lutar contra o perigo representado pelas EROs, as plantas possuem diferentes enzimas de detoxificação (peroxidases, superóxido dismutase, catalases) e metabólitos (carotenóides, ascorbato,  $\alpha$ -tocoferol, glutationa, flavonóides) (CRUZ DE CARVALHO, 2008; SHARMA *et al.*, 2012). No entanto, a eliminação de EROs ocorre especialmente em função do compartimento celular, do estágio fisiológico e das espécies vegetais. A capacidade de uma espécie de planta em manter ou restabelecer a homeostase redox pode torná-la tolerante ao estresse. Assim, as mudanças comparativas nas atividades das enzimas antioxidantes em resposta ao estresse hídrico foram muitas vezes utilizadas para a seleção de plantas resistentes à seca (KAR, 2011). O aumento da atividade ou da expressão gênica de enzimas do sistema de defesa antioxidante foi relatado durante a seca em muitas espécies de plantas (CONTOUR-ANSEL *et al.*, 2006; D'ARCY-LAMETA *et al.*, 2006; SHARMA; DUBEY, 2005). O estudo comparativo das respostas antioxidantes em genótipos tolerantes e sensíveis à seca revelou alta capacidade antioxidante nos genótipos tolerantes, com as atividades APX e CAT aumentadas, maior teor de ascorbato e baixo teor de  $H_2O_2$  e de MDA (SAIRAM; DESHMUKH; SAXENA, 1998). Além disso, as plantas transgênicas superexpressando as enzimas antioxidantes adquiriram uma maior tolerância à seca, bem como ao estresse oxidativo, que as respectivas plantas selvagens (CRUZ DE CARVALHO, 2008).

Além da defesa antioxidante, as plantas tendem a lidar com o estresse hídrico pelo processo conhecido como ajuste osmótico. Neste processo, as plantas reduzem o seu potencial osmótico celular pela acumulação de solutos. Certos processos metabólicos são acionados em resposta ao estresse, o que aumenta a concentração líquida de soluto na célula, permitindo assim a circulação de água na folha, resultando em aumento da sua turgescência. Um grande número de compostos são sintetizados, os quais desempenham um papel fundamental na manutenção do equilíbrio osmótico e na proteção das membranas e das macromoléculas. Esses compostos incluem prolina, glutamato, glicina betaína, carnitina, manitol, sorbitol, frutanos, polióis, trealose,

sacarose, oligossacarídeos e íons inorgânicos, tais como  $K^+$ . Tais compostos ajudam a manter as células em seu estado hidratado e, por conseguinte, eles funcionam para proporcionar resistência contra a seca e a desidratação celular (MAHAJAN; TUTEJA, 2005).

Figura 6 - Ilustração da resposta das plantas à seca.



A resposta estomática, a eliminação de EROs, as alterações metabólicas e a fotossíntese são afetadas quando as plantas são submetidas a estresse hídrico. Essas respostas coletivas levam a um ajuste na taxa de crescimento das plantas como uma resposta adaptativa para a sobrevivência.

Fonte: Osakabe *et al.* (2014).

## **2.3 Os estresses combinados**

### ***2.3.1 Características***

Há poucos estudos sobre as reações das plantas aos estresses ambientais aplicados em combinação. Tal pesquisa é particularmente importante visto que, na natureza, os estresses abióticos simultâneos são comuns (AHUJA *et al.*, 2010). A aclimação das plantas à combinação de diferentes estresses abióticos exigiria resposta apropriada adaptada a cada uma das condições de estresse individuais envolvidas, e projetada para a necessidade de compensar ou ajustar alguns aspectos antagonistas da combinação de estresse. Portanto, é lógico supor que a exposição simultânea de uma planta a condições de estresse abiótico irá resultar na coativação de diferentes vias de resposta ao estresse, que podem ter um efeito sinérgico ou antagonista sobre a outra (MITTLER, 2006).

### ***2.3.2 Incidência do ozônio e da seca em escala mundial***

A ocorrência de altas concentrações de ozônio durante os episódios de seca é frequente, visto que eles são em parte causados pelos mesmos fenômenos meteorológicos, ou seja, períodos de dias longos com alta incidência solar e baixa cobertura de nuvens (BOHLER *et al.*, 2013). A mudança nas condições climáticas devido a causas essencialmente antrópicas, como o aumento das emissões de CO<sub>2</sub>, resulta em elevação da temperatura. O aumento da temperatura, em seguida, contribui para a formação do ozônio troposférico e para a intensificação dos episódios de seca devido a precipitações alteradas (KISSOUDIS *et al.*, 2014; MATYSSEK *et al.*, 2005). Não apenas as regiões áridas estão sujeitas à seca, porém cada vez mais os períodos secos são relatados em regiões temperadas, como a Europa Ocidental e Central. Eles também deverão tornar-se mais frequentes e graves, principalmente devido à mudança climática (KREUZWIESER; GESSLER, 2010). Nas áreas rurais, os níveis elevados de ozônio podem ocorrer na primavera/início do verão, antes do início da seca. A natureza do efeito desses estresses sobre as plantas parece depender do genótipo e da especificidade dos regimes fatoriais

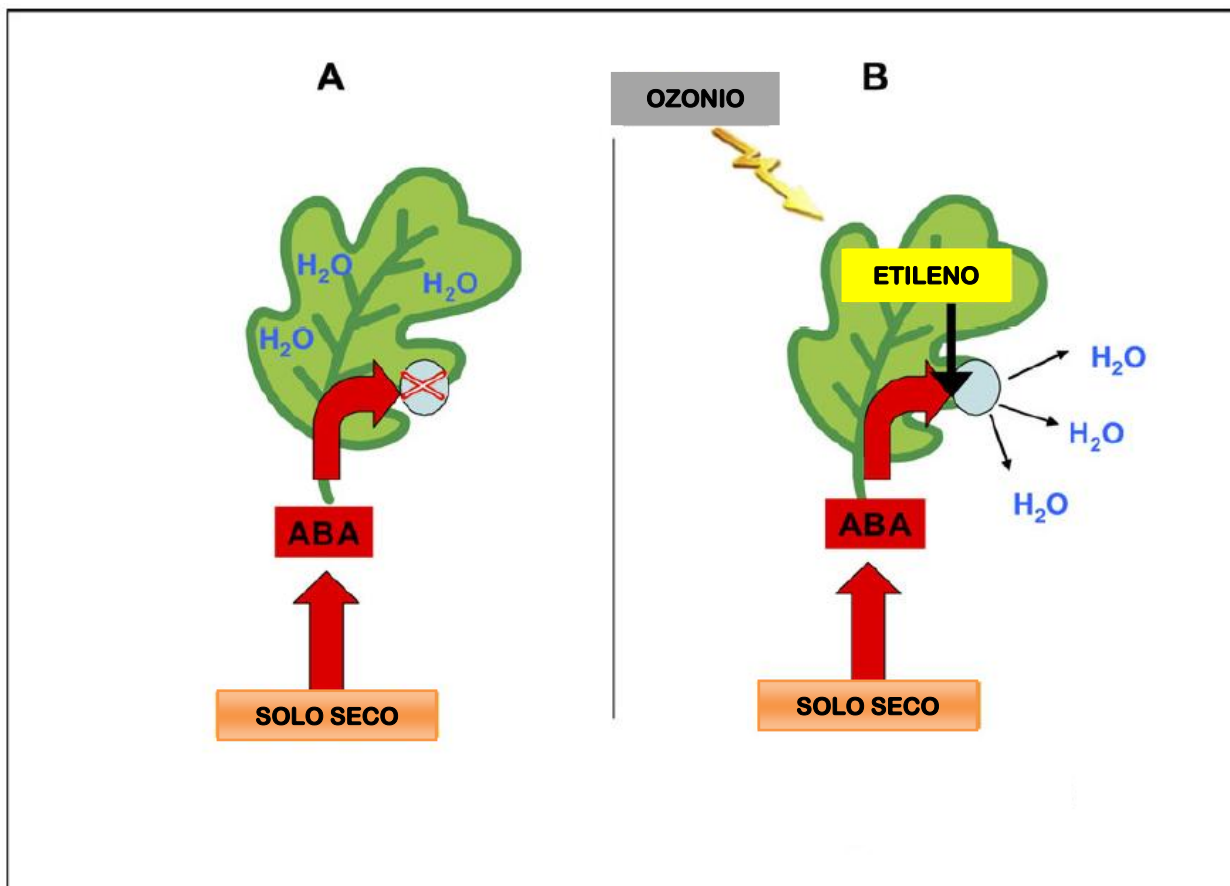
e, ao longo das estações do ano, das épocas de ocorrência, da duração e da intensidade dos dois estresses em relação ao outro (MATYSSEK *et al.*, 2005).

### ***2.3.3 Interação do ozônio e da seca combinados em escala celular***

Tem sido sugerido que a seca poderia proteger as plantas contra os danos induzidos pelo ozônio, causando o fechamento estomático e impedindo assim a entrada de ozônio nas folhas (KARLSSON *et al.*, 1995; KHAN; SOJA, 2003; PAAKKONEN *et al.*, 1998 ; PEARSON; MANSFIELD, 1993; REICHENAUER *et al.*, 1998). No entanto, a descoberta das reduções da sensibilidade dos estômatos ao ácido abscísico sob ozônio dependente de etileno indica que a condutância estomática ao déficit hídrico do solo é maior sob alta concentração de ozônio, e as plantas continuam a perder água, apesar do potencial de desidratação e do aumento do fluxo de ozônio (WILKINSON; DAVIES, 2009, 2010) (Figura 7). Estudos mostraram que o ozônio causou uma "lentidão" estomática, que levou ao fechamento incompleto dos estômatos, exacerbando os efeitos da seca (WAGG *et al.*, 2012; WILKINSON; DAVIES, 2009). Essas observações remeteram em questão a idéia generalizada de que o ozônio sempre induz o fechamento dos estômatos (WITTIG; AINSWORTH; LONG, 2007) e têm implicações importantes para o uso da água nos sistemas naturais e agrícolas (WILKINSON; DAVIES, 2010).

A interação entre o ozônio e a seca é muito dependente da gravidade e da duração do aparecimento dos dois fatores de estresse (MATYSSEK *et al.*, 2005), mas, em geral, o estresse combinado revelou-se pior do que os seus componentes individuais (PÄÄKKÖNEN *et al.*, 1998). Seus impactos fisiológicos nas plantas são complexos e merecem atenção, uma vez que as concentrações de ozônio na troposfera vão continuar a aumentar no futuro (AINSWORTH; ROGERS; LEAKEY, 2008; ASHMORE 2005).

Figura 7 - Modelo dos efeitos da produção de etileno induzida por ozônio no fechamento dos estômatos induzido por ABA.



A: Sob estresses, como a secagem do solo, o ABA é superregulado e fecha os estômatos para que as folhas retenham a água. B: No entanto, em certos genótipos suscetíveis, o etileno induzido pelo ozônio provoca células-guarda estomáticas a perderem sua sensibilidade ao ABA de forma que os poros dos estômatos permanecem abertos por mais tempo. As plantas absorvem mais ozônio e perdem mais água do que teriam feito na ausência de ozônio. Fonte: Wilkinson *et al.* (2012).

## 2.4 Os lipídios de membrana

### 2.4.1 Generalidades sobre os lipídios

Os lipídios desempenham três funções gerais. Em primeiro lugar, devido ao seu estado relativamente baixo, os lipídios são usados para o armazenamento de energia, principalmente na forma de ésteres de triacilglicerol e de ésteres de esteróide, em gotículas lipídicas. Estes basicamente funcionam como reservatórios anidros para o armazenamento eficaz de reservas calóricas e como esconderijos de ácidos graxos e de esteróis que são necessários para a biogênese da membrana. Por outro lado, a matriz das membranas celulares é formada por lipídios polares, que são compostos por uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A propensão dos grupamentos hidrofóbicos para se auto-associar (entropicamente dirigida pela água) e a tendência de porções hidrofílicas em interagir com os meios aquosos e umas com as outras são a base física da formação espontânea das membranas. Esse princípio básico dos lipídios anfipáticos é uma propriedade química que permitiu as primeiras células separar os seus componentes internos do ambiente externo. Esse mesmo princípio é utilizado no interior da célula para produzir organelas discretas. Essa compartimentação permite a separação de reações químicas específicas com a finalidade de melhorar a eficiência bioquímica e a difusão limitada de produtos de reação. Além da função de barreira, os lipídios fornecem membranas com potencial de brotamento, de tubulação, de fissão e de fusão, características que são essenciais para a divisão celular, a reprodução biológica e o tráfico membranar intracelular. Os lipídios também permitem proteínas específicas de membrana se agregarem e outras se dispersarem. Finalmente, os lipídios podem atuar como primeiros e segundos mensageiros na transdução do sinal e nos processos de reconhecimento molecular. A degradação dos lipídios polares anfipáticos permite fenômenos bipartidos de sinalização, que podem ser transmitidos dentro de uma membrana por partes hidrofóbicas da molécula e ainda propagados através do citosol por componentes solúveis da molécula. Além disso, alguns lipídios são usados para definir os domínios de membrana, que recrutam proteínas citosólicas que em seguida organizam a sinalização secundária ou os complexos efetores (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008).

## 2.4.2 Os lipídios de membrana dos vegetais

### 2.4.2.1 Glicerolipídios: fosfolipídios e glicolipídios

Os lipídios constituintes das membranas celulares são os glicerolipídios. Eles contêm nas suas moléculas um esqueleto de glicerol, resíduos de ácidos graxos e um grupamento polar, de onde vem sua designação de lípidos polares. A maior parte dos ácidos graxos vegetais tem um comprimento de cadeia de 16 a 18 átomos de carbono e contém entre uma a três ligações duplas na posição *cis*. Cinco ácidos graxos, os ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1), linoléico (18:2) e linolênico (18:3) e, em algumas espécies, o ácido hexadeca-trienóico (16:3), representam mais de 90% das cadeias de acila dos glicerolipídios de quase todas as membranas vegetais. Em folhas, os ácidos graxos mais abundantes são na ordem: ácido linolênico, ácido linoléico e ácido palmítico (HARWOOD, 1996).

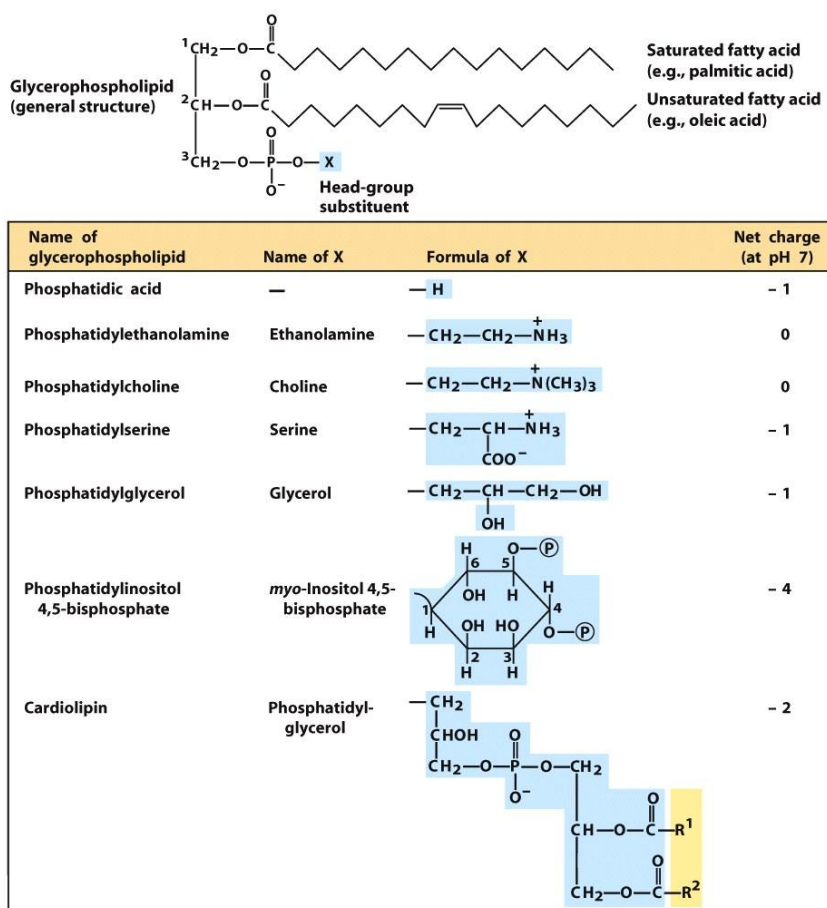
Os glicerolipídios das membranas celulares pertencem a dois grupos, segundo a natureza de sua cabeça polar: os fosfolipídios e os glicolipídios. Nos fosfolipídios (ou glicerofosfolipídios, mais especificamente), o grupamento polar compreende uma molécula de ácido fosfórico e um radical X, que pode ser colina [trata-se então da fosfatidilcolina (PC)], etanolamina [fosfatidiletanolamina (PE)], inositol [fosfatidilinositol (PI)], serina [fosfatidilserina (PS)] ou uma ou duas moléculas de glicerol [fosfatidilglicerol (PG) e difosfatidilglicerol (DPG ou cardiolipina), respectivamente] (Figura 8). Se o grupo polar compreende um açúcar, trata-se dos glicolipídios (ou galactolipídios, mais especificamente), dos quais os mais abundantes são o monogalactosil-diacilglicerol (MGDG) e o digalactosil-diacilglicerol (DGDG). Em tecidos vegetais, há também um sulfolipídio, o sulfoquinovosil-diacilglicerol (SQDG) (Figura 9) (DORMANN; BENNING, 2002).

Os principais lipídios em eucariotos são os fosfolipídios, com PC sendo o mais abundante, seguido de PE, PS, PI e PA (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008). PG também está presente em eucariotos e é utilizado como um precursor para a síntese de DPG (ou cardiolipina), que é encontrado exclusivamente na membrana interna das mitocôndrias (NOWICKI; MULLER; FRENTZEN, 2005).



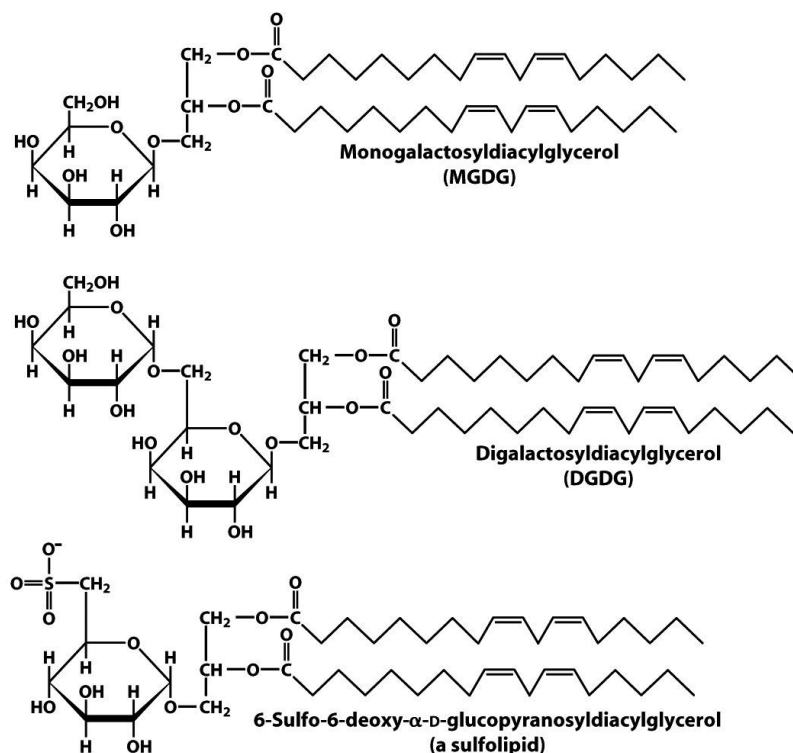
Os galactolipídios são a classe mais abundante de lipídios na biosfera por causa da sua elevada proporção (80%) nas membranas plastidiais (principalmente tilacóides). As membranas plastidiais (membranas dos envelopes externo e interno e os tilacóides) são caracterizadas por um baixo teor de fosfolipídios e uma elevada proporção de galactolipídios: a membrana do envelope externo é enriquecida em DGDG e PG, enquanto que o constituinte principal da membrana do envelope interno e dos tilacóides é o MGDG. O envelope interno e a membrana dos tilacóides não diferem significativamente: eles compreendem os dois galactolipídios (MGDG e DGDG), um sulfolipídio (SQDG) e PG como o único fosfolipídio nessas membranas (BLOCK *et al*, 2007).

Figura 8 - Estrutura dos glicerofosfolipídios.



Fonte: Nelson; Cox (2010).

Figura 9 - Estrutura dos galactolipídios e de um sulfolipídio.



Fonte: Nelson; Cox (2010).

### 2.4.3 Biossíntese dos lipídios membranares

#### 2.4.3.1 Vias procariótica e eucariótica

Nos vegetais, a biossíntese dos ácidos graxos ocorre nos plastídios. Uma vez sintetizadas, essas moléculas são, em grande parte, exportadas para o retículo endoplasmático (ER). Os glicerolipídios são sintetizados a partir do glicerol-3-fosfato sobre o qual dois ácidos graxos são esterificados. O ácido fosfatídico (PA), assim formado, serve como precursor para a neossíntese de todos os glicerofosfolipídios. Os fosfolipídios e os glicolipídios são gerados a partir do diacilglicerol (DAG) ou do CDP-diacilglicerol, derivado do PA. Os dados cinéticos *in vitro* de incorporação de acetato nos lipídios plastidiais mostram que os plastídios isolados podem sintetizar glicolipídios contendo um esqueleto DAG C18/C16, mas são incapazes de sintetizar PA e DAG contendo apenas C18. Assim, existem duas vias de síntese do PA, uma nos plastídios e

outra no retículo endoplasmático. Após os locais de síntese do PA, a distribuição dos ácidos graxos é diferente. Foram definidos dois grandes grupos estruturais de lipídios. O primeiro possui em posição *sn-2* apenas ácidos graxos C16, com a posição *sn-1* do glicerol podendo ser esterificada com ácidos graxos C18 ou C16. Ele é dito de estrutura "procariota" por analogia com a composição de ácidos graxos dos glicerolipídios das cianobactérias. O PA sintetizado pela via procariótica ou é utilizado na síntese de PG ou é convertido em DAG pelas PA-fosfatases. Esse *pool* de DAG procariótico é usado como precursor para a síntese de MGDG, DGDG e SQDG em plantas 16:3. O segundo grupo possui ácidos graxos C18 na posição *sn-2* e é dito de estrutura "eucariota", já que esta estrutura é típica dos glicerolipídios extraplastidiais eucariotos. Esse PA é utilizado na síntese de fosfolipídios, tais como PC, PE e PI, que são característicos de várias membranas extracloroplastidiais. Uma grande proporção dos PC sintetizados no ER retornam para os cloroplastos, onde são utilizados como precursores da síntese dos lipídios plastidiais (LIBEISSON *et al.*, 2013; OHLROGGE; BROWSE, 1995).

#### 2.4.3.2 As dessaturases de ácidos graxos (FADs)

As dessaturases de ácidos graxos são enzimas que convertem uma ligação simples entre dois átomos de carbono (C-C) em uma ligação dupla (C=C) numa cadeia de acil graxo. A ligação dupla resultante é muitas vezes chamada de ligação insaturada, e as reações catalisadas por essas enzimas são conhecidas como reações de dessaturação. Essas reações requerem oxigênio molecular e ocorrem sob condições aeróbias. A insaturação dos ácidos graxos dos glicerolipídios é essencial para o bom funcionamento das membranas biológicas. A temperaturas fisiológicas, os glicerolipídios polares que contêm ácidos graxos saturados não podem formar a bicamada, que é a estrutura de base das membranas biológicas. A introdução de um número apropriado de ligações insaturadas nos ácidos graxos dos glicerolipídios da membrana diminui a temperatura de transição a partir do gel (sólido) para a fase líquida-cristalina e fornece membranas com a fluidez necessária. A fluidez das membranas é, por sua vez, importante na ativação de certas enzimas ligadas a ela (LOS; MURATA, 1998).

Os ácidos graxos insaturados são sintetizados pela inserção sequencial de ligações duplas nos derivados de ácidos palmítico e esteárico. O primeiro desses eventos de dessaturação

ocorre nos plastos e cloroplastos pela esteroil-ACP dessaturase solúvel. Depois disso, para sintetizar os ácidos graxos 16:2/18:2 e 16:3/18:3, que são essenciais para as membranas de plantas, uma segunda e uma terceira ligação dupla são introduzidas por  $\Delta 12$  e  $\omega$ -3 dessaturases membranares, respectivamente. Essas dessaturases podem ser encontradas tanto no plastídio/cloroplasto (chamada "via procariótica") quanto no retículo endoplasmático ("via eucariótica"). A primeira dessas vias é utilizada principalmente nos tecidos fotossinteticamente ativos, enquanto que a via microsomal predomina nos tecidos não-verdes e nas sementes em desenvolvimento (VENEGAS-CALERÓN *et al.*, 2006).

Em *Arabidopsis thaliana*, três dessaturases distintas, ativas na última etapa de conversão do ácido linoléico (18:2) para o ácido linolênico (18:3) foram identificadas: FAD3, FAD7 e FAD8. Cada uma dessas enzimas são codificadas por um único gene cuja expressão é regulada diferencialmente (MEKHEDOV; ILARDUYA; OHLROGGE, 2000). Enquanto que FAD3 codifica uma isoenzima localizada no retículo endoplasmático (enzima microsomal), FAD7 e FAD8 codificam as  $\omega$ -3 dessaturases plastidiais (MCCARTNEY *et al.*, 2004).

#### 2.4.3.3 Biossíntese da fosfatidilcolina (PC)

O PC pode ser sintetizado por duas vias diferentes, seja por metilação do PE, pela PE-N-metiltransferase (colina quinase), seja pela adição de CDP-colina ao DAG (KINNEY, 1993).

A clonagem dos genes da colina quinase em soja revelou a existência de múltiplas isoformas solúveis, todas específicas da colina, mas podendo ser inibidas em diferentes graus pela etanolamina, metiletanolamina e dimetiletanolamina (MONKS *et al.*, 1996). O *pool* de colina livre estando no entanto limitada nas células, as colinas quinases intervêm principalmente na regulação da síntese do PC em caso de estresse, por exemplo de estresse osmótico, a via majoritária sendo a de metilação da fosfoetanolamina (TASSEVA *et al.*, 2004). As três metilações sucessivas da fosfoetanolamina para produzir a fosfocolina são catalisadas por uma única enzima solúvel, uma fosfoetanolamina N-metiltransferase S-adenosilmetionina dependente. Essa enzima catalisa as três metilações a partir da fosfoetanolamina, além das duas metilações a partir da fosfatidilmetiletanolamina (BOLOGNESE; MCGRAW, 2000; NUCCIO *et al.*, 2000). A

fosfocolina é então convertida em CDP-colina por uma CTP:fosfocolina citidililtransferase. A caracterização dessa enzima purificada mostrou que ela poderia fixar o CTP na fosfocolina, mas também na fosfometiletanolamina e na fosfodimetiletanolamina (WANG; MOORE, 1990). Duas isoformas foram identificadas em *Arabidopsis* e quatro em *Brassica napus* (INATSUGI *et al.*, 2002). Por fim, a CDP-colina é transferida para um DAG por uma aminoalcoolfosfotransferase (KINNEY, 1993).

#### 2.4.3.4 *Biossíntese do fosfatidilglicerol (PG)*

Nas plantas, a biossíntese do PG ocorre nas membranas do envelope interno dos plastos, no retículo endoplasmático e nas membranas internas das mitocôndrias. O PG é sintetizado a partir da citosina-5'-difosfato (CDP)-diacilglicerol e do glicerol-3-fosfato, envolvendo a ação de uma PG-fosfato sintase ligada à membrana e uma PG-fosfato fosfatase, em procariotos e eucariotos. Nas plantas em C18 tal como nas plantas em C16, o PG plastidial tem a mesma estrutura do tipo procarioto que aquela do PA sintetizado no envelope (FRENTZEN, 2004).

Em *Arabidopsis*, dois genes foram caracterizados codificando para as PG-fosfato sintases: *PGP1* e *PGP2*. *PGP2* codifica a isoenzima dos microsomos, enquanto que *PGP1* codifica uma pré-proteína que tem como alvo tanto os plastos quanto as mitocôndrias (FRENTZEN, 2004; MÜLLER; FRENTZEN, 2001).

#### 2.4.3.5 *Biossíntese do difosfatidilglicerol (DPG ou Cardiolipina)*

Em eucariotos, a biossíntese de DPG (ou cardiolipina) ocorre exclusivamente na membrana mitocondrial interna por três reações sequenciais. A primeira etapa, limitante da velocidade da reação, é catalisada pela fosfatidil-glicerolfosfato (PGP) sintase, que transfere um grupo fosfatidil da citidina-difosfato diacilglicerol (CDP-DAG) ao glicerol-3-fosfato, o que produz PGP, que é rapidamente desfosforilado pela PGP fosfatase a fosfatidilglicerol (PG). Finalmente, a cardiolipina sintase (CLS) transfere um grupo fosfatidil do CDP-DAG ao PG, o que produz o DPG (NOWICKI; MULLER; FRENTZEN, 2005).

A CLS preferencialmente utiliza o CDP-dioleoilglicerol (C18/C18) e o PG C18/C18 em relação ao CDP-dipalmitoilglicerol (C16/C16) e ao PG C16/C18. Assim, o DPG possui um esqueleto DAG rico em C18 (FRENTZEN; GRIEBAU, 1994).

Em *Arabidopsis*, o gene *CLS*, que codifica para a enzima responsável por essa atividade, foi identificada no locus At4g04870 (KATAYAMA *et al.*, 2004; NOWICKI; MULLER; FRENTZEN, 2005). Ele foi anteriormente referido como *PGP3*, mas não tem atividade de fosfatidilglicerol sintase. O endereçamento dessa enzima é mitocondrial, segundo estudos *in silico* e *in vivo* (BEISSON *et al.*, 2003; KATAYAMA *et al.*, 2004).

#### 2.4.3.6 Biossíntese da fosfatidiletanolamina (PE)

As plantas sintetizam o PE após uma etapa de descarboxilação que pode ser efetuada quer no PS quer na serina (MUDD; DATKO, 1989). A descarboxilação da serina é a via principal, catalisada por uma enzima solúvel, a serina descarboxilase, específica das plantas. A etanolamina livre sintetizada é então fosforilada por uma etanolamina quinase. A fosfoetanolamina é em seguida transformada em CDP-etanolamina por uma CTP: fosfoetanolamina citidililtransferase. A última atividade envolvida na síntese do PE é a CDP-etanolamina:DAG-etanolamina fosfotransferase catalisada por uma aminoalcoolfosfotransferase (RONTEIN *et al.*, 2003a.).

Duas isoformas foram identificadas em couve chinesa e em soja; elas sintetizam tanto o PE quanto o PC a partir de DAG e de CDP-etanolamina, CDP-metiletanolamina, CDP-dimetiletanolamina ou CDP-colina (CHOI *et al.*, 2000;. DEWEY *et al.*, 1994).

#### 2.4.3.7 Biossíntese da fosfatidilserina (PS)

Nas plantas, o esquema de síntese do PS ainda não está claro. O PS seria sintetizado a partir de duas vias diferentes: uma reação de permuta de cabeças polares e uma reação que envolve o CDP-DAG (MOORE, 1982).

Delhaize *et al.* (1999) mostraram a presença de uma PS-sintase catalisando a adição de uma serina em CDP-DAG, clonando o gene correspondente no trigo e detectando a atividade

de síntese de PS nas plantas transgênicas. O destino do PS como precursor do PE e do PC ainda não foi claramente definido nas plantas, embora uma atividade PS descarboxilase já tenha sido caracterizada nas membranas mitocondriais e que seu gene tenha sido clonado em *Arabidopsis* e *Lycopersicon esculentum* (RONTEIN *et al.*, 2003b).

#### 2.4.3.8 Biossíntese do fosfatidilinositol (PI)

A PI sintase cataliza a reação entre um inositol livre e CDP-DAG. Essa atividade foi medida nas frações do retículo de folhas de espinafre e requer cátions divalentes ( $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ ) para sua atividade (MOORE, 1982).

Os fosfoinositídeos são um grupo importante e de estrutura complexa. O PI representa 93% dos fosfoinositídeos enquanto que o PIP (principalmente o PI-3P e o PI-4P) e o PIP2 (PI-(4,5) P2) é inferior a 1%. O PI-3P é formado a partir de uma PI 3-quinase, cujo gene foi clonado em soja e *Arabidopsis*, mas a compartimentação celular da enzima é ainda desconhecida. O PI-4P é sintetizado utilizando PI-4-quinases, cujas 12 isoformas foram identificadas em *Arabidopsis* por similaridade de sequência. Finalmente, o PIP2 é formado a partir de PI-4P por uma atividade PI-4P 5-quinase, para a qual 9 isoformas foram previstas, mas apenas uma caracterizada funcionalmente em *Arabidopsis* (KINNEY, 1993).

#### 2.4.3.9 Biossíntese do monogalactosildiacilglicerol (MGDG)

A síntese do MGDG ocorre em uma única etapa por uma 1,2-DAG 3- $\beta$ -galactosiltransferase (ou MGDG sintase), que transfere um resíduo galactosil do UDP-Gal para o DAG através de uma ligação glicosídica  $\beta 1 \rightarrow 3$  (MIÈGE *et al.* 1999).

Marshall *et al.* (1994a) mostraram que a atividade da MGDG sintase foi capaz de utilizar diferentes espécies de DAG com diferentes afinidades. No entanto, o DAG procarioto 18:1/16:0 sintetizado nos cloroplastos é utilizado com maior especificidade que o 16:0/18:1, sendo o maior grau de afinidade para o 18:2/18:2 (MARSHAL *et al.*, 1994b).

A partir das análises de sequências, as enzimas MGDG sintases têm sido classificadas em duas famílias: do tipo A com MGD1 e do tipo B com MGD2 e MGD3 em *Arabidopsis*. As

duas famílias diferem (1) pela presença de um peptídio de trânsito clivável para o tipo A e sua ausência para o tipo B, (2) pela localização na membrana interna do envelope para o tipo A, enquanto que o tipo B está provavelmente associado à membrana externa (3), por uma expressão elevada para o tipo A em condições-padrão de cultura e nos tecidos verdes e (4) por uma expressão ativada para as enzimas do tipo B em carência de fosfato (AWAI *et al.*, 2001).

Em um mutante de *Arabidopsis* contendo uma inserção no gene *mgd1*, a atividade da MGDG sintase é reduzida em 75%, salientando que MGD1 é a principal MGDG sintase das folhas (JARVIS *et al.*, 2000). A localização de MGD1 na membrana interna do envelope foi confirmada nas células de folhas de *Arabidopsis*. Em revanche, MGD2 e MGD3, as enzimas do tipo B, estão provavelmente localizadas na membrana externa. O papel das MGDG sintases do tipo B é menos evidente. Essas enzimas têm melhor afinidade pelo DAG eucarioto (18:2/18:2) em relação ao procarioto (18:1/16:0) (AWAI *et al.*, 2001). Além disso, essas enzimas são precocemente e fortemente induzidas durante a deficiência de fosfato e são provavelmente envolvidas no fornecimento de MGDG para a síntese de DGDG (AWAI *et al.*, 2001; KOBAYASHI *et al.*, 2004; SHIMOJIMA *et al.*, 2013).

#### 2.4.3.10 Biossíntese do digalactosildiacilglicerol (DGDG)

A biossíntese do DGDG é realizada pela DGDG sintase, que adiciona um segundo resíduo de galactosil do UDP-Gal para uma molécula de MGDG através de uma ligação glicosídica  $\alpha 1 \rightarrow 6$  (KELLY *et al.*, 2003; KELLY; DORMANN, 2002).

A caracterização do mutante *dgd1* de *Arabidopsis*, severamente afetado na síntese do DGDG, permitiu a identificação do primeiro gene da DGDG sintase (DÖRMANN *et al.*, 1995). Esse mutante é alterado na fotossíntese (DÖRMANN *et al.*, 1995; HÄRTEL *et al.*, 1997) e na importação das proteínas nos cloroplastos (CHEN; LI, 1998). Por semelhança com *dgd1*, um segundo gene (*dgd2*) foi identificado no genoma de *Arabidopsis* (DÖRMANN *et al.*, 1999). O gene *dgd2* não é essencial para a síntese do DGDG em condições-padrão de cultura. A análise dos mutantes nulos *dgd1* e *dgd2* indicam que *in vivo* DGD1 age preferencialmente no MGDG C18/C18 enquanto que DGD2 parece ter uma afinidade pelo MGDG com C16 em posição *sn-1* e C18 em posição *sn-2* (KELLY *et al.*, 2003). Experimentos de importação *in vitro* e análises



bioquímicas mostraram que as duas enzimas estavam localizadas nos plastos, presumivelmente na membrana externa do envelope (FROEHLICH *et al.*, 2001; KELLY *et al.*, 2003).

#### **2.4.4 Degradação dos lipídios de membrana**

##### **2.4.4.1 Fosfolipase D**

As fosfolipases são classificadas em três grandes categorias de acordo com a especificidade da posição da hidrólise da molécula de fosfolipídio. As fosfolipases D (PLD) e C (PLC) agem na cabeça polar dos fosfolipídios, enquanto que as fosfolipases A1 (PLA1) e A2 (PLA2) removem os ácidos graxos das posições *sn-1* e *sn-2*, respectivamente (MATOS; PHAM-THI, 2009).

A fosfolipase D é a principal família de enzimas que hidrolisam os fosfolipídios para produzir o lipídio de sinalização ácido fosfatídico (WANG *et al.*, 2006). O genoma de *Arabidopsis* contém 12 genes PLD que foram agrupados: *PLDα* (1,2,3), *PLDβ* (1,2), *PLDγ* (1,2,3), *PLDδ*, *PLDε* e *PLDζ* (1,2) (QIN; WANG, 2002; WANG *et al.*, 2006). Os diferentes grupos de PLD têm diferentes exigências para os efetores de atividade, tais como  $\text{Ca}^{2+}$ , ácido graxo livre e fosfoinositídeos. As PLD também diferem na preferência do substrato (HONG *et al.*, 2010). Essas diferenças bioquímicas, com os seus padrões distintos na expressão e na localização subcelular, podem proporcionar uma base para as funções distintas para diferentes PLD na resposta das plantas à seca (EL-MAAROUF *et al.*, 1999; SANG *et al.*, 2001), à salinidade (HONG *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2010), à privação de nitrogênio (HONG *et al.*, 2009) e à deficiência de fósforo (LI *et al.*, 2006). As *PLDα1* e *PLDδ* desempenham um papel na mediação da resposta da planta ao ABA e promovem o fechamento estomático, mas elas ocupam diferentes etapas na via de sinalização (GUO *et al.*, 2012). A *PLDδ* está envolvida na resposta a EROs (ZHANG *et al.*, 2003), enquanto que *PLDα1* favorece a produção de EROs (ZHANG *et al.*, 2009).

#### 2.4.4.2 Lipídio acil-hidrolase tipo patatina

Considerando a composição lipídica particular de folhas de plantas, não é surpreendente que, além das fosfolipases, as plantas possuam uma variedade de enzimas lipolíticas capazes de hidrolisar galactolipídios. As enzimas desse tipo foram purificadas a partir de tecidos de plantas e, além da sua atividade de galactolipase, elas foram encontradas frequentemente ser capazes de agir sobre os fosfolipídios, mas não sobre TAGs. Por conseguinte, elas foram designadas como lipídio acil-hidrolases (LAHs), para indicar que essas enzimas poderiam retirar os dois grupamentos acila a partir de diferentes tipos de lipídios de membrana. A patatina de tubérculos de batata tem sido amplamente estudada. Ele exibe atividades fosfolipase e galactolipase, mas é incapaz de desacilar TAGs. As patatinas de *Arabidopsis* incluem uma família de nove genes subdivididos em dois grupos. As proteínas provenientes do grupo I possuem o padrão GxSxG conservado, enquanto que no grupo II existem substituições de alguns desses aminoácidos (MATOS; PHAM-THI, 2009).

Matos *et al.* (2001) relataram a clonagem de um cDNA da patatina (*VuPAT1*) a partir de folhas de feijão-de-corda. Os transcritos desse gene foram acumulados nas folhas sob seca e a proteína *VuPAT1* teve uma atividade preferencial de galactolipase. Os dados sobre as proteínas do tipo patatina indicam que essas proteínas podem ter um papel importante no metabolismo dos lipídios de plantas. No entanto, ainda há muito trabalho a ser feito para esclarecer o papel exato de cada isoforma. No caso particular de *Arabidopsis thaliana*, os genes da patatina parecem ser expressos de forma diferente, dependendo do tecido vegetal e das proteínas que eles codificam para poder variar também nas especificidades de substrato. Demonstrou-se que três genes da patatina são induzidos pelo déficit de água e que *AtPAT IIA* possui atividade LAH direcionada aos galactolipídios e fosfolipídios. O perfil de expressão desse gene sugere um duplo papel para essa proteína: a degradação lipídica da membrana associada a um estresse severo e à senescência e, potencialmente, à sinalização dos lipídios (MATOS *et al.*, 2008). Além disso, resultados recentes mostraram que as enzimas relacionadas à patatina estão envolvidas em diferentes funções celulares, incluindo as respostas das plantas à auxina, aos agentes patogênicos, aos estresses abióticos e à mobilização dos lipídios durante a germinação das sementes. Essas

enzimas possuem atividade fosfolipase A relacionada à patatina e são chamadas pPLA (SCHERER *et al.*, 2010).

#### **2.4.5 Efeitos do ozônio sobre os lipídios de membrana**

A ação direta do ozônio sobre as células vegetais pode causar diferentes efeitos sobre os lipídios de membrana e seu metabolismo: diminuição dos teores de lipídios (CARLSSON *et al.*, 1994), inibição da biossíntese (MUDD *et al.*, 1971), estimulação da atividade lipolítica (HELLGREN; SELLDÉN; SANDELIUS, 2001), diminuição do teor de ácido linolênico (18:3) (CARLSSON; WALLIN; SANDELIUS, 1996) e peroxidação lipídica (CALATAYUD; BARRENO, 2004).

Em relação às variações do teor e da composição lipídica, tem sido relatado que o ozônio aumentou o teor de fosfolipídios em *Pharbitis nil* e diminuiu em *Phaseolus vulgaris* na fase inicial da exposição ao ozônio, ao mesmo tempo que não alterou a quantidade de glicolipídios, dos ácidos graxos insaturados e de MDA em ambas as plantas. Os autores concluíram que o ozônio não deve oxidar diretamente os ácidos graxos insaturados na fase inicial de exposição, mas pode modificar o metabolismo dos lipídios polares, principalmente dos fosfolipídios (NOUCHI; TOYAMA, 1988). Alguns anos mais tarde, estudos sobre o mecanismo de danos causados pelo ozônio demonstraram que um dos primeiros eventos foi a estimulação da atividade de galactolipase endógena nas folhas e que os ácidos graxos liberados do MGDG pela galactolipase levaram a mudanças drásticas nos lipídios, isto é, uma grande redução de MGDG e uma acumulação de TAG (SAKAKI *et al.*, 1990; SAKAKI; KONDO; YAMADA, 1990).

No entanto, às vezes, o ozônio não causa efeitos sobre os parâmetros estudados. Por exemplo, Sakaki, Kato e Saji (2007) encontraram essencialmente as mesmas alterações lipídicas nas folhas dos cultivares de *Phaseolus vulgaris* expostos ao ozônio com diferentes níveis de LAH endógena. No entanto, os resultados não excluem a possibilidade de que a LAH examinada tenha um papel na resposta ao estresse, incluindo o ozônio. Como outro exemplo, os resultados de Wolfenden e Wellburn (1991) mostraram que as alterações significativas do grau de insaturação e da percentagem de ácido linolênico (18:3) não foram encontradas em resposta ao tratamento com ozônio nas árvores de *Picea abies* que foram expostas ao ozônio durante os verões de três anos

consecutivos e cuja composição em ácidos graxos do MGDG foi analisada durante os 14 últimos meses.

Quando ambos os galactolipídios são analisados em resposta ao ozônio, observa-se que uma perda considerável de moléculas formando monocamadas de galactolipídios foi encontrada em concentrações de ozônio (em meio aquoso) superiores a 0,1 ppm, com maior efeito medido para MGDG. Isso está de acordo com quantidades maiores de MDA encontradas nos extratos de filmes de MGDG oxidados em relação ao DGDG. Com base nisso, concluiu-se que um grupo de galactose mais presente nas moléculas de DGDG age de forma protetora sob condições oxidantes (RUDOLPHI-SKORSKA; FILEK; ZEMBALA, 2014).

Estratégias de compensação da composição lipídica das membranas celulares também podem ser encontradas. Hellgren, Sellén e Sandelius (2001) analisaram as composições em ácidos graxos de duas classes de fosfolipídios, PE e PC. As análises mostraram que o ozônio causou diminuição da relação de PC:PE nas membranas plasmáticas. Eles sugeriram que a proporção de PC em outras membranas aumenta para equilibrar a redução observada na membrana plasmática.

Por fim, sendo o ozônio uma molécula altamente reativa, danos nas membranas celulares são frequentemente encontrados. Calatayud e Barreno (2001) observaram um aumento da peroxidação lipídica causada pelo ozônio em tomate, o que contribuiu para a redução da biomassa total da planta. Esses mesmos resultados foram encontrados por estes autores em alface alguns anos mais tarde (CALATAYUD; BARRENO, 2004).

#### ***2.4.6 Efeitos da seca sobre os lipídios de membrana***

As pesquisas realizadas desde longo tempo permitem obter uma série de conclusões sobre os efeitos do estresse hídrico sobre os lipídios de membrana. Vários trabalhos têm se dedicado ao estudo do metabolismo lipídico em plantas de *Vigna unguiculata* submetidas à seca (CAMPOS; PHAM THI, 1997; EL-MAAROUF *et al.*, 1999, 2001; FRANÇA *et al.*, 2008; MATOS *et al.*, 2001; MONTEIRO DE PAULA *et al.*, 1990, 1993; SAHSAH *et al.*, 1998; TORRES-FRANKLIN *et al.*, 2007, 2009). Outros trabalhos sobre a mesma temática foram realizados em *Arabidopsis thaliana* (GIGON *et al.*, 2004; MATOS *et al.*, 2008), *Cocos nucifera*

(REPELLIN *et al.*, 1997), *Phaseolus vulgaris* (JÚNIOR *et al.*, 2008), *Arachis hypogaea* (LAURIANO *et al.*, 2000), *Gossypium hirsutum* (PHAM-THI *et al.*, 1985), *Olea europaea* (GUERFEL *et al.*, 2008), *Triticum durum* (QUARTACCI *et al.*, 1995) e *Avena sativa* (LARSSON; NYSTRÖM; LILJENBERG, 2006).

Análises de ácidos graxos nas folhas de plantas submetidas à seca apresentaram resultados divergentes, dependendo da espécie vegetal e da intensidade do estresse (MONTEIRO DE PAULA *et al.*, 1990; REPELLIN *et al.*, 1997). No entanto, o consenso geral é que as plantas tolerantes à seca mantêm a composição lipídica da membrana, devido a mecanismos antioxidantes eficazes (CONTOUR-ANSEL *et al.*, 2006; D'ARCY-LAMETA *et al.*, 2006), ao controle das atividades hidrolíticas (EL-MAAROUF *et al.*, 1999; MATOS *et al.*, 2001; SAHSAH *et al.*, 1998) e à capacidade de aumento dos níveis de insaturação por uma estimulação da expressão de genes de dessaturação (TORRES-FRANKLIN *et al.*, 2009). Nas espécies sensíveis à seca, os processos de degradação levam a reduções do teor de lipídios polares e de ácidos graxos poliinsaturados, especialmente nos galactolipídios de folhas (MONTEIRO DE PAULA *et al.*, 1993; TORRES-FRANKLIN *et al.*, 2007).

As enzimas envolvidas na degradação de lipídios de membrana e os genes correspondentes são relativamente bem conhecidos nessas plantas submetidas à seca (EL-MAAROUF *et al.*, 1999, 2001; MATOS *et al.*, 2001, 2008). Por outro lado, o envolvimento da síntese dos ácidos graxos poliinsaturados na manutenção da composição da membrana em condições de seca também é importante. As membranas celulares de folhas de plantas e, em particular, as membranas de cloroplastos contêm altos níveis de ácidos graxos trienóicos. A insaturação contribui para a estabilidade das membranas celulares e para a atividade ótima das proteínas ligadas à membrana. Assim, o aumento do teor dos ácidos graxos poliinsaturados poderia ajudar a manter a fluidez e a permeabilidade adequadas das membranas sob condições de seca (TORRES-FRANKLIN *et al.*, 2009).

## **2.5 *Vigna unguiculata* (L.) Walp**

### **2.5.1 *Descrição***

#### **2.5.1.1 *Classificação botânica e origem***

A espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp é uma eudicotiledônea vulgarmente conhecida como feijão-de-corda (Figura 10). Ela pertence à família *Fabaceae*, à subfamília *Faboideae*, à tribo *Phaseoleae* e à subtribo *Phaseolinae* (VERCOURT, 1970). O gênero *Vigna* é composto por mais de 200 espécies que são nativas de regiões quentes em todos os continentes (FERY, 2002). A localização exata do centro de origem do feijão-de-corda é difícil de determinar. Com base em variações genéticas e morfológicas em relação ao número e à distribuição geográfica das variedades selvagens, bem como suas características primitivas, acredita-se que as espécies mais primitivas de *Vigna unguiculata* selvagem surgiram no Sul da África. Essa espécie era comum em outras partes da África, na Europa e na Índia e somente trazida para a América tropical por volta do ano 1700 pelos espanhóis com o comércio de escravos (SINGH; MOHAN; DASHIELL, 1997).

### **2.5.2 *Importância econômica e nutricional***

#### **2.5.2.1 *Cultura de subsistência***

O feijão-de-corda é destaque na região Nordeste do Brasil, onde é a principal cultura de subsistência na região do Semi-árido. Também é essencial para apoiar a produção de gado e cereais em regiões semi-áridas, servindo de forragem, proteção contra a erosão e eliminação de algumas plantas parasitas (SILVA, 2005). A área plantada com feijão-de-corda no mundo é de cerca de 12,5 milhões de hectares, com 8 milhões (64% do total mundial) na África Ocidental e Central. As outras partes do mundo, onde o feijão-de-corda é fortemente presente, estão localizadas na América do Sul, na América Central e na Ásia, com áreas também no Sudoeste da Europa, no Sudoeste dos Estados Unidos e na Oceania (CITADIN; IBRAHIM; ARAGÃO, 2011;

SPRENT; ODEE; DAKORA, 2010). Entre todos os países, os principais produtores são a Nigéria, o Níger e o Brasil (QUIN, 1997). No Brasil, os principais produtores de feijão-de-corda são os estados do Ceará (159.471 t), Piauí (58.786 t), Bahia (50.249 t) e Maranhão (35.213 t), que também têm as maiores áreas cultivadas (IBGE, 2001).

#### *2.5.2.2 Valor nutritivo*

O feijão-de-corda é uma excelente fonte de proteínas (23-25%, em média) que contém todos os aminoácidos essenciais, hidratos de carbono (62%), vitaminas, minerais, fibras alimentares e pequena quantidade de lipídios e ausência de colesterol. Ele é cultivado principalmente para a produção de grãos, secos ou verdes, visando o consumo humano no seu estado natural, na forma de enlatados ou desidratados (DUTRA; TEÓFILO 2006).

#### *2.5.2.3 Fixação de nitrogênio*

O feijão-de-corda promove a fixação de nitrogênio por simbiose com bactérias de nódulos (*Bradyrhizobium* sp.). Foi visto que o plantio de feijão em cadeia mantém a reserva de nitrogênio no solo e é capaz de aumentá-lo (SINGH; MOHAN; DASHIELL, 1997).

### **2.5.3 Clima**

#### *2.5.3.1 As capacidades de resistência à seca*

Apesar de ser considerada uma cultura tolerante à seca, as pesquisas mostraram que o aparecimento de déficit hídrico durante a cultura do feijão-de-corda, especialmente nos períodos de floração e de enchimento de grãos, pode causar uma diminuição acentuada do rendimento. O estresse hídrico também reduz o peso dos nódulos, o nitrogênio acumulado, a produção de nitrogênio e a produção de matéria seca das plantas de feijão-de-corda, especialmente quando o estresse hídrico é imposto entre a segunda e a quinta semana após o plantio (STANFORD *et al.*, 1990). Em estudo com base no efluxo de solutos de discos foliares tratados com polietilenoglicol,

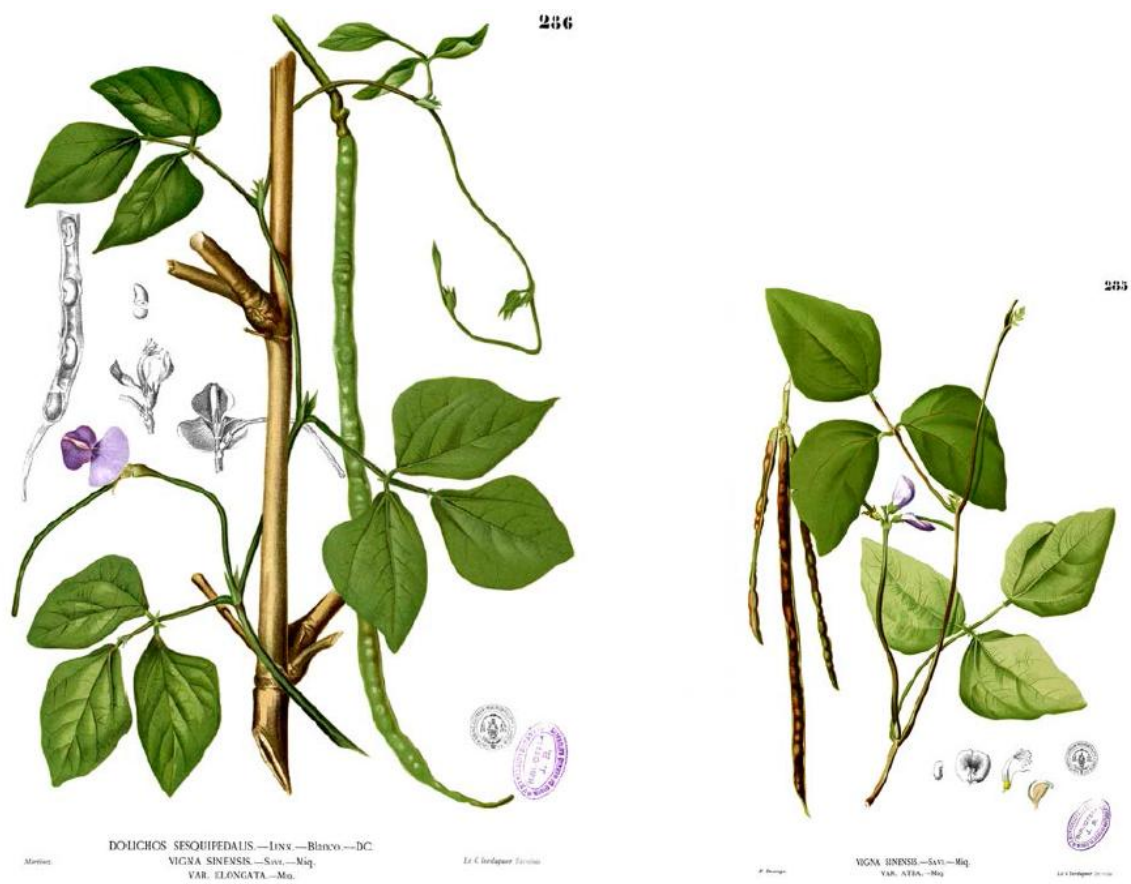
*Vigna unguiculata* revelou-se mais tolerante do que outras espécies de feijão (VASQUEZ-TELLO *et al.*, 1990). Também neste critério, El-Maarouf *et al.* (1999) caracterizaram o cultivar EPACE-1 como sendo mais tolerante ao estresse hídrico que o cultivar IT83-D.

#### 2.5.3.2 Impacto do ozônio sobre o feijão-de-corda

Em relação ao ozônio, as respostas do feijão-de-corda não são conhecidas. Alguns trabalhos com *Glycine max*, uma espécie próxima de *Vigna unguiculata*, mostraram a sensibilidade dessa cultura fabácea ao ozônio em comparação com outras culturas (MILLS *et al.*, 2007, 2011).



Figura 10 - Pranchas botânicas representando *Vigna unguiculata* (L.) Walp, anteriormente chamada *Vigna sinensis*.



Fonte: Blanco (1980-1983).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

Sementes de dois cultivares de *Vigna unguiculata* L. (Walp) foram utilizadas: EPACE-1, desenvolvido e cedido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará e adaptada às regiões semi-áridas do Nordeste do Brasil; e IT83-D, originário de regiões úmidas da China e fornecida pela equipe IPE – UMR 7816 da *Université Paris-Est Créteil*. Estudos anteriores mostraram que esses dois cultivares toleram diferencialmente a seca: EPACE-1 sendo fortemente tolerante e IT83-D sendo moderadamente tolerante a esse estresse ambiental (VASQUEZ-TELLO *et al.*, 1990).

#### 3.2 Condições de cultura e tratamentos

As sementes de *Vigna unguiculata* foram esterilizadas com hipoclorito de cálcio  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  0,5% (v/v) durante 5 minutos para eliminação de possíveis patógenos presentes em seu tegumento e então lavadas em água corrente e depois com água destilada (3 vezes). As sementes descontaminadas foram germinadas individualmente em potes de plástico de 5 L contendo 0,4 Kg de solo enriquecido (N/P/K 14/16/18; 1,2  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ , Gramoflor) fertilizado com 15 g de grânulos nutritivos de liberação lenta (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2, Fertil). As plantas foram cultivadas durante duas semanas em câmaras de germinação (Figura 11) sob condições controladas de luz ( $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  no nível das plantas por 14 horas), temperatura (25/20 °C dia/noite) e umidade (UR 80%) e com irrigação diária, mantendo-se o solo na capacidade de campo. A aplicação de água foi feita de maneira a evitar a irrigação direta das folhas. Após esse período de desenvolvimento, as plantas foram transferidas para câmaras fitotônicas (área bruta: 1,44  $\text{m}^2$  e 2 m de altura) (Figura 12), onde passaram por um período de aclimação de uma semana nas mesmas condições de luz, temperatura e umidade descritas acima. Em seguida, as plantas de 3 semanas foram submetidas aos seguintes tratamentos por 14 dias: controle (C), seca (S), ozônio (O) e ozônio e seca combinados (OS). As plantas controle foram expostas ao ar ambiente e receberam 400 mL de água por dia. A seca foi aplicada pela suspensão da irrigação e

o ozônio foi imposto pela exposição das plantas a  $120 \pm 10$  ppb de ozônio por fumigações diárias de 12h (11-23h). O ozônio foi produzido a partir de  $O_2$  puro por dois geradores de ozônio (OZ500; Fischer, Bonn, Alemanha e CMG3-3; Innovatec II, Rheinbach, Alemanha) e continuamente monitorado por um analisador de ozônio (O341M, Environnement SA, Paris, França). Para as dosagens moleculares e bioquímicas, a primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida (folha nº 1, a partir da base do caule) foi coletada após 7 e 14 dias de tratamentos, imediatamente congelada em nitrogênio líquido e conservada a  $-80$  °C para as análises posteriores.

Figura 11 - Câmara de germinação onde as plantas foram cultivadas durante duas semanas sob condições controladas de luz ( $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  no nível das plantas durante 14 horas), temperatura ( $25/20$  °C dia/noite) e umidade (UR 80%).



Fonte : Fotografia tirada pelo autor.

Figura 12 - Câmaras fitotrônicas onde as plantas foram submetidas a um período de aclimação de uma semana e submetidas aos diferentes tratamentos por 14 dias.



Fonte : Fotografias tiradas pelo autor. Legenda: A: Corredor que leva às 8 câmaras; B: Porta de uma câmara com as plantas em seu interior; C: Cultura individual de plantas no interior de uma câmara.

### ***3.2.1 Procedimento de fumigação de ozônio***

As plantas de EPACE-1 e de IT83-D foram distribuídas entre as 8 câmaras fitotrônicas climatizadas e iluminadas por 5 lâmpadas a vapor de sódio (Son-T Agro, Philips) produzindo um PPFD de  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ao nível das plantas. Um dispositivo de fumigação de ozônio funciona em 4 câmaras dentre as 8. O ozônio é produzido por dois geradores (OZ500 Fischer e CMG3-3 Innovatec II) que separam as moléculas de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) e as reassociam de maneira aleatória, produzindo as moléculas de ozônio que são injetadas no sistema de ventilação das câmaras. As plantas foram fumigadas continuamente durante 14 dias com período de fumigação diária de 12 horas, começando 2 horas após o início do fotoperíodo. A concentração de ozônio ( $120 \pm 10$  ppb) foi medida duas vezes por hora através de um analisador de UV (O341M, Environnement SA) associado a uma estação de aquisição de dados informatizada.

### **3.3 Análises fisiológicas**

#### ***3.3.1 Medida da massa seca da parte aérea***

O conjunto da biomassa aérea (caule e folhas) de plantas EPACE-1 e IT83-D foi separada das raízes, desidratada a 60 °C durante 48h e a sua massa foi medida em balança analítica após 7 e 14 dias de tratamentos. Três plantas por tratamento e por cultivar foram medidas.

#### ***3.3.2 Medida do teor relativo de água***

O teor relativo de água (TRA) das folhas de plantas EPACE-1 e IT83-D foi medido após 7 e 14 dias de tratamentos em discos foliares de 2 cm de diâmetro. A coleta foi feita em uma folha trifoliolada desenvolvida (terceira ou quarta), na razão de 1 disco por folíolo. Três plantas por tratamento e por cultivar foram medidas. Os discos rapidamente pesados para obtenção da sua massa fresca (MF) foram depois dispostos sobre papel filtro embebido com água e deixados a 4 °C por 12 horas no escuro. Eles foram em seguida delicadamente enxugados e pesados para obtenção da massa túrgida (MT). A secagem dos discos foi obtida em estufa a 60 °C por 12 horas, afim de se obter as massas secas (MS). Com isso, o teor relativo de água foi calculado com a seguinte fórmula (WEATHERLEY, 1950):

$$\text{TRA \%} = (\text{MF} - \text{MS}) \cdot 100 / (\text{MT} - \text{MS})$$

#### ***3.3.3 Medida da fluorescência da clorofila***

A emissão da fluorescência *in vivo* foi medida após 7 e 14 dias de tratamentos em um dos folíolos da primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida (4 plantas por tratamento e por cultivar foram medidas), utilizando-se um fluorímetro de impulsão modulada (FMS 1, Hansatech). Os dados foram registrados em tempo real pelo programa Modfluor32.

Primeiramente, o tecido fotossintetizante (folha) foi mantido no escuro por um período mínimo de 30 minutos através de uma pinça com sistema de clip “abre-fecha”. Durante a

adaptação ao escuro, todos os centros de reação dos fotossistemas são totalmente oxidados. A emissão de fluorescência pela clorofila é então mínima, definida como  $F_0$  (emissão de luz pelas moléculas de clorofilas *a* excitadas, antes da energia ser dissipada para o centro de reação do fotossistema II - PSII).

Em seguida, um pulso de luz saturante ( $> 10\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  por 1 s) foi aplicado para obter a fluorescência máxima das folhas adaptadas ao escuro ( $F_m$ ). A luz actínica ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) foi em seguida ligada para conduzir a fotossíntese. Quando as folhas atingiram o estado de equilíbrio, a fluorescência no estado estacionário ( $F_s$ ) foi registrada. Um pulso de luz saturante ( $>10\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  por 1 s) e um pulso escuro foram em seguida aplicados para obter a fluorescência máxima ( $F_m'$ ) e mínima ( $F_0'$ ) das folhas adaptadas à luz, respectivamente. Assim, a relação  $F_v/F_m$ , que indica o rendimento quântico máximo do fotossistema II, pode ser calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

O rendimento quântico do PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), que corresponde à fração da energia luminosa usada para a fotoquímica em uma folha adaptada à luz, pode ser calculado como mostrado abaixo:

$$\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_0')/F_m'$$

### ***3.3.4 Medida da condutância estomática ao vapor de água***

A condutância estomática ao vapor de água foi medida após 7 e 14 dias de tratamentos em um dos folíolos da primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida de plantas EPACE-1 e IT83-D utilizando-se um porômetro SC-1 portátil (Decagon Devices, Inc.). Quatro plantas por tratamento e por cultivar foram utilizadas e as medidas foram sistematicamente efetuadas nas primeiras horas da manhã (entre 9h e 11h), antes do início da fumigação de ozônio, no interior das câmaras fitotrônicas.

### 3.3.5 Índices de exposição ao ozônio e de dose de ozônio

O índice AOT40 (dose cumulativa de ozônio acima do limiar de concentração de ozônio de 40 ppb, em ppb h sob uma iluminação mínima de  $50 \text{ W.m}^{-2}$ ) foi calculado pela soma das diferenças entre as médias horárias de concentração de ozônio (em ppb) e um limiar de 40 ppb para todas as horas de luz, num período de tempo especificado (Mapping Manual of the Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution, 2004).

A absorção instantânea de ozônio foi calculada a partir do monitoramento da concentração de ozônio e da condutância estomática ao vapor de água ( $g_s$ ), conforme descrito em Bagard *et al.* (2008). O fluxo de ozônio no mesófilo das folhas ( $F_{O_3}$ ) é dado por:

$$F_{O_3} = g_{O_3} ([O_3]_{\text{atm}} - [O_3]_{\text{int}})$$

onde,  $g_{O_3}$  é a condutância estomática ao ozônio,  $[O_3]_{\text{atm}}$  é a concentração de ozônio na câmara e  $[O_3]_{\text{int}}$  é a concentração de ozônio na folha. O ozônio reage rapidamente na folha (LAISK; KULL; MOLDAU, 1989) e  $[O_3]_{\text{int}}$  é geralmente suposta ser nula (GRULKE; PAOLETTI; HEATH, 2007). A condutância estomática ao ozônio está relacionada a  $g_s$  pela seguinte fórmula:

$$g_{O_3} = 0,663 g_s$$

onde 0,663 é a razão entre o coeficiente de difusão no ar de ozônio acima daquele do vapor de água (MASSMAN, 1998). A partir das duas equações anteriores, a absorção instantânea de ozônio (em  $\text{nmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) pode ser expressa como:

$$F_{O_3} = 0,663 g_s [O_3]_{\text{atm}}$$

Como as plantas foram cultivadas sob condições controladas de luz, umidade e temperatura, supõe-se que  $g_s$  permaneceu estável durante os períodos diários de fumigação. Por conseguinte, um único valor de  $g_s$  foi usado para calcular as absorções horárias de ozônio num determinado dia. A condutância estomática ao vapor de água foi registrada conforme descrito na seção anterior, após 7 e 14 dias de tratamentos.  $[O_3]_{\text{atm}}$  foi obtida a partir da concentração média horária de ozônio registrada nas câmaras de fumigação. A absorção horária de ozônio (em  $\text{mmol.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ) foi estimada pela integração da absorção instantânea ( $F_{O_3}$ ) acrescida de uma hora. O fluxo estomático acumulado ou dose fitotóxica de ozônio (POD, em  $\text{mmol.m}^{-2}$ ) foi determinado adicionando-se as absorções horárias de ozônio. Em ausência de relação dose-

resposta disponível para *Vigna* ou espécies próximas, o POD foi calculado sem limiar de fluxo instantâneo de ozônio (Mapping Manual LRTAP, 2004).

### **3.3.6 Acumulação de peróxido de hidrogênio nas folhas**

A acumulação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) nas folhas de plantas EPACE-1 e IT83-D foi estudada após 14 dias de tratamentos utilizando a coloração por 3,3'-diaminobenzidina (DAB). A solução DAB ( $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi infiltrada nos discos foliares de 1 cm de diâmetro por vácuo e os discos foram então deixados impregnar durante 24 horas no escuro. Em seguida, os discos foram descoloridos em três banhos sucessivos de etanol 95% e estocados em glicerol 30%. As fotos foram adquiridas com um microscópio estereoscópico sob  $0,8\times$  de ampliação (Nikon SMZ1000) acoplado a uma câmera digital (Nikon D70S).

## **3.4 Análises bioquímicas**

### **3.4.1 Extração dos lipídios totais de folhas de feijão-de-corda**

Os lipídios totais de folhas de plantas EPACE-1 e IT83-D foram extraídos segundo o método de Blich e Dyer (1959), com modificações. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e aproximadamente 1g do pó resultante foi adicionado a 10 mL de água destilada em ebulição durante 2 minutos para interromper as atividades das enzimas lipolíticas. O homogenato então obtido foi transferido para um tubo de vidro para centrífuga contendo 10 mL de metanol e 10 mL de clorofórmio. O tubo foi fortemente agitado para extrair os componentes hidrossolúveis (fase metanol/água) e os componentes lipossolúveis (fase clorofórmica). Uma centrifugação (em centrífuga Jouan BR4) a  $2000\times g$  durante 15 minutos foi realizada em temperatura ambiente. A fase inferior clorofórmica foi coletada em um tubo de vidro e o material vegetal foi novamente extraído após adição de 10 mL de clorofórmio, agitação e segunda centrifugação. A fase clorofórmica foi coletada, misturada à primeira e o clorofórmio evaporado sob corrente de nitrogênio. Os lipídios foram solubilizados em 1 mL de etanol/tolueno (1:4 v/v) e conservados a

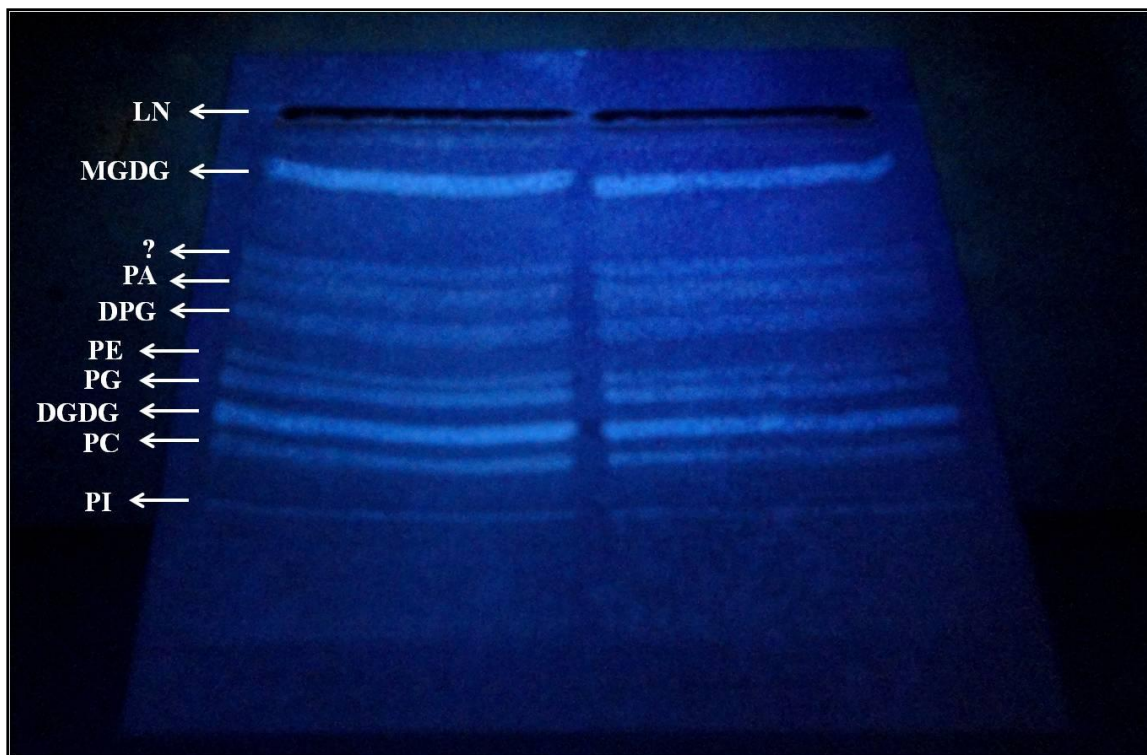


4 °C. Butilhidroxitolueno (BHT) a 0,01% foi adicionado às soluções de extração para prevenir a oxidação dos lipídios.

### ***3.4.2 Separação das classes lipídicas por cromatografia de camada fina***

O extrato lipídico (300 µL) proveniente de folhas de plantas EPACE-1 e IT83-D foi utilizado para a separação das classes lipídicas por cromatografia de camada fina (CCF) (fase estacionária: placas de sílica 20 × 20 cm, G40, Merck), com 95 mL de solução de Lepage (1967) [clorofórmio/acetona/metanol/ácido acético/água (50/20/10/10/5 v/v)] como fase móvel, dentro de uma cuba para cromatografia hermeticamente fechada. As amostras migraram por aproximadamente 2 horas até que a frente de migração se encontrasse a 2 cm da borda superior da placa. Após a migração, as diferentes classes lipídicas, devidamente separadas em bandas, foram visualizadas sob luz UV após pulverização de primulina (10 mg/100 mL de acetona 80%) (Figura 13). As bandas correspondentes a cada classe lipídica sobre a placa foram coletadas para análise por raspagem com uma espátula.

Figura 13 - As diferentes classes de lipídios visualizadas sob luz UV após pulverização com primulina na placa de CCF.



Fonte: Fotografia tirada pelo autor. Legenda: MGDG, monogalactosil-diacilglicerol; DGDG, digalactosil-diacilglicerol; PC, fosfatidilcolina; PG, fosfatidilglicerol; PI, fosfatidilinositol; PE, fosfatidiletanolamina; PA, ácido fosfatídico; DPG, difosfatidilglicerol; LN, lipídios neutros.

### 3.4.3 Metilação dos ácidos graxos

Os lipídios totais e as classes lipídicas separadas por CCF foram saponificados com soda metanólica 0,5 N (2 mL por amostra a ser tratada) e aquecimento a 65 °C por 15 minutos em banho-maria. Os ácidos graxos obtidos foram metilados com trifluoruro de boro/metanol ( $\text{BF}_3\text{CH}_3\text{OH}$ ) (2 mL por amostra a ser tratada) e aquecimento a 65 °C por 15 minutos em banho-maria. Um padrão interno constituído de ácido heptadecanóico puro (17:0; 0,1% m/v em metanol) é adicionado às amostras antes de sua metilação na razão de 100  $\mu\text{L}$  nos extratos totais e 50  $\mu\text{L}$  nas amostras das classes lipídicas. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram em seguida extraídos pela adição de 10 mL de pentano e 2 mL de água destilada, com agitação. A fase superior pentânica foi coletada e colocada a secar sob uma corrente de nitrogênio. Após

evaporação, os ésteres metílicos de ácidos graxos foram recuperados em 1 mL de pentano e conservados a -20 °C.

#### ***3.4.4 Análise dos ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa***

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs) dos lipídios totais e das classes lipídicas de folhas foram separados utilizando-se um cromatógrafo gasoso (Clarus 680, Perkin Elmer) equipado com uma coluna capilar em sílica fundida (60 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interior × 25 µm de espessura, Elite-WAX ETR, Perkin Elmer). 1 µL das amostras e das misturas-padrão foi evaporado a 250 °C no cromatógrafo e introduzido na coluna por um sistema de injeção. O hélio foi utilizado como gás vetor com fluxo constante de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura do forno foi programada para aumentar de forma contínua a partir de 75 °C até 200 °C com um tempo total de execução de 60 min. Os EMAGs foram separados de acordo com o comprimento da cadeia carbônica e com o grau de insaturação. Na saída da coluna, os ésteres metílicos foram analisados através de ionização eletrônica (70 eV) com espectrômetro de massa quadripolo (Clarus 600, Perkin Elmer) e identificados comparando-se os dados espectrais a uma base de dados NIST (*National Institute of Standards Technology*, Gaithersburg, Maryland). Uma solução de pentano foi injetada entre cada amostra para a lavagem da coluna.

Os calibradores foram preparados a partir de uma mistura de padrões disponível comercialmente (F.A.M.E. Mix, C8-C22 unsaturates, Supelco) utilizando-se o ácido heptadecanóico (17:0) como padrão interno. Os calibradores foram analisados em três replicatas e curvas-padrão lineares foram estabelecidas para os ésteres metílicos dos cinco principais ácidos graxos presentes nos lipídios de membrana de folhas de *Vigna* (16:0, 18:0, 18:1; 18:2, 18:3) (MONTEIRO DE PAULA *et al.*, 1990).

Para maximizar a sensibilidade e a especificidade, os EMAGs foram quantificados em modo de registro *mono-ion* (*single-ion-recording*, SIR), onde apenas os fragmentos iônicos de interesse, previamente selecionados e registrados de acordo com o seu tempo de retenção, são retidos para análise. Os espectros de massa dos EMAGs foram identificados utilizando-se a

biblioteca comercial dos espectros de massa fornecida com o *software* do fabricante (TurboMass, Perkin Elmer).

Para determinar a concentração de ácido graxo (em mg/gMS) em uma dada folha, as respostas (áreas dos picos) dos EMAGs foram normalizadas separadamente da resposta do padrão interno 17:0 e quantificadas usando-se a relação de calibração correspondente de acordo com a seguinte fórmula:

$$[A.G.] = \sum [(A_{A.G.}/A_{17:0})/a] \times 5 / MS$$

onde  $A_{A.G.}$  corresponde à área do pico correspondente ao ácido graxo de interesse,  $A_{17:0}$  representa a área do pico correspondente ao 17:0, 'a' corresponde à inclinação da reta padrão:  $A_{A.G.}/A_{17:0} = f([A.G.])$ , '5' é o fator de diluição do extrato total (200  $\mu$ L utilizados sobre 1000  $\mu$ L de extrato total) e MS corresponde à massa seca da folha.

O cálculo das concentrações de ácidos graxos das classes lipídicas foi efetuado a partir da fórmula acima utilizando-se '3,33' como fator de diluição, pois 300  $\mu$ L sobre um total de 1000  $\mu$ L foram utilizados para a metilação. Para determinar o teor de um dado lipídio, as quantidades de ácidos graxos foram adicionadas e o resultado foi multiplicado por um coeficiente de correção segundo o tipo de lipídio: MGDG=1,41; DGDG=1,69; PC=1,56; PG=1,54; PI=1,69; PE=1,09; PA=1,09; DPG=1,09.

### 3.5 Análises moleculares

#### 3.5.1 Extração de RNA total

O isolamento de RNA totais foi realizado com o *kit* de extração – *RNeasy Plant Mini kit* (Qiagen), seguindo-se as instruções do fabricante. As folhas, previamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C, foram maceradas em gral pré-resfriado contendo nitrogênio líquido. Aproximadamente 70 mg do macerado foram transferidos para microtubos, onde 450  $\mu$ L de tampão RLT (contendo isotiocianato de guanidina) e  $\beta$ -mercaptoetanol 1% (v/v) foram adicionados. O  $\beta$ -mercaptoetanol inativa RNases. A mistura foi homogeneizada por agitação em *vortex* durante 2 minutos, depois centrifugada (SpinMini Plus, Eppendorf) a 14 500 rpm durante 6 minutos. O sobrenadante foi coletado e colocado no topo de uma mini coluna do

*kit (QIAshredder spin column - lilás)*, acoplada a um tubo coletor de 2 mL. Uma centrifugação a 14 500 rpm por 2 minutos foi realizada e 225 µL de etanol 100% foram adicionados ao filtrado, o que favorece a desnaturação e a ligação do RNA na próxima coluna. A mistura foi depositada sobre uma outra coluna do *kit (RNeasy mini spin column - rosa)*, acoplada a um tubo coletor de 2 mL e centrifugada a 14 500 rpm por 1 minuto para remoção de resíduos de etanol. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor. O conteúdo da coluna foi lavado com 350 µL de tampão RW1 para centrifugação a 14 500 rpm por 1 minuto. Os RNA totais fixados na resina da coluna foram tratados com 80 µL de DNase I em tampão RDD (1:7 v/v) (*Rnase-Free DNase Set*, Qiagen) durante 15 minutos, à temperatura ambiente (afim que a DNase atravesse inteiramente o filtro e elimine os DNA restantes). Após uma nova lavagem com 350 µL de tampão RW1, três lavagens foram realizadas com 500 µL de tampão RPE. A eluição dos RNA totais foi realizada com 30 µL de água livre de RNase adicionada diretamente à coluna, deixando-a agir 5 minutos à temperatura ambiente antes de uma centrifugação a 14 500 rpm por 1 minuto para a primeira eluição. O filtrado foi depositado sobre a mesma coluna e novamente centrifugado a 14 500 rpm por 1 minuto. O eluído final consiste no extrato de RNA total.

A concentração do RNA nos extratos totais foi avaliada por espectrofotometria utilizando-se um NanoDrop™ ND-1000 (NanoDrop, Noryx) em comprimento de onda de 260 nm com 1 µL do extrato. A relação  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ , que deve se situar entre 1,7 e 2,0, avalia a pureza dos extratos. A integridade dos RNA extraídos foi avaliada por observação dos sinais correspondentes às subunidades ribossomais 18S e 28S, após eletroforese em gel de agarose (1,5% m/v) em presença de brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A amostra ( $0,5 \mu\text{g}$  do extrato de RNA totais) foi misturada ao tampão de carga (azul de bromofenol  $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , glicerol 60%, água destilada) e a eletroforese foi realizada em tampão TAE 0,5× (TAE 50×: Tris-HCl 0,5M, ácido acético 50mM, EDTA 5mM, pH 7.4), numa cuba eletroforética acoplada a um gerador de corrente (Mupid-one, Advance) regulado a 100 V por aproximadamente 30 minutos. Um marcador de comprimento (fragmentos de DNA de 100 pb a 1000 pb, Smart Ladder, Eurogentec) foi utilizado. A fluorescência do brometo de etídio foi detectada pela exposição do gel aos raios ultravioleta e digitalizada por um sistema de imagem molecular (GelDoc, BioRad).

### 3.5.2 Síntese do DNA complementar por transcrição reversa

A síntese do DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa (RT) foi realizada a partir de 800 ng de RNA total extraído de folhas com o auxílio do *kit SuperScript® III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante.

A mistura seguinte: H<sub>2</sub>O sem RNase q.s.p. 11 µL, 800 ng de RNA total, 1 µL de oligo dT18 20 pmol.µL<sup>-1</sup> e 1 µL de dNTP's 10 mM foi colocada em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) a 65 °C durante 5 min, depois resfriada brutalmente a 4 °C por 1 minuto. À essa mistura foram adicionados 4 µL de *First Strand Buffer* 5×, 1 µL de DTT 0,1 µM, 1 µL de *RNase Inhibitor* e 4 unidades de *SuperScript III Reverse Transcriptase*. A mistura foi incubada no termociclador a 55 °C por 1 hora, depois a 70 °C por 15 minutos para desnaturação da transcriptase reversa. Em seguida, os tubos foram armazenados a -20 °C.

### 3.5.3 Desenho dos iniciadores da cardioplipina sintase de *Vigna unguiculata*

As sequências genômicas nas espécies da ordem Fabales, próximas a *Vigna unguiculata*, foram obtidas por pesquisas na base de dados WGS (*Whole Genome Sequencing*) do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e no Phytozome (<http://www.phytozome.net/>), utilizando-se a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) com a sequência em aminoácidos da cardioplipina sintase (CLS) de *Arabidopsis thaliana* (número de acesso: NP\_567273.1) como 'isca'. Apenas um gene codificando para a CLS foi encontrado nessas plantas. A anotação das sequências de éxons/íntrons dos genes codificando para a CLS das espécies *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* e *Cajanus cajan* foi efetuada comparando-se suas sequências genômicas obtidas com as sequências de RNAm/ESTs disponíveis no GenBank. As sequências deduzidas dos cDNA foram obtidas por eliminação de íntrons e junção dos éxons. As sequências de aminoácidos deduzidas foram obtidas pela tradução dos cDNA deduzidos utilizando-se uma ferramenta de tradução (<http://web.expasy.org/translate/>). Essas sequências de aminoácidos em *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* e *Cajanus cajan* foram utilizadas para o desenho dos iniciadores afim de se estabelecer a sequência de cDNA da CLS de *Vigna unguiculata*. Para tanto, um alinhamento das sequências de aminoácidos da CLS de *Phaseolus*

*vulgaris*, *Glycine max* e *Cajanus cajan* foi realizado (programa ClustalW2; <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). A partir das sequências-consenso identificadas, foi observado que as extremidades N-terminal e C-terminal são bastante conservadas, o que permitiu de criar um par de iniciadores no começo e no fim da sequência, com o objetivo de clonar a sequência codante completa (desde a primeira metionina ao códon de parada) em *Vigna unguiculata*. As sequências de oligonucleotídios retidas (senso: 5'-TAATGGTTCTGTTCCGCAAG-3'; antisenso: 5'-CAACTAGACCGAGTTTGATACT-3') foram analisadas com o programa *Net primer launch* ([www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html](http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html)) e em seguida enviadas à empresa Eurofins MWG Operon para síntese. Os seguintes critérios foram avaliados para a escolha das sequências oligonucleotídicas: porcentagem de resíduos de G + C próxima de 50%; Tm (temperatura de pareamento dos oligonucleotídios à matriz de DNA) compreendida entre 50 °C e 60 °C; probabilidade de dimerização ou polimerização nula.

#### **3.5.4 Amplificação do cDNA da cardiolipina sintase por PCR semi-quantitativa**

O cDNA obtido a partir de folhas de plantas EPACE-1 após 14 dias de tratamento (ozônio+seca) foi utilizado como matriz para a amplificação por PCR de uma sequência codante inteira da cardiolipina sintase. O *kit PCR Master Mix* (Promega) incluindo DNA Polimerase de tipo *Taq* (*Thermus aquaticus* DNA polimerase) a 50 unidades.mL<sup>-1</sup>, dNTP 400 µM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM e um tampão de reação (pH 8.5) foi utilizado.

As misturas de reações PCR foram preparadas como segue: H<sub>2</sub>O sem RNase q.s.p. 25 µL, 2 µL de iniciador senso 5 µM, 2 µL de iniciador anti-senso 5 µM, 12,5 µL de *Master Mix* 2× (*Taq* DNA polimerase 0,05 u.µL<sup>-1</sup>, tampão de reação, MgCl<sub>2</sub> 4 mM e dNTP 0,4 mM) e 1 µL de cDNA 50 ng.µL<sup>-1</sup>. As reações PCR foram conduzidas no termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) com o seguinte programa :

- Desnaturação preliminar: 95°C por 5 minutos.
- 40 ciclos de amplificação, incluindo as etapas sucessivas de: desnaturação: a 95 °C por 30 segundos, hibridização: a 53 °C por 30 segundos, alongamento: a 72 °C por 2 minutos.
- Alongamento final : 72 °C por 10 minutos.

Os resultados das ampliações por PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose (1% m/v) em presença de brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) com tampão TAE  $0,5\times$  (TAE  $50\times$ : Tris-HCl 0,5 M, ácido acético 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7.4) em uma cuba de eletroforese acoplada a um gerador de corrente (Mupid-one, Advance) regulado a 100 V durante aproximadamente 30 minutos. Um marcador de comprimento (fragmentos de DNA de 100 pb a 1000 pb, Smart Ladder, Eurogentec) foi utilizado. A fluorescência do brometo de etídio foi detectada pela exposição do gel aos raios ultravioleta e digitalizada por um sistema de imagem molecular (GelDoc, BioRad).

### ***3.5.5 Clonagem e sequenciamento do cDNA da cardiolipina sintase***

#### *3.5.5.1 Ligação de produtos de amplificação de PCR em um vetor de clonagem plasmídico*

Um vetor plasmídico, pGEM-T, do *kit* de clonagem pGEM-T® *easy Vector system I* (Promega) foi utilizado para clonagem do DNA amplificado por PCR. A ligação dos produtos de PCR no vetor foi realizada nas seguintes condições:  $5\mu\text{L}$  de tampão de ligação  $2\times$  (Tris-HCl 60mM, pH 7.8,  $\text{MgCl}_2$  20mM, DTT 20mM, ATP 2mM, PEG 10%),  $1 \mu\text{L}$  de solução do vetor plasmídico (concentração não comunicada pelo fabricante),  $1 \mu\text{L}$  de DNA ligase T4 (3 unidades) e  $3 \mu\text{L}$  do produto de PCR. O todo foi incubado a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos.

#### *3.5.5.2 Transformação de bactérias competentes*

Bactérias competentes (*Escherichia coli* GT869, Stratagene) foram transformadas com o plasmídio recombinante por choque térmico utilizando-se  $10 \mu\text{L}$  do produto de ligação e  $80 \mu\text{L}$  de bactérias competentes. A mistura realizada com o auxílio de uma ponteira de pipeta foi incubada no gelo por 10 minutos, transferida para um banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  por 5 minutos e imediatamente transferida para o gelo por 1 minuto. As bactérias transformadas foram cultivadas em  $400 \mu\text{L}$  de meio de cultura líquido LB (Luria-Bertani) (Bacto-Triptona  $10 \text{g.L}^{-1}$ , extrato de levedura  $5 \text{g.L}^{-1}$ , NaCl 170 mM, pH 7) a  $37^\circ\text{C}$  por 20 minutos (tempo de uma geração) afim de expressar o gene de resistência à carbenicilina (antibiótico análogo à ampicilina) presente no



plasmídio. Após centrifugação (centrífuga SpinMini Plus, Eppendorf) a 14 500 rpm por 2 minutos, 300  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram descartados. O restante da solução bacteriana recombinante foi espalhada em meio de cultura sólido LB contendo carbenicilina 100  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo) (100 mM) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo) (4% m/v). As culturas bacterianas foram incubadas a 37 °C durante 16h.

O reconhecimento das colônias bacterianas que integraram o vetor plasmídico recombinante se faz com base na sua coloração, já que o sistema pGEM-T® *easy Vector system I* (Promega) é um sistema dito branco/azul (JACOB; MONOD, 1961). As colônias brancas são aquelas que potencialmente integraram um plasmídio recombinante, incluindo o produto de amplificação por PCR.

#### 3.5.5.3 Reação de PCR sobre colônias bacterianas

Reações PCR foram realizadas sobre três colônias brancas para se verificar a presença do inserto. Cada uma das colônias supostamente positivas foi repicada em meio LB carbenicilina e ressuspensa em 45  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  sem RNase para concentrar o teor de DNA plasmídico e aumentar a eficácia da PCR. 5  $\mu\text{L}$  foram utilizados para a realização das reações de PCR nas seguintes condições: 1  $\mu\text{L}$  de iniciador senso 5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{L}$  de iniciador anti-senso 5  $\mu\text{M}$  e 7  $\mu\text{L}$  de *Master Mix 2x* (*Taq* DNA polimerase 0,05  $\text{u}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , tampão de reação,  $\text{MgCl}_2$  4 mM e dNTP 0,4 mM) (Promega). As reações de PCR foram conduzidas em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) com o seguinte programa:

- Desnaturação preliminar: 95°C por 5 minutos.
- 35 ciclos de amplificação, incluindo as etapas sucessivas de: desnaturação: a 95 °C por 30 segundos, hibridização: a 50 °C por 30 segundos, alongamento: a 72 °C por 2 minutos.
- Alongamento final: 72 °C por 10 minutos.

Ao restante da solução de bactérias, 1 mL de meio LB líquido contendo 1  $\mu\text{L}$  de carbenicilina foi adicionado para incubação a 37 °C durante 1 hora. A amplificação do inserto por PCR foi verificada em gel de agarose 1%, utilizando-se 8  $\mu\text{L}$  do produto de PCR. 50  $\mu\text{L}$  dos clones constatados positivos foram espalhados em placas de Petri e incubados a 37 °C durante a

noite, depois armazenados a 4 °C. O restante dos clones foi recolocado em cultura em 7,5 mL de meio líquido LB com carbenicilina a 37 °C por 16 horas.

#### 3.5.5.4 Minipreparação de DNA plasmídico

A minipreparação consiste em isolar e purificar o DNA plasmídico a partir de bactérias. Para essa purificação, o sistema *QIAprep Spin Miniprep kit* (Qiagen) foi utilizado. 2 mL da cultura bacteriana foram centrifugados a 14500 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado. O precipitado bacteriano será ressuspensão em 250 µL de solução de ressuspensão, nos quais foram adicionados 250 µL de solução de lise e 10 µL de protease alcalina para inativar as endonucleases e outras proteínas liberadas durante a lise das células bacterianas. A mistura foi levemente agitada por inversão do tubo (4 vezes) e deixada à temperatura ambiente por 5 minutos. A reação de lise foi parada pela adição de 350 µL de solução de neutralização (que permite a renaturação rápida do DNA plasmídico desnaturado durante a fase de lise) e leve agitação. Após centrifugação a 14500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante contendo o DNA plasmídico foi transferido para uma coluna do *kit* e centrifugado a 14500 rpm por 1 minuto. O conteúdo da coluna foi lavado com 750 µL de solução de lavagem contendo etanol por centrifugação durante 1 minuto. O eluído foi descartado e a operação repetida com 250 µL de solução de lavagem e centrifugação por 2 minutos. O DNA plasmídico foi eluído em 70 µL de H<sub>2</sub>O sem RNase por centrifugação a 14 500 rpm durante 1 minuto, após incubação de 1 minuto à temperatura ambiente. A concentração em DNA plasmídico da solução eluída foi avaliada por espectrofotometria (NanoDrop<sup>TM</sup> ND-1000, Nixor) a 260 nm utilizando-se 1 µL da amostra.

#### 3.5.5.5 Sequenciamento do DNA

O DNA plasmídico purificado, contendo potencialmente uma sequência nucleotídica codificando a cardiolipina sintase de *Vigna unguiculata*, foi enviado à empresa Genoscreen (Lille, França) para sequenciamento (10 µL, de concentrações variando entre 50 ng.µL<sup>-1</sup> e 200 ng.µL<sup>-1</sup>). O sequenciamento foi realizado sobre as duas fitas a partir dos iniciadores universais T7

e SP6 do plasmídeo *pGEM-Teasy*. Após análise manual dos eletroferogramas do sequenciamento, as sequências nucleotídicas foram estudadas por bioinformática.

### **3.5.6 Análise das sequências de nucleotídeos de *VuCLS* por bioinformática**

A sequência de aminoácidos da *VuCLS* sequenciada foi deduzida utilizando-se uma ferramenta de tradução (<http://web.expasy.org/translate/>). Um alinhamento das sequências de aminoácidos da CLS de *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* e *Cajanus cajan* foi realizado e a porcentagem de identidade entre essas espécies foi verificada utilizando-se o programa ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Uma árvore filogenética, utilizando-se as sequências de aminoácidos da CLS em uma espécie representativa das dicotiledôneas (*Arabidopsis thaliana*, número de acesso Genbank: NP\_567273.1), uma espécie representativa das monocotiledôneas (*Oryza sativa*) e das espécies representativas da ordem Fabales, foi construída com o auxílio de um algoritmo *neighbor-joining* através do programa MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA *et al.*, 2013). Para tanto, a anotação das sequências de éxons/íntrons dos genes que codificam para a CLS das espécies *Arachis hypogaea*, *Cicer arietinum*, *Lotus japonus*, *Lupinus angustifolius*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, *Trifolium pratense* e *Vigna angularis* foi efetuada comparando-se as sequências genômicas obtidas com as sequências de RNAm/ESTs disponíveis no GenBank. As sequências deduzidas dos cDNA foram obtidas por eliminação de íntrons e a junção dos éxons. As sequências de aminoácidos deduzidas foram obtidas pela tradução dos cDNA deduzidos utilizando-se uma ferramenta de tradução (<http://web.expasy.org/translate/>).

### **3.5.7 Desenho dos iniciadores da cardioplipina sintase de *Vigna unguiculata* para PCR em tempo real**

Iniciadores específicos foram desenhados afim de se estudar a expressão gênica da cardioplipina sintase de *Vigna unguiculata* por PCR em tempo real (ou PCR quantitativa, qPCR). A partir da sequência do cDNA sequenciado, um alinhamento com as sequências do cDNA codificando para a CLS de *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* e *Cajanus cajan* foi realizado

utilizando-se o programa ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). As prováveis junções éxon/éxon na sequência de *VuCLS* foram encontradas por comparação com as sequências das outras espécies. Uma sequência genômica foi obtida pela inserção dos íntrons hipotéticos para orientar o programa PerlPrimer versão 1.1.21 (MARSHALL, 2004) a desenhar os iniciadores nas junções éxon/éxon, o que pode garantir que o iniciador não se ligue ao DNA genômico em caso de contaminação durante a etapa de extração de RNA. Sequências de 20 nucleotídeos foram selecionadas como iniciadores específicos para amplificar um fragmento de 116 pares de base (Tabela 1). As sequências de iniciadores foram verificadas: porcentagem de resíduos de G + C próximo de 50%; T<sub>m</sub> (temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos à matriz de DNA) compreendida entre 50 °C e 60 °C; probabilidade de dimerização ou polimerização nula. As sequências de oligonucleotídeos foram encomendadas à empresa MWG Biotech AG (Ebersberg, Alemanha).

### ***3.5.8 Análise da expressão de genes do metabolismo dos lipídios por PCR em tempo real***

A expressão dos genes do metabolismo dos lipídios de membranas de folhas foi analisada por PCR em tempo real com auxílio do *kit Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), contendo o tampão de reação e a enzima, em placas de 96 poços (MicroAmp, Applied Biosystems) em termociclador *StepOne Plus Real Time PCR* (Applied Biosystems).

A PCR em tempo real permite uma análise quantitativa da expressão de genes de interesse. A curva de amplificação PCR em função dos ciclos sucessivos pode ser estabelecida a partir das intensidades de fluorescência do *SYBR Green* presente no meio de reação. O *SYBR Green* é um agente que se intercala no DNA dupla-fita e que, após excitação pela luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde. A detecção da fluorescência no fim da etapa de alongamento de cada ciclo da reação de PCR permite medir em tempo real a quantidade de DNA sintetizado.

Os produtos de RT foram utilizados como matriz para as reações de qPCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos de *Vigna unguiculata* e correspondentes a diversos genes (Tabela 1).

Tabela 1 - Genes selecionados para análise de expressão; produto gênico; sequências (senso e anti-senso) dos oligonucleotídeos específicos de *V. unguiculata* utilizados como iniciadores nas reações de qPCR; tamanho esperado dos fragmentos amplificados por reação de qPCR; N° de acesso no GenBank.

Gene de interesse	Produto gênico	Iniciador senso (s) e Iniciador antisenso (as)	Tamanho do fragmento amplificado	N° de acesso
<i>VuCLS</i>	Cardiolipina sintase	(s) 5' CCTTCTCCCGATTACTTTCC 3' (as) 5' GTATCCATCCAGCCAATCAG 3'	116 pb	--
<i>VuMGD1</i>	MGDG sintase	(s) 5' GTCCATCCACTGATGCAGCAC 3' (as) 5' TTGCGCAACATCTGTTGTAGG 3'	165 pb	DQ205521
<i>VuMGD2</i>	MGDG sintase	(s) 5' GTCCATCCACTGATGCAGCAC 3' (as) 5' ATTGACCCTTCACAAGAACC 3'	232 pb	EF466098
<i>VuDGD1</i>	DGDG sintase	(s) 5' GTAATTTGCAATGTTTCATGGTGT 3' (as) 5' TCTGAACTTCATTAGCATCCTCTC 3'	235 pb	DQ205523
<i>VuDGD2</i>	DGDG sintase	(s) 5' TGCACAGCCTACTAATGCTGAG 3' (as) 5' TGCAAGGTATGTGGAATAGCAC 3'	243 pb	EF466099
<i>VuFAD7</i>	$\omega$ 3 fatty acid desaturase 7	(s) 5' GCTTCAATCTTGAGTCTATGG 3' (as) 5' CCAACCTTGAGGAGCTGGAC 3'	119 pb	EU180596
<i>VuFAD8</i>	$\omega$ 3 fatty acid desaturase 8	(s) 5' ACCAGTTCTTGGTCAATATTACCG 3' (as) 5' CAGTGACTTCTCTCAGTCTTC 3'	213 pb	EU180595
<i>VuPAT1</i>	Patatin-like lipid acyl hydrolase	(s) 5' TTTGCTTGCTTTCCTCGAAT 3' (as) 5' CGGGAAGATTTTTGGGGTAT 3'	205 pb	AF318315
<i>VuPLD1</i>	Fosfolipase D	(s) 5' TCTGCCAACATCAACCAGAG 3' (as) 5' ATGCGGAAACCGTAGACTTG 3'	125 pb	U92656

Fonte : Elaborada pelo autor.

Os níveis de expressão de quatro potenciais genes de referência foram testados nas amostras correspondentes a todas as condições experimentais estudadas (Tabela 2). O gene *VuEF1- $\alpha$*  foi expresso constitutivamente em todas as condições e escolhido para interpretação dos resultados pelo programa GeNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

Tabela 2 - Genes de referência testados; produto gênico; sequências dos oligonucleotídeos específicos de *V. unguiculata* utilizados como iniciadores nas reações de qPCR; tamanho esperado dos fragmentos amplificados por reação de qPCR; N° de acesso no GenBank.

Gene de interesse	Produto gênico	Iniciador senso (s) e Iniciador antisenso (as)	Tamanho do fragmento amplificado	N° de acesso
<i>VuEF1-<math>\alpha</math></i>	Fator de alongamento da tradução	(s) 5' GTAACAAGATGGATGCCACC 3' (as) 5' CCACTTTCTTCAAATACGAGGAG 3'	90 pb	GH621148
<i>VuACTIN1</i>	Actina	(s) 5' CTCAGCAGAGCGTGAAATTG 3' (as) 5' TTGGATGTCTCCAGCTCTTG 3'	87 pb	FR839671
<i>VuS19</i>	Proteína ribossomal S19	(s) 5' ATTTGGTCACGGAGATCGAC 3' (as) 5' ATGACCCACTTTCCCTCAG 3'	111 pb	GH619001
<i>VuARN18S</i>	RNA da subunidade ribossomal 18S	(s) 5' AATGGTCCGGTGAAGTGTTTC 3' (as) 5' CCTACGGAAACCTTGTTACGAC 3'	122 pb	JF430412

Fonte : Elaborada pelo autor.

Os meios de reação de 20  $\mu$ L elaborados nos poços das placas contêm os seguintes elementos: 3  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O sem RNase, 3  $\mu$ L de iniciador senso 5 $\mu$ M, 3  $\mu$ L de iniciador antisenso 5 $\mu$ M, 10  $\mu$ L de *SYBR Green 2* $\times$  e 1  $\mu$ L de matriz cDNA diluída a 4 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> ou de H<sub>2</sub>O sem RNase (para o controle negativo).

As condições de amplificação (40 ciclos) foram as seguintes:

- 10 minutos a 95 °C (ativação da *Taq* polimerase)
- 15 segundos a 95 °C (fase de desnaturação)
- 30 segundos a 57-62 °C (hibridização dos iniciadores e do fluoróforo)
- 30 segundos a 72 °C (alongamento)
- 15 segundos a 95 °C
- 1 minuto a 60 °C
- 15 segundos a 95 °C

A curva-padrão foi testada. Ela representa os valores de Ct (número de ciclos após o qual a fluorescência atinge um valor limiar fixado pelo aparelho) em função do log das concentrações de moléculas-alvo fixadas, a partir de diluições seriadas de uma amostra padrão (aqui, cDNA de *Vigna unguiculata*). Com a curva-padrão, o Ct obtido de uma amostra de concentração desconhecida vai ser traduzido em concentração de moléculas-alvo.

No total, 18 placas foram utilizadas para as análises de qPCR: 9 placas reservadas para as amostras com 7 dias de tratamentos e 9 placas para as amostras com 14 dias de tratamentos. Sobre cada placa foram depositados os meios de reação correspondentes a 1 replicata biológica (das 3 replicatas obtidas para cada ponto experimental) em duplicata técnica, a três dos nove genes de interesse e ao gene de referência escolhido (*VuEF1- $\alpha$* ), ao cDNA calibrador (de concentração escolhida em testes anteriores de curva-padrão) e ao controle negativo (H<sub>2</sub>O sem RNase). Dos 96 poços presentes em cada placa, somente 80 foram utilizados (Figura 14).

Figura 14 - Visão simplificada da disposição das amostras em uma placa de qPCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Gene ref	A	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	cDNA calib	C <sub>H2O</sub>		
	B	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	cDNA calib	C <sub>H2O</sub>		
Gene 3/6/9	C	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	cDNA calib	C <sub>H2O</sub>		
	D	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	cDNA calib	C <sub>H2O</sub>		
Gene 2/5/8	E	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	cDNA calib	C <sub>H2O</sub>		
	F	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	cDNA calib	C <sub>H2O</sub>		
Gene 1/4/7	G	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	cDNA calib	C <sub>H2O</sub>		
	H	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	C 7/14 dias	S 7/14 dias	O 7/14 dias	OS 7/14 dias	cDNA calib	C <sub>H2O</sub>		
		EPACE				IT83							

Fonte: Confeccionado pelo autor. Legenda: O gene de referência, os genes de interesse e o calibrador foram analisados simultaneamente na mesma corrida. C-controle, S-seca, O-ozônio, OS-ozônio+seca.

Para o cálculo da expressão relativa (E.R.), os deltas ( $\Delta$ ) de  $C_t$  (do calibrador e da amostra) para o gene de interesse foram normalizados em relação aos  $\Delta$  de  $C_t$  para o gene de referência (*VuEF1- $\alpha$* ), de acordo com a fórmula abaixo:

$$E.R._{\text{calibrador}} = \frac{2^{(C_t_{\text{do calibrador}} - C_t_{\text{amostra}})} \text{ (para o gene de interesse)}}{2^{(C_t_{\text{do calibrador}} - C_t_{\text{amostra}})} \text{ (para o gene de referência)}}$$

E.R. = Expressão Relativa

$C_t$  = número de ciclos necessários para atingir o limiar de detecção

### 3.5.9 Análises estatísticas

Como descrito nas legendas das figuras apropriadas, os parâmetros foram medidos em 3 ou 4 plantas por tratamento, consideradas como repetições biológicas independentes. A cada ponto de tempo e para um dado cultivar, os dados provenientes dos diferentes tratamentos (controle, C; seca, S; ozônio, O; ozônio+seca, OS) foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Os sub-conjuntos homogêneos separados estão indicados por letras (ou símbolos) apropriados. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa R (R Core Team 2013).



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Respostas fisiológicas de plantas de *Vigna unguiculata* à seca e ao ozônio

As respostas fisiológicas de plantas de *Vigna unguiculata* à seca e ao ozônio, sozinhas ou em combinação, foram analisadas após 7 e 14 dias de tratamentos (Figuras 15 a 18).

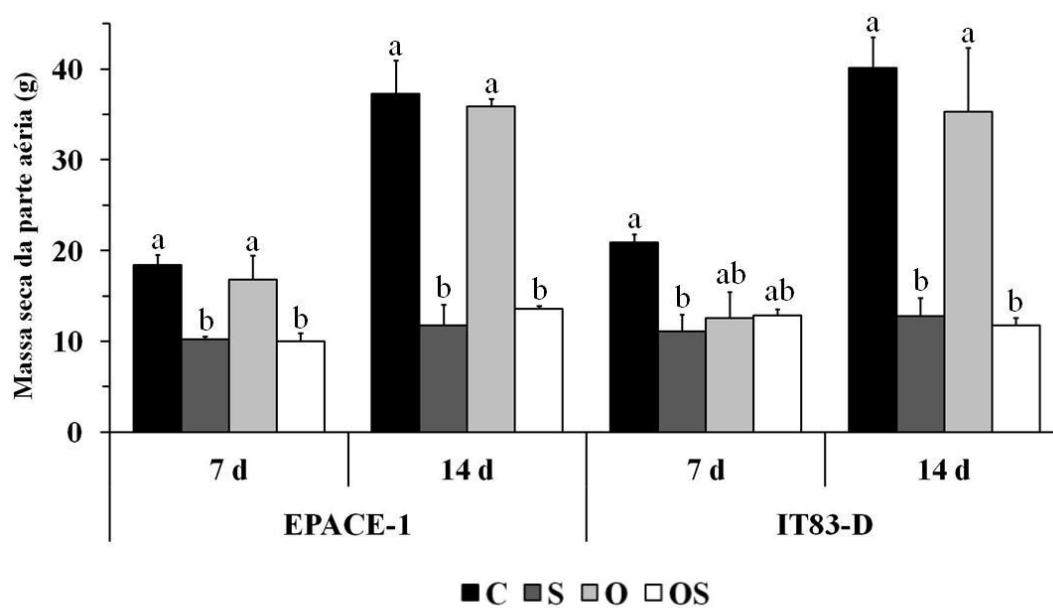
O tratamento seca, sozinha (S) ou combinada ao ozônio (OS), teve um efeito significativo nos dois cultivares de feijão-de-corda no âmbito da planta como um todo já com 7 dias. Nesse período, esses tratamentos reduziram a produção de biomassa, representada pela massa seca da parte aérea (MSPA), dos dois cultivares em aproximadamente 40%, comparado ao tratamento controle, e, após 14 dias, a diminuição foi em torno de 70%. Em IT83-D, uma redução de aproximadamente 40% da MSPA foi observada em resposta ao ozônio após 7 dias, comparado ao controle (Figura 15).

O teor relativo de água (TRA) dos dois cultivares de feijão-de-corda foi reduzido significativamente em torno de 20% após 14 dias de tratamento com seca isolada e combinada ao ozônio, quando comparado ao tratamento controle. Entretanto, o tratamento com ozônio não causou nenhum efeito significativo no TRA das plantas (Figura 16).

A capacidade fotossintética, também chamada de rendimento quântico máximo do PSII (expresso como  $F_v/F_m$ ), das folhas dos dois cultivares não foi afetada de maneira significativa pelos diferentes tratamentos (Figura 17a). Em revanche, a atividade fotossintética ( $\Phi_{PSII}$ ) nos dois cultivares foi reduzida significativamente em torno de 35% em resposta à seca sozinha ou combinada ao ozônio, após 14 dias, comparado ao controle (Figura 17b).

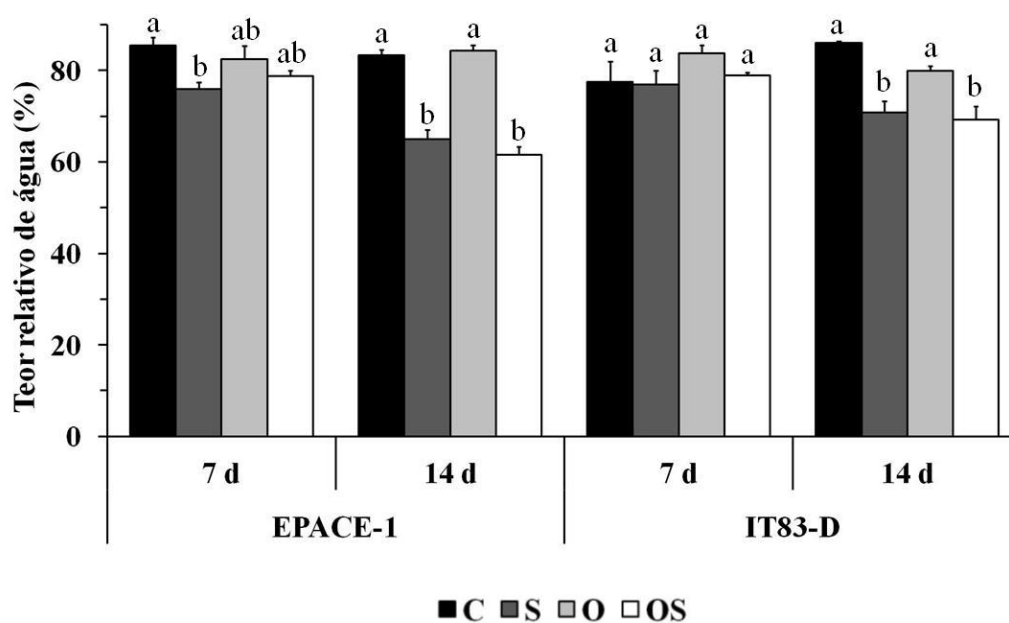
A condutância estomática ( $g_s$ ), em resposta aos tratamentos seca e seca+ozônio, foi reduzida significativamente em torno de 60% em EPACE-1 após 7 dias e aproximadamente 90% nos dois cultivares após 14 dias, comparado ao tratamento controle. Além disso, após 7 dias, a condutância estomática mostrou uma tendência à redução pelo tratamento com ozônio de 40 a 50% nos dois cultivares, comparado ao controle. No entanto, após 14 dias, esse tratamento causou uma tendência em reduzir a condutância estomática somente em EPACE-1, já que em IT83-D a condutância estomática das plantas submetidas ao ozônio estava tão alta quanto àquela das plantas do controle (Figura 18).

Figura 15 - Massa seca da parte aérea de plantas de *Vigna unguiculata* (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.



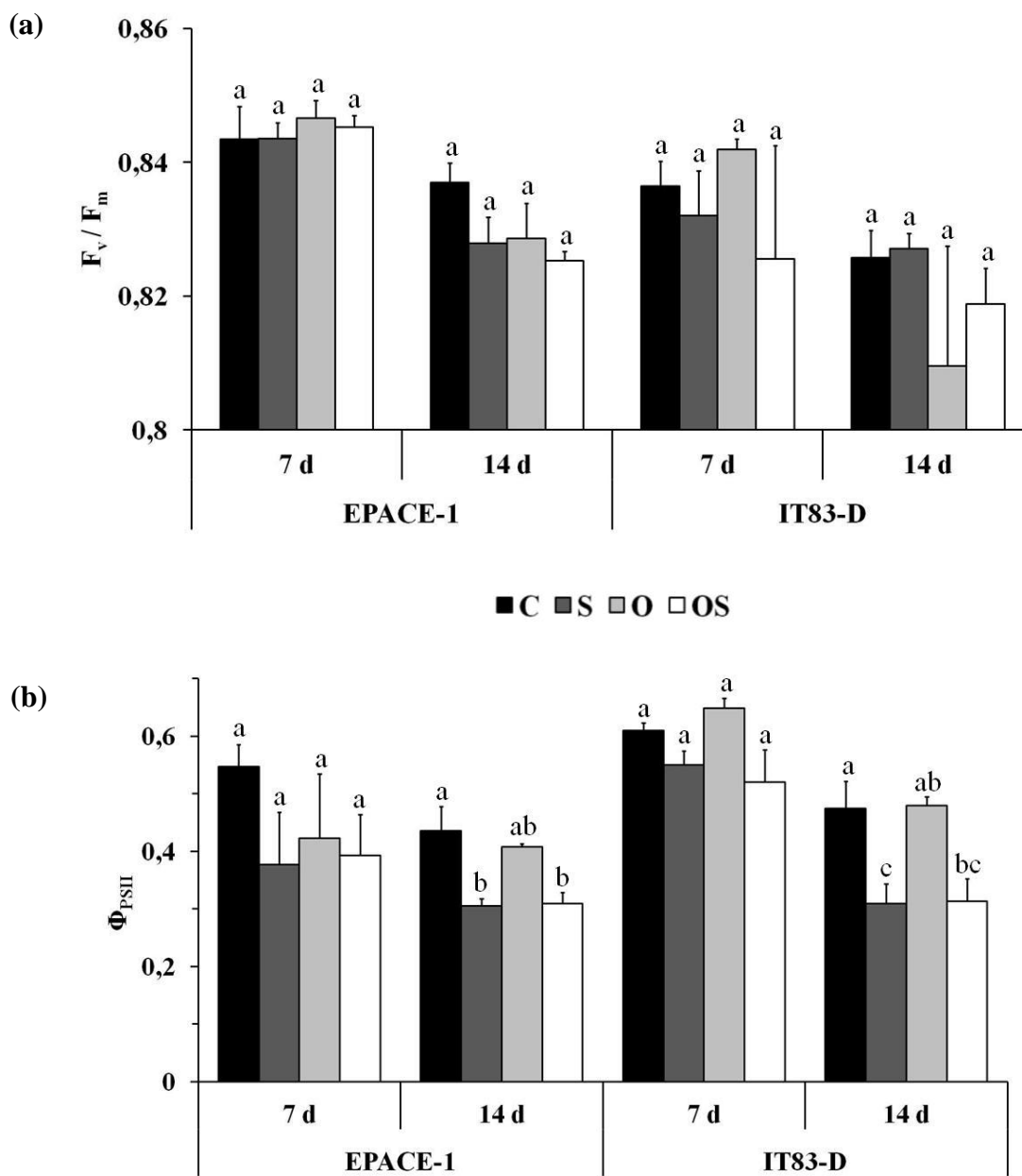
Fonte : Elaborada pelo autor. Legenda: controle (C, barras em preto), seca (S, barras em cinza escuro), ozônio (O, barras em cinza claro), ozônio + seca (OS, barras em branco). As medidas foram realizadas 7 e 14 dias após o início dos tratamentos. As médias  $\pm$  SEM estão indicadas ( $n = 3-4$ ). As letras indicam os sub-conjuntos homogêneos a cada ponto de tempo para um dado cultivar (ANOVA de sentido único e teste *post-hoc* de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

Figura 16 - Teor relativo de água de plantas de *Vigna unguiculata* (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.



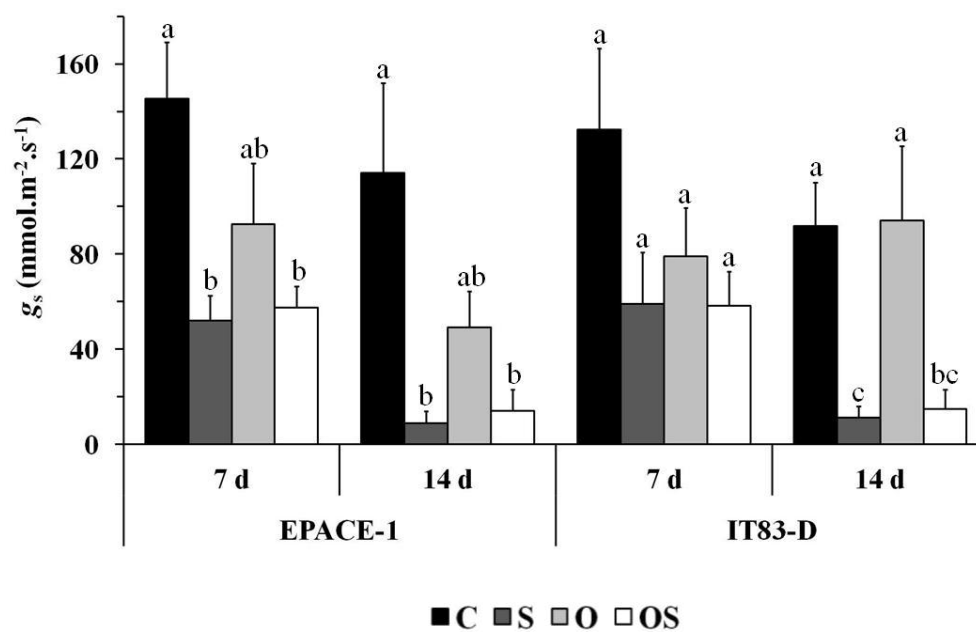
Fonte : Elaborada pelo autor. Legenda: controle (C, barras em preto), seca (S, barras em cinza escuro), ozônio (O, barras em cinza claro), ozônio + seca (OS, barras em branco). As medidas foram realizadas 7 e 14 dias após o início dos tratamentos. As médias  $\pm$  SEM estão indicadas (n = 3-4). As letras indicam os sub-conjuntos homogêneos a cada ponto de tempo para um dado cultivar (ANOVA de sentido único e teste *post-hoc* de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

Figura 17 - (a). Rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) e (b). Rendimento máximo do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) de plantas de *Vigna unguiculata* (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.



Fonte : Elaborada pelo autor. Legenda: controle (C, barras em preto), seca (S, barras em cinza escuro), ozônio (O, barras em cinza claro), ozônio + seca (OS, barras em branco). As medidas foram realizadas 7 e 14 dias após o início dos tratamentos. As médias  $\pm$  SEM estão indicadas ( $n = 3-4$ ). As letras indicam os sub-conjuntos homogêneos a cada ponto de tempo para um dado cultivar (ANOVA de sentido único e teste *post-hoc* de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

Figura 18 - Condutância estomática ( $g_s$ ) de plantas de *Vigna unguiculata* (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.



Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: controle (C, barras em preto), seca (S, barras em cinza escuro), ozônio (O, barras em cinza claro), ozônio + seca (OS, barras em branco). As medidas foram realizadas 7 e 14 dias após o início dos tratamentos. As médias  $\pm$  SEM estão indicadas ( $n = 3-4$ ). As letras indicam os sub-conjuntos homogêneos a cada ponto de tempo para um dado cultivar (ANOVA de sentido único e teste *post-hoc* de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

## **4.2 Índices de exposição ao ozônio e de dose de ozônio, lesões foliares e acumulação de peróxido de hidrogênio nas folhas**

Ao longo dos 14 dias de tratamentos, a concentração de ozônio (média durante 12 h de fumigação), bem como o índice de exposição ao ozônio (AOT40; concentrações de ozônio acumuladas acima de um limiar de 40 ppb) foram analisados em quatro câmaras de fumigação e a dose fitotóxica de ozônio (POD<sub>0</sub>; expresso como fluxo estomático de ozônio acumulado) foi também calculada (Tabela 3).

As plantas dos dois cultivares, EPACE-1 e IT83-D, submetidas aos tratamentos com ozônio sozinho e combinado à seca, foram expostas a uma concentração média de 12h de ozônio de 130,4 ppb. No final do período de fumigação, o índice de exposição ao ozônio dessas plantas, AOT40, fundamentado sobre as concentrações de ozônio, atingiu um valor de 16,7 ppm h em média (Tabela 3).

Após 14 dias de tratamento com ozônio isolado, a absorção estomática de ozônio, POD<sub>0</sub>, foi de 3,8 mmol.m<sup>-2</sup> em EPACE-1 e de 4,6 mmol.m<sup>-2</sup> em IT83-D. Quando se compara os valores de POD<sub>0</sub> de plantas expostas ao tratamento combinado com àqueles de plantas expostas ao ozônio isolado, uma diminuição de 23,7% (de 3,8 mmol.m<sup>-2</sup> para 2,9 mmol.m<sup>-2</sup>) em EPACE-1 e de 32,6% (de 4,6 mmol.m<sup>-2</sup> para 3,1 mmol.m<sup>-2</sup>) em IT83-D foi observada (Tabela 3).

A perda do aspecto brilhante das folhas, sintomas visíveis de lesões sob a forma de manchas marrons-escuras na face superior das folhas, bem como sintomas de acumulação de peróxido de hidrogênio, constatados pela coloração por DAB nos discos foliares coletados após 14 dias, foram analisados nos dois cultivares. Esses sintomas foram observados principalmente nas plantas submetidas ao tratamento com ozônio, com uma maior extensão em IT83-D que em EPACE-1. A amplitude da lesão foliar foi muito menos significativa nas plantas do tratamento combinado que nas plantas tratadas com ozônio isolado. Além disso, o peróxido de hidrogênio não pôde ser detectado nas folhas submetidas ao tratamento combinado (Figura 19).

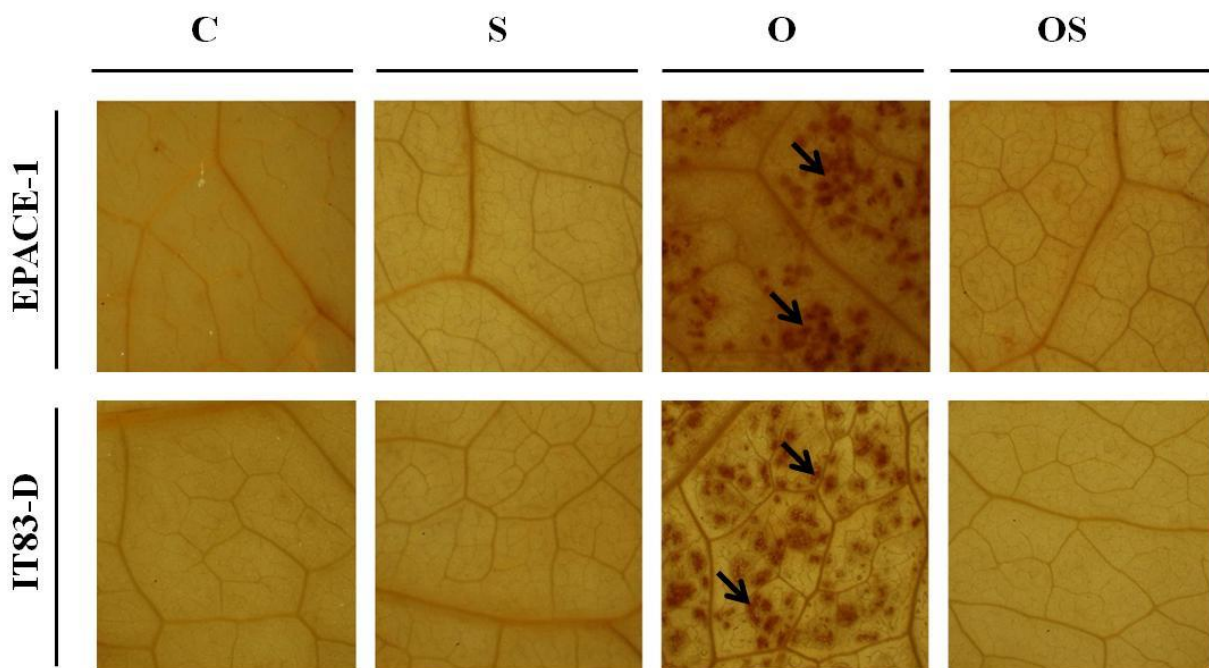
As plantas dos dois cultivares submetidas aos tratamentos controle e seca foram expostas ao ar de carbono filtrado e portanto nem lesões necróticas visíveis sobre as folhas nem acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puderam ser observados (Figura 19).

Tabela 3 - Média de 12 horas de concentração de ozônio, índice de exposição ao ozônio (AOT40, concentrações de ozônio acumuladas acima de um limiar de 40 ppb) e absorção estomática (POD<sub>0</sub>, dose fitotóxica de ozônio expressa como fluxo estomático de ozônio acumulado), onde as plantas de feijão-de-corda (cultivares EPACE-1 e IT83-D) foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle (C), seca (S), ozônio (O), ozônio + seca (OS).

<b>Cultivar</b>	<b>Tratamento</b>	<b>[O<sub>3</sub>] (Média 12h) (ppb)</b>	<b>AOT40 (ppm h)</b>	<b>POD<sub>0</sub> (mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>)</b>
<b>EPACE-1</b>	<b>C</b>	-	-	-
	<b>S</b>	-	-	-
	<b>O</b>	130,4 ± 5,2	16,7 ± 1,0	3,8 ± 0,7
	<b>OS</b>	130,4 ± 5,2	16,7 ± 1,0	2,9 ± 0,5
<b>IT83-D</b>	<b>C</b>	-	-	-
	<b>S</b>	-	-	-
	<b>O</b>	130,4 ± 5,2	16,7 ± 1,0	4,6 ± 1,2
	<b>OS</b>	130,4 ± 5,2	16,7 ± 1,0	3,1 ± 1,4

Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: As médias ± desvio-padrão estão indicadas (n = 4). A concentração de ozônio e o AOT40 foram calculados a partir dos valores registrados em 4 câmaras idênticas. A absorção estomática de ozônio (POD<sub>0</sub>) foi calculada a partir de 4 replicatas biológicas. As plantas do controle (C) e da seca (S) foram alimentadas em ar filtrado de carbono ativado e as concentrações de ozônio foram próximas de zero.

Figura 19 - Detecção de peróxido de hidrogênio com uma coloração de DAB nas folhas de *Vigna unguiculata* (cultivares EPACE-1 e IT83-D) expostas aos seguintes tratamentos: controle (C), seca (S), ozônio (O), ozônio + seca (OS).



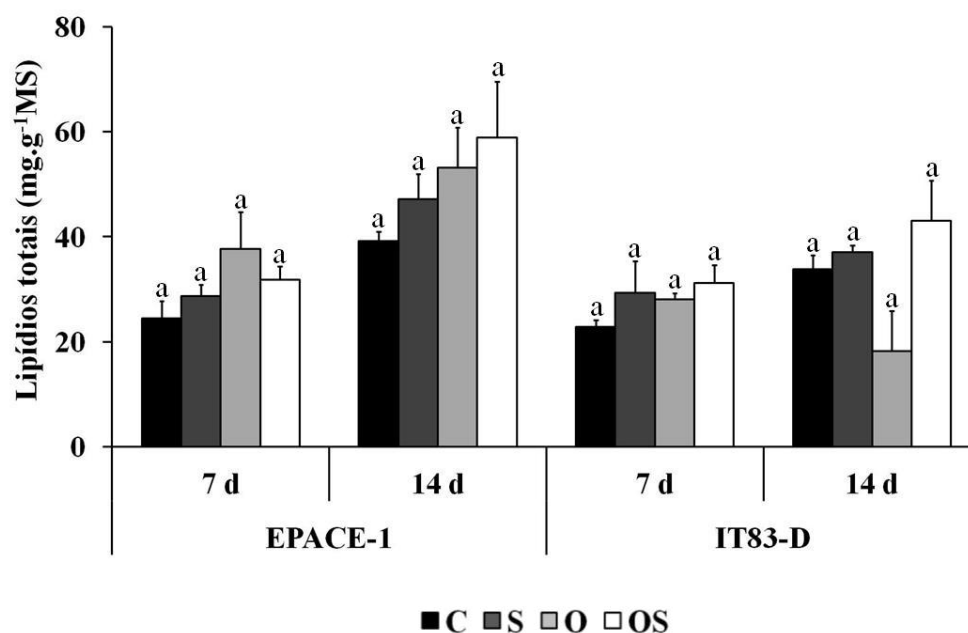
Fonte: Fotografias tiradas pelo autor. Legenda: Os discos foliares foram recolhidos e coloridos após 14 dias de tratamento. As fotos são representativas de três repetições biológicas independentes. As setas pretas indicam as manchas em marrom-escuro causadas pela acumulação de peróxido de hidrogênio. Nenhuma marcação específica foi observada nas folhas do controle tratadas com o ácido ascórbico (dados não apresentados). DAB: 3,3'-diaminobenzidina.



### 4.3 Teor de lipídios totais nas folhas de feijão-de-corda

Os teores de lipídios totais de folhas de plantas de feijão-de-corda (cultivares EPACE-1 e IT83-D) em resposta aos diferentes tratamentos foram medidos. Nos dois cultivares, nenhuma modificação significativa foi observada em resposta aos tratamentos em comparação ao controle nem após 7 nem após 14 dias. No entanto, após 14 dias, as plantas do cultivar EPACE-1 mostraram uma tendência em aumentar em torno de 35% seu teor de lipídios totais em resposta ao ozônio, enquanto que as plantas do cultivar IT83-D mostraram uma tendência à redução de aproximadamente 45%, comparado ao controle (Figura 20).

Figura 20 - Teor de lipídios totais de folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.



Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: controle (C, barras em preto), seca (S, barras em cinza escuro), ozônio (O, barras em cinza claro), ozônio + seca (OS, barras em branco). As medidas foram realizadas 7 e 14 dias após o início dos tratamentos. As médias  $\pm$  SEM estão indicadas ( $n = 3$ ). As letras indicam os sub-conjuntos homogêneos a cada ponto de tempo para um dado cultivar (ANOVA de sentido único e teste *post-hoc* de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

#### 4.4 Composição em ácidos graxos dos lipídios totais

Alterações no total dos teores de ácidos graxos dos lipídios totais das folhas foram analisadas nos dois cultivares em resposta aos estresses de seca e de ozônio, isolados ou em combinação (Tabela 4).

O ácido graxo 18:3 foi o mais abundante nas folhas de *Vigna unguiculata*, representando em torno de 80% dos ácidos graxos totais. Interessantemente, quando se compara as plantas EPACE-1 após 7 dias para 14 dias em todos os tratamentos, é possível observar uma diminuição acentuada da proporção de 18:3 (que passou de aproximadamente 80% para em torno de 50%) com o tempo, enquanto que o teor de 18:0 mostra um aumento na proporção (que passou de aproximadamente 1% para em torno de 30%). Após 14 dias, as plantas EPACE-1 tratadas com seca isolada ou em combinação com o ozônio mostraram uma diminuição nas proporções do ácido graxo insaturado 18:1, que passou de aproximadamente 1% nas plantas controle para em torno de 0,3% nas plantas tratadas. No cultivar IT83-D, esses tratamentos causaram uma redução das proporções do ácido graxo saturado 18:0 no mesmo período, comparado ao controle. O tratamento com ozônio causou uma redução do ácido graxo insaturado 18:3 (que passou de 84% para 75%), compensada pelo aumento da proporção do ácido graxo saturado 16:0 (que passou de 8% para 15%) (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição em ácidos graxos dos lipídios totais nas folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle (C), seca (S), ozônio (O), ozônio + seca (OS).

<b>AGT</b>							
<b>Cultivar</b>	<b>Tempo (d)</b>	<b>Tratamento</b>	<b>%16:0</b>	<b>%18:0</b>	<b>%18:1</b>	<b>%18:2</b>	<b>%18:3</b>
<b>EPACE-1</b>	<b>7</b>	<b>C</b>	8,0	0,7	0,3	3,5	87,6
		<b>S</b>	8,1	1,0	0,2	4,2	86,5
		<b>O</b>	8,1	0,9	0,2	4,3	86,6
		<b>OS</b>	8,9	1,1	0,3	5,0	84,8
	<b>14</b>	<b>C</b>	6,4	36,1	1,0	3,6	52,9
		<b>S</b>	6,0	35,8	0,3	2,6	55,3
		<b>O</b>	5,9	36,7	0,6	3,2	53,5
		<b>OS</b>	5,2	36,7	0,3	2,7	55,1
<b>IT83-D</b>	<b>7</b>	<b>C</b>	8,8	1,2	0,3	4,1	85,6
		<b>S</b>	9,1	1,2	0,5	4,2	85,0
		<b>O</b>	8,6	1,1	0,5	4,4	85,4
		<b>OS</b>	7,9	1,1	0,2	4,1	86,7
	<b>14</b>	<b>C</b>	8,3	3,2	0,6	3,9	84,0
		<b>S</b>	8,5	1,3	0,4	4,4	85,4
		<b>O</b>	15,0	3,9	0,5	5,4	75,2
		<b>OS</b>	7,7	1,3	0,3	4,2	86,6

Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: Os valores são expressos em porcentagem do teor total de ácidos graxos a partir de três repetições biológicas independentes (ANOVA de sentido único e teste *post-hoc* de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ). AGT, ácidos graxos totais; 16:0, ácido hexadecanóico; 18:0, ácido octadecanóico; 18:1, ácido-9-octadecanóico; 18:2, ácido-9,12-octadecadienóico; 18:3, ácido-9,12,15-octadecatrienóico.

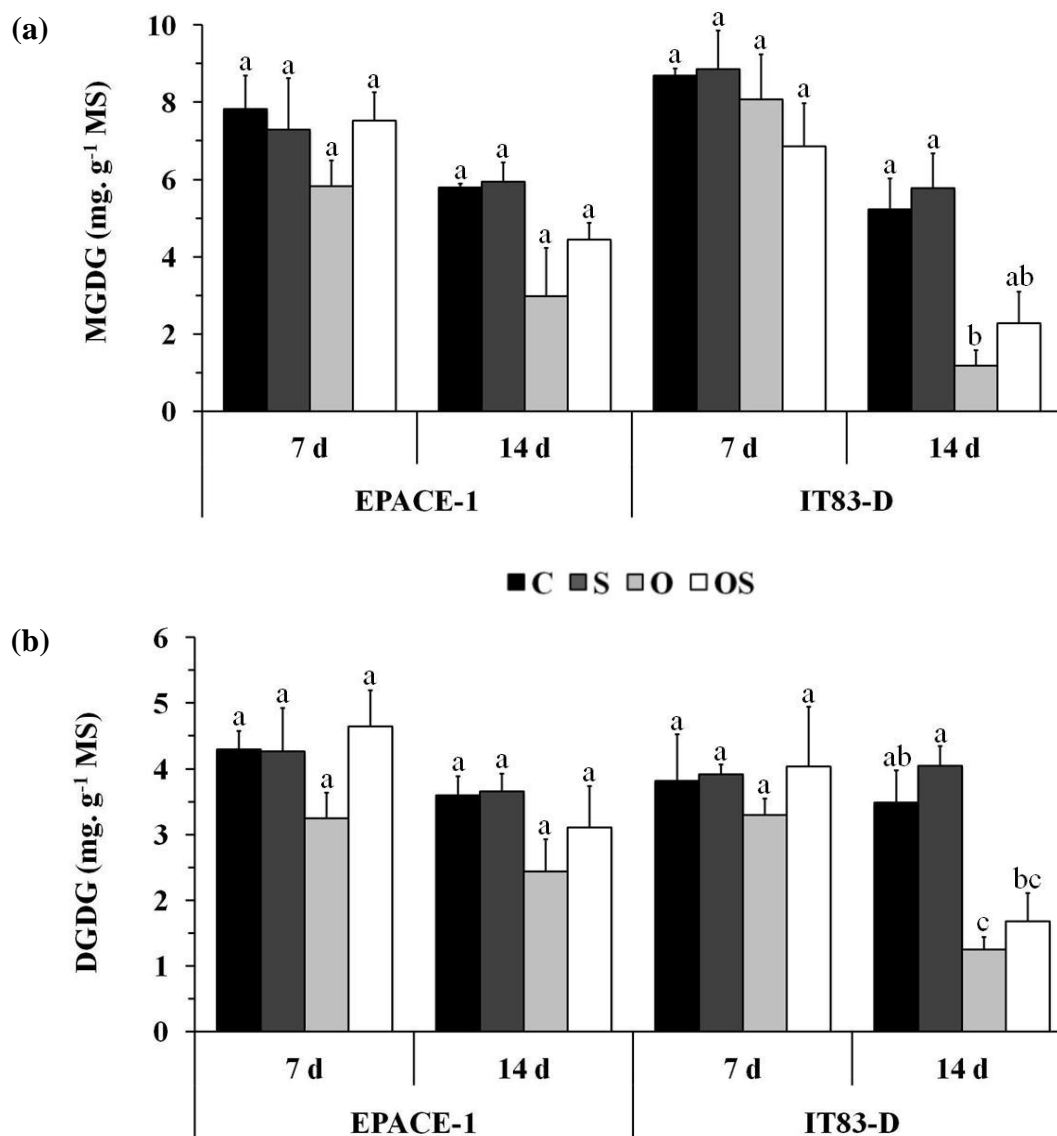
#### 4.5 Teor de galactolipídios nas folhas de feijão-de-corda

Os teores dos galactolipídios monogalactosil-diacilglicerol (MGDG) e digalactosil-diacilglicerol (DGDG), as classes de lipídios dominantes nos tecidos das folhas de feijão-de-corda, foram analisadas em resposta aos diferentes tratamentos (Figura 21).

O tratamento de seca não teve nenhum efeito significativo sobre o teor de MGDG, enquanto que o tratamento com ozônio causou uma redução de seu teor nos dois cultivares. Após 7 dias, o teor de MGDG já começou a mostrar uma tendência à diminuição nos dois cultivares em resposta ao ozônio. Após 14 dias, as reduções foram mais acentuadas: o teor desse galactolipídio foi reduzido 48% em EPACE-1 e 77% (significativamente) em IT83-D, comparado ao controle. Em resposta ao tratamento de ozônio e seca combinados, a diminuição do teor de MGDG é menos importante que àquela resultante do tratamento com ozônio isolado nos dois cultivares: após 14 dias de tratamento, o teor de MGDG foi reduzido 25% em EPACE-1 e 53% em IT83-D, em comparação ao controle (Figura 21a).

O teor de DGDG mostrou um perfil similar ao de MGDG em resposta aos tratamentos, porém com reduções em menor extensão. Da mesma maneira, a seca não teve efeito sobre o teor de DGDG. No entanto, após 14 dias, o ozônio causou uma redução de 32% (não significativa) em EPACE-1 e de 64% (significativa) em IT83-D, comparado ao controle. O tratamento combinado, no mesmo período, causou uma tendência à redução do teor de DGDG de 17% em EPACE-1 e de 50% em IT83-D, comparado ao controle (Figura 21b).

Figura 21 - Teor de MGDG (a) e de DGDG (b) nas folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.



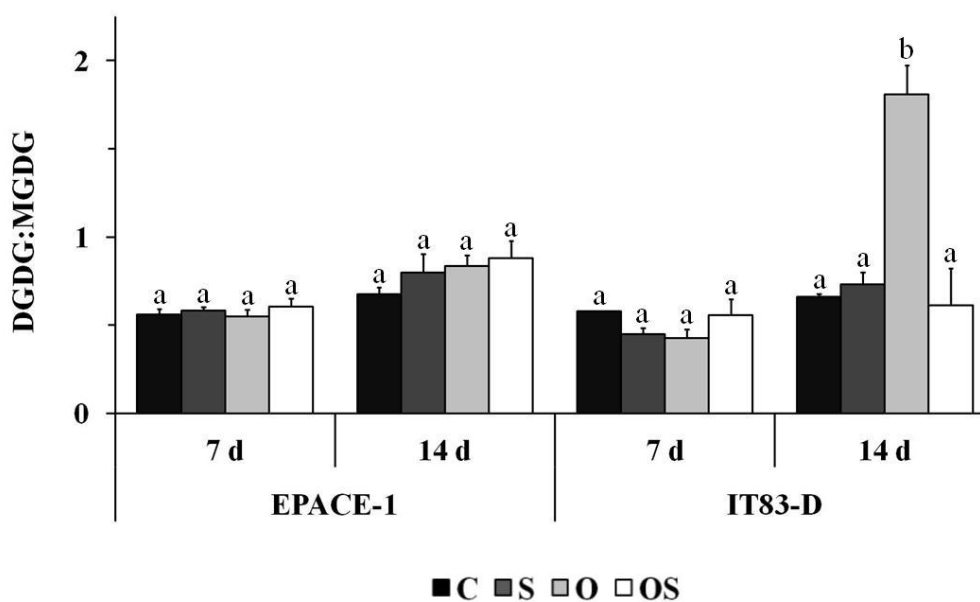
Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: controle (C, barras em preto), seca (S, barras em cinza escuro), ozônio (O, barras em cinza claro), ozônio + seca (OS, barras em branco). As medidas foram realizadas 7 e 14 dias após o início dos tratamentos. As médias  $\pm$  SEM estão indicadas ( $n = 3$ ). As letras indicam os sub-conjuntos homogêneos a cada ponto de tempo para um dado cultivar (ANOVA de sentido único e teste *post-hoc* de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ). MGDG, monogalactosil-diacilglicerol; DGDG, digalactosil-diacilglicerol.

#### 4.6 Relação DGDG:MGDG

A relação dos teores de DGDG sobre os teores de MGDG nas folhas de feijão-de-corda foi calculada a partir dos resultados da figura 21 afim de expressar o efeito dos tratamentos sobre a quantidade relativa desses galactolipídios nos dois cultivares (Figura 22).

No cultivar EPACE-1, nenhuma modificação na relação DGDG:MGDG pôde ser observada em resposta aos diferentes tratamentos após 7 ou 14 dias. No entanto, em IT83-D, a relação DGDG:MGDG aumentou significativamente 200% em resposta ao ozônio após 14 dias, quando comparada ao controle. Os outros tratamentos não causaram efeito significativo nesse cultivar (Figura 22).

Figura 22 - Relação DGDG:MGDG nas folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.



Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: controle (C, barras em preto), seca (S, barras em cinza escuro), ozônio (O, barras em cinza claro), ozônio + seca (OS, barras em branco). As medidas foram realizadas 7 e 14 dias após o início dos tratamentos. As médias  $\pm$  SEM estão indicadas ( $n = 3$ ). As letras indicam os sub-conjuntos homogêneos a cada ponto de tempo para um dado cultivar (ANOVA de sentido único e teste *post-hoc* de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ). MGDG, monogalactosil-diacilglicerol; DGDG, digalactosil-diacilglicerol.

#### 4.7 Composição em ácidos graxos dos galactolipídios

A composição em ácidos graxos dos galactolipídios MGDG e DGDG foi analisada em resposta aos diferentes tratamentos (Tabela 5). Nos dois cultivares, o ácido graxo poliinsaturado 18:3 foi o predominante na composição de ácidos graxos do MGDG (em torno de 95%) e do DGDG (em torno de 88%) dos cloroplastos das folhas (Tabela 5a, b).

A composição em ácidos graxos do MGDG, componente majoritário das membranas do cloroplasto, foi modificada principalmente pelo tratamento com ozônio nos dois cultivares. Em EPACE-1, uma leve diminuição foi observada na proporção de 18:3, que passou de 96,4% nas plantas controle para 94,2% nas plantas tratadas com ozônio após 14 dias. Essa diminuição foi compensada por um aumento de 16:0 de 1,6% no controle para 2,3% em resposta ao ozônio. Em IT83-D, o tratamento de 14 dias com ozônio causou uma redução significativa da proporção de 18:3 em MGDG, que diminuiu de 95,5% no controle para 81,6% no tratamento. Essa diminuição induzida pelo ozônio na porcentagem de 18:3 foi compensada pelo aumento de outros ácidos graxos em MGDG, principalmente os ácidos graxos saturados 16:0 (que passou de 1,9% para 6,4%) e 18:0 (que passou de 1,2% para 7,7%) (Tabela 5a). Em relação ao DGDG, a composição em ácidos graxos permaneceu estável durante os tratamentos nos dois cultivares (Tabela 5b).

Tabela 5 - Composição em ácidos graxos de MGDG (a) e de DGDG (b) nas folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle (C), seca (S), ozônio (O), ozônio + seca (OS).

## (a) MGDG

Cultivar	Tempo (d)	Tratamento	%16:0	%18:0	%18:1	%18:2	%18:3
EPACE-1	7	C	1,5	0,8	0,1	1,2	96,3
		S	1,4	1,0	0,1	1,2	96,3
		O	1,9	1,6	0,2	1,2	95,2
		OS	1,5	1,2	0,2	1,2	95,8
	14	C	1,6	0,8	0,2	1,0	96,4
		S	1,3	1,2	0,2	1,4	95,9
		O	<b>2,3</b>	1,7	0,3	1,5	<b>94,2</b>
		OS	1,2	1,2	0,3	1,4	96,0
IT83-D	7	C	1,6	1,3	0,2	1,6	95,3
		S	1,7	1,2	0,2	1,4	95,5
		O	1,2	0,6	0,1	1,4	96,7
		OS	0,9	0,6	0,1	1,3	97,0
	14	C	1,9	1,2	0,3	1,2	95,5
		S	1,7	<b>2,0</b>	0,3	1,6	94,5
		O	<b>6,4</b>	<b>7,7</b>	<b>1,1</b>	<b>3,1</b>	<b>81,6</b>
		OS	<b>2,1</b>	<b>2,4</b>	<b>0,4</b>	<b>1,8</b>	<b>93,4</b>

## (b) DGDG

Cultivar	Tempo (d)	Tratamento	%16:0	%18:0	%18:1	%18:2	%18:3
EPACE-1	7	C	7,3	1,7	0,2	1,0	89,8
		S	8,1	2,4	0,3	1,1	88,1
		O	7,7	2,9	0,4	1,1	87,9
		OS	8,8	2,8	0,3	1,2	86,9
	14	C	7,7	2,2	0,3	1,1	88,7
		S	6,9	2,8	0,3	1,3	88,7
		O	8,1	2,7	0,5	1,2	87,6
		OS	10,5	4,1	0,4	1,4	83,7
IT83-D	7	C	8,6	2,1	0,3	1,2	87,8
		S	3,7	1,9	0,7	2,1	91,7
		O	8,0	1,5	0,2	1,0	89,3
		OS	6,8	1,6	0,4	1,1	90,1
	14	C	8,1	4,0	0,5	1,5	85,9
		S	6,5	3,5	0,4	1,4	88,2
		O	7,2	6,3	1,0	2,0	83,5
		OS	7,8	4,7	0,6	1,6	85,2

Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: Os valores são expressos em porcentagem do teor total de ácidos graxos a partir de três repetições biológicas independentes. Os dados em negrito pertencem a sub-conjuntos que se fundem parcialmente ao conjunto de dados de base, os dados em negrito com fundo cinza pertencem aos sub-conjuntos estritamente distintos (ANOVA de sentido único e teste *post-hoc* de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ). MGDG, monogalactosil-



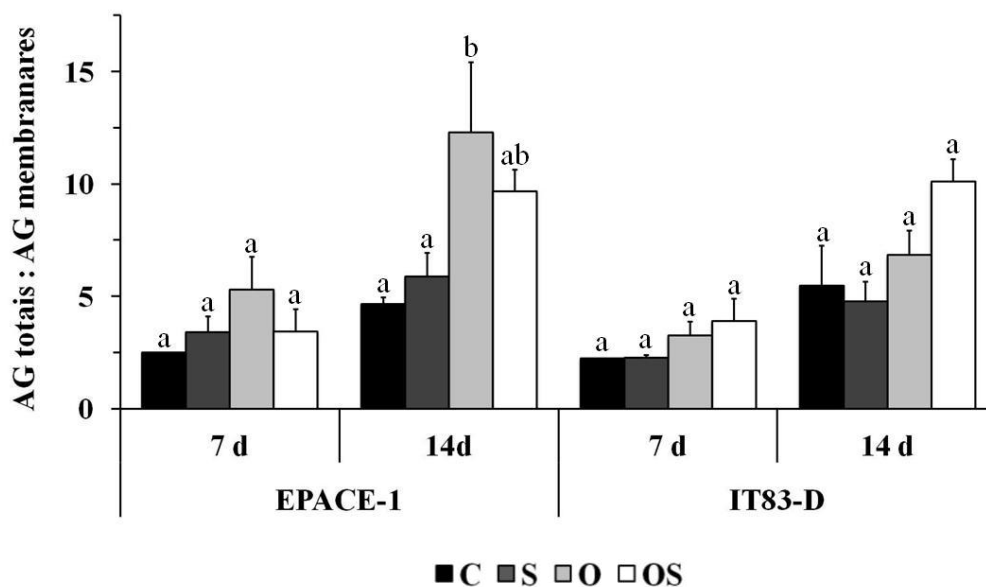
diacilglicerol; DGDG, digalactosil-diacilglicérol; 16:0, acide hexadecanóico; 18:0, ácido octadecanóico; 18:1, ácido-9-octadecanóico; 18:2, ácido-9,12-octadecadienóico; 18:3, ácido-9,12,15-octadecatrienóico.

#### **4.8 Proporção de lipídios neutros nas folhas de feijão-de-corda**

A relação do total de ácidos graxos sobre os ácidos graxos da membrana lipídica foi utilizada como um meio de estimar a proporção de lipídios neutros, principalmente de di- e triacilglicerol, em relação àquela dos lipídios polares (principalmente de galactolipídios) nos tecidos foliares de plantas de feijão-de-corda em resposta aos diferentes tratamentos (Figura 23).

No cultivar EPACE-1, a relação ácidos graxos totais : ácidos graxos de membrana aumentou significativamente 167% em resposta à exposição ao ozônio e tendeu a aumentar 108,7% em resposta ao tratamento combinado seca+ozônio, quando comparada ao tratamento controle, após 14 dias. Em IT83-D, os diferentes tratamentos não tiveram efeito significativo sobre essa relação. Entretanto, uma tendência a aumento de aproximadamente 90% foi observada após 14 dias de exposição ao ozônio e à seca em combinação, comparado ao controle. Essa tendência já começa a partir da primeira semana de tratamento combinado, de aproximadamente 70% (Figura 23).

Figura 23 - Relação AG totais : AG membranares nas folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.



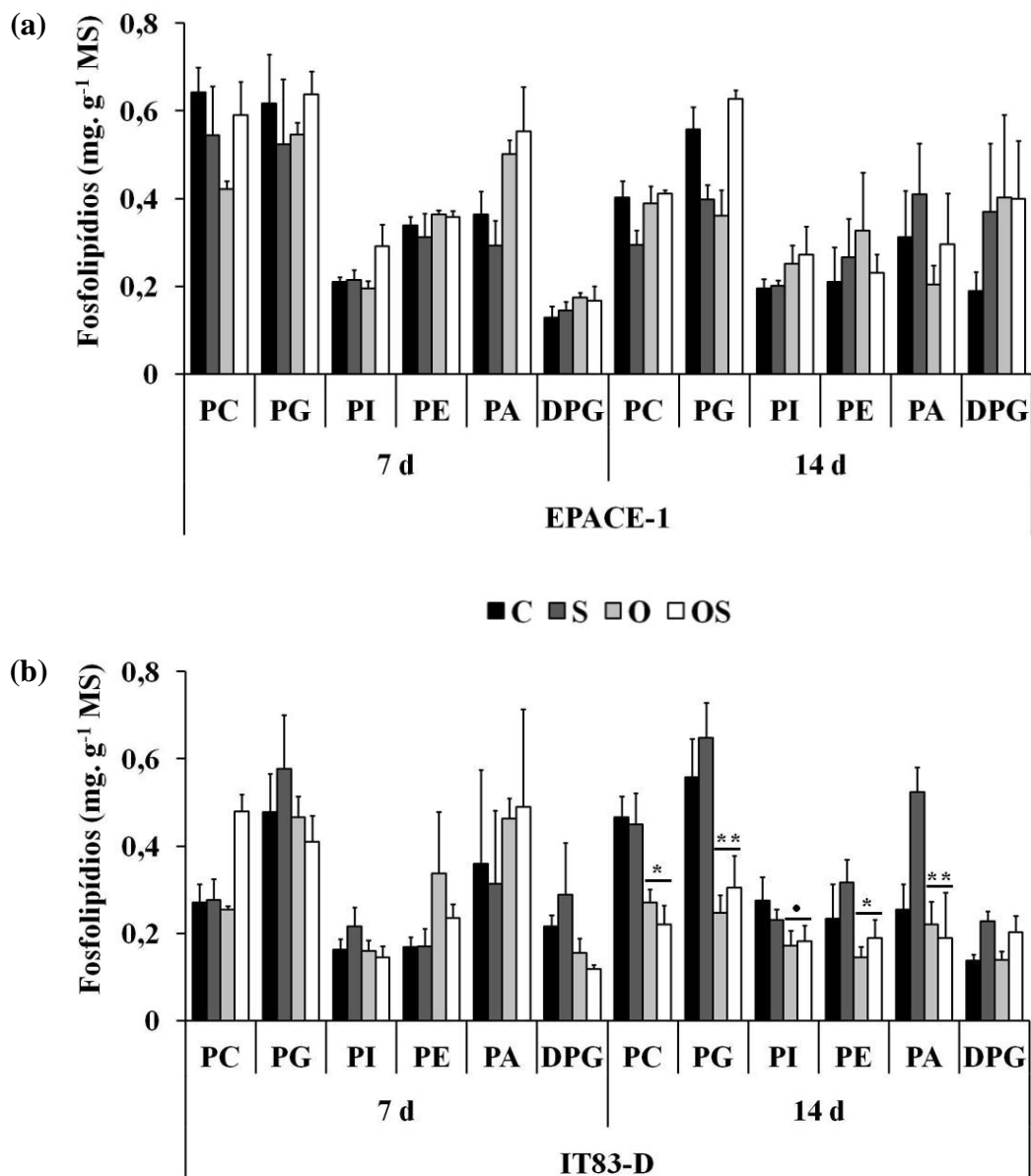
Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: controle (C, barras em preto), seca (S, barras em cinza escuro), ozônio (O, barras em cinza claro), ozônio + seca (OS, barras em branco). As medidas foram realizadas 7 e 14 dias após o início dos tratamentos. As médias  $\pm$  SEM estão indicadas ( $n = 3$ ). As letras indicam os sub-conjuntos homogêneos a cada ponto de tempo para um dado cultivar (ANOVA de sentido único e teste *post-hoc* de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ). AG, ácidos graxos.

#### **4.9 Teor de fosfolipídios nas folhas de feijão-de-corda**

Os teores de fosfolipídios nas plantas EPACE e IT83-D em resposta aos diferentes tratamentos foram analisados (Figura 24). Nos dois cultivares, PC e PG foram os principais fosfolipídios das membranas celulares da folha, mesmo se IT83-D mostrou um teor relativamente elevado de PA nas folhas do controle após 7 dias (Figura 24a, b).

Em EPACE-1, os diferentes tratamentos não causaram efeito significativo sobre os fosfolipídios de membrana PC, PG, PI, PE e PA. Entretanto, os três tratamentos (seca, ozônio e ozônio+seca) causaram uma tendência ao aumento de aproximadamente 110% dos níveis de DPG de folhas de EPACE-1 após 14 dias, comparado ao tratamento controle (Figura 24a). Em IT83-D, a abundância dos fosfolipídios não foi afetada de maneira significativa após 7 dias. No entanto, após 14 dias, o tratamento com ozônio causou uma redução significativa do teor de PC de aproximadamente 40%, de PG de aproximadamente 55%, de PI e de PE de aproximadamente 40% e de PA de aproximadamente 15%, comparado ao controle. Além disso, o tratamento com ozônio combinado à seca causou uma diminuição significativa do teor desses fosfolipídios: de aproximadamente 50% em PC e em PG, de aproximadamente 35% em PI, de aproximadamente 20% em PE e de aproximadamente 25% em PA. O teor de DPG não modificou em resposta ao ozônio, mas aumentou em torno de 65% em resposta à seca e em torno de 50% em resposta ao tratamento combinado ozônio+seca, após 14 dias, em comparação ao controle (Figura 24a).

Figura 24 - Teor de fosfolipídios nas folhas de plantas EPACE-1 (a) e IT83-D (b) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.



Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: controle (C, barras em preto), seca (S, barras em cinza escuro), ozônio (O, barras em cinza claro), ozônio + seca (OS, barras em branco). As medidas foram realizadas 7 e 14 dias após o início dos tratamentos. As médias  $\pm$  SEM estão indicadas ( $n = 3$ ). Os símbolos indicam a importância do efeito de exposição ao ozônio como indicado pela análise de variância multivariada (MANOVA) do conjunto de dados ( $\bullet p < 0,1$ ;  $* p < 0,05$ ;  $** p < 0,01$ ). PC, fosfatidilcolina; PG, fosfatidilglicerol; PI, fosfatidilinositol; PE, fosfatidiletanolamina; PA, ácido fosfatídico; DPG, difosfatidilglicerol.

#### 4.10 Composição em ácidos graxos dos fosfolipídios

A composição em ácidos graxos dos fosfolipídios PC, PG, PE, PI, PA e DPG foi analisada em resposta aos diferentes tratamentos (Tabela 6). Nas folhas do controle, os ácidos graxos mais abundantes nos fosfolipídios foram o 16:0 e o 18:3, bem como o 18:0 em DPG (Tabela 4a, b, c, d, e, f).

Em relação ao PC, a proporção dos ácidos graxos saturados 16:0 e 18:0 aumentou em resposta à seca isolada e combinada ao ozônio após 14 dias no cultivar tolerante EPACE-1, em comparação ao controle. Em IT83-D, os tratamentos com ozônio isolado e combinado à seca causaram uma redução dos ácidos graxos saturados, que foi compensada por um aumento dos ácidos graxos insaturados 18:2 e 18:3, após 7 dias, comparado ao controle (Tabela 6a).

Em EPACE-1, os tratamentos seca e ozônio+seca induziram uma redução da proporção de 18:3 de PG após 7 dias e um aumento após 14 dias, quando se compara ao tratamento controle. Essa redução em 18:3 observada após 7 dias foi ponderada pelo aumento das proporções dos ácidos graxos saturados. Em IT83-D, nenhuma modificação na proporção dos ácidos graxos de PG foi observada (Tabela 6b).

O tratamento de seca causou um aumento de 18:3 em PI, com uma redução dos ácidos graxos saturados, comparado ao controle, em EPACE-1, após 7 dias, enquanto que a situação inversa foi encontrada após 14 dias de tratamentos. Em IT83-D, esse tratamento causou um incremento na porcentagem de 18:0 em PI (Tabela 6c).

Em PE, o tratamento combinado reduziu a proporção de 18:3, aumentando a porcentagem de 16:0, comparado ao controle, após 7 dias, em EPACE-1. Após 14 dias, o ozônio aumentou a proporção de 18:3 ao mesmo tempo que ele diminuiu a porcentagem de 18:0. Em IT83-D, após 7 dias de tratamento de seca, as proporções de 18:3 foram reduzidas, enquanto que as proporções dos ácidos graxos saturados foram aumentados, em comparação ao controle (Tabela 6d).

Em PA, o tratamento de seca causou um aumento das proporções de 18:3, compensado por uma redução dos níveis dos ácidos graxos saturados 16:0 e 18:0, nos dois cultivares, após 14 dias (Tabela 6e).

Em relação ao DPG, os níveis proporcionais do ácido graxo insaturado 18:3 no cultivar EPACE-1 foram aumentados em resposta aos diferentes tratamentos em comparação ao

controle, após 14 dias. Essas mudanças foram compensadas pela redução das proporções do ácido graxo saturado 18:0. Além disso, nesse período, o tratamento com ozônio causou um aumento da porcentagem dos ácidos graxos insaturados 18:1 e 18:2, comparado ao controle. Em IT83-D, o tratamento combinado diminuiu as proporções do ácido graxo 18:3, aumentando a porcentagem do ácido graxo saturado 18:0, após 7 e 14 dias, comparado ao controle (Tabela 6f).

Tabela 6 - Composição em ácidos graxos de PC (a), PG (b), PI (c), PE (d), PA (e) e DPG (f) nas folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (cultivares EPACE-1 e IT83-D) submetidas aos seguintes tratamentos: controle (C), seca (S), ozônio (O), ozônio + seca (OS).

## (a) PC

Cultivar	Tempo (d)	Tratamento	%16:0	%18:0	%18:1	%18:2	%18:3
EPACE-1	7	C	44,6	10,2	2,3	14,2	28,8
		S	<b>41,6</b>	13,2	2,2	14,6	28,4
		O	38,7	13,9	2,4	14,4	30,5
		OS	38,0	13,4	2,4	18,9	27,3
	14	C	31,8	12,8	3,5	15,6	36,2
		S	35,4	16,3	3,3	10,0	35,1
		O	<b>31,1</b>	10,9	3,3	15,5	39,2
		OS	37,8	15,2	2,2	15,1	29,6
IT83-D	7	C	<b>47,2</b>	17,0	3,1	11,0	21,7
		S	<b>47,6</b>	20,7	3,2	9,9	18,6
		O	41,4	11,4	3,3	16,1	27,8
		OS	37,7	10,8	2,1	15,9	33,6
	14	C	39,9	16,5	4,5	18,7	20,4
		S	37,3	17,7	3,1	20,1	21,8
		O	41,4	17,0	3,7	15,6	22,4
		OS	35,4	21,4	3,7	15,1	24,4

## (b) PG

Cultivar	Tempo (d)	Tratamento	%16:0	%18:0	%18:1	%18:2	%18:3
EPACE-1	7	C	51,1	12,9	1,9	<b>3,4</b>	30,7
		S	52,2	20,5	<b>1,5</b>	<b>3,4</b>	22,3
		O	49,2	15,8	2,0	4,1	28,9
		OS	57,6	16,8	2,4	4,2	19,0
	14	C	51,5	12,2	4,1	5,5	26,7
		S	46,3	14,3	2,7	4,2	32,5
		O	51,3	15,1	<b>4,6</b>	5,3	23,7
		OS	43,7	15,0	2,2	6,1	33,0
IT83-D	7	C	49,6	16,6	2,1	5,5	26,2
		S	51,7	16,2	1,8	<b>7,7</b>	22,6
		O	49,0	12,5	2,2	4,4	31,9
		OS	53,1	14,7	<b>1,5</b>	3,8	26,9
	14	C	52,3	18,6	<b>5,6</b>	5,0	18,5
		S	53,2	18,8	<b>4,6</b>	5,0	18,3
		O	43,3	27,6	4,2	5,1	19,8
		OS	46,8	21,7	2,9	4,2	24,4

(c) **PI**

Cultivar	Tempo (d)	Tratamento	%16:0	%18:0	%18:1	%18:2	%18:3
EPACE-1	7	C	39,5	20,3	2,1	7,2	30,9
		S	26,1	15,8	2,2	7,4	48,5
		O	35,3	27,4	1,6	6,8	28,8
		OS	39,7	23,7	2,2	8,0	26,5
	14	C	27,6	<b>11,4</b>	1,4	4,9	54,6
		S	34,6	24,4	2,3	5,2	33,5
		O	31,4	13,7	3,4	7,4	44,1
		OS	32,9	20,7	1,8	5,9	38,7
IT83-D	7	C	34,7	26,4	2,9	6,1	29,9
		S	33,7	19,8	2,0	11,5	33,0
		O	35,8	23,8	2,4	7,4	30,6
		OS	31,3	27,8	3,1	10,1	27,7
	14	C	31,0	30,7	2,5	5,9	30,0
		S	22,6	<b>41,9</b>	2,3	7,6	25,6
		O	31,4	27,5	3,2	6,7	31,2
		OS	32,5	25,7	3,7	7,0	31,1

(d) **PE**

Cultivar	Tempo (d)	Tratamento	%16:0	%18:0	%18:1	%18:2	%18:3
EPACE-1	7	C	33,6	13,6	3,1	16,5	33,3
		S	35,7	12,6	2,2	16,8	32,7
		O	29,2	15,7	2,0	16,0	37,1
		OS	40,1	16,7	3,1	<b>20,3</b>	19,7
	14	C	31,9	21,6	2,9	12,0	31,6
		S	33,3	21,8	1,5	<b>8,6</b>	34,7
		O	31,0	12,5	2,4	13,8	40,2
		OS	32,6	22,9	2,9	10,1	31,5
IT83-D	7	C	29,6	19,3	3,6	15,6	31,8
		S	32,2	30,9	3,4	11,8	21,7
		O	30,1	12,9	2,1	<b>20,2</b>	34,7
		OS	30,6	16,2	2,3	13,9	37,1
	14	C	32,4	20,6	2,8	13,7	30,5
		S	30,4	22,9	2,6	14,0	30,1
		O	34,8	23,8	2,3	10,6	28,5
		OS	34,5	17,3	2,4	12,0	33,9



## (e) PA

Cultivar	Tempo (d)	Tratamento	%16:0	%18:0	%18:1	%18:2	%18:3
EPACE-1	7	C	33,8	15,1	2,1	12,3	36,7
		S	39,1	19,4	1,0	10,2	30,3
		O	30,4	14,8	1,8	13,5	39,4
		OS	30,9	13,4	2,0	16,4	37,3
	14	C	23,6	13,3	2,6	11,7	48,8
		S	20,7	12,0	1,8	12,3	53,3
		O	23,5	13,3	2,3	12,2	48,7
		OS	21,0	23,2	2,4	10,0	43,4
IT83-D	7	C	34,4	25,6	2,8	11,0	26,2
		S	32,2	24,2	2,9	11,1	29,7
		O	30,7	8,1	1,5	15,2	44,5
		OS	30,6	11,2	1,7	12,4	44,1
	14	C	29,4	20,9	3,4	12,0	34,4
		S	26,1	14,9	2,0	14,5	42,5
		O	28,3	19,7	2,6	10,9	38,5
		OS	29,5	28,5	3,0	7,5	31,5

## (f) DPG

Cultivar	Tempo (d)	Tratamento	%16:0	%18:0	%18:1	%18:2	%18:3
EPACE-1	7	C	29,7	32,0	5,3	13,0	20,0
		S	32,1	28,7	4,1	12,8	22,3
		O	27,9	33,3	3,7	12,1	23,1
		OS	28,8	36,3	4,2	11,6	19,1
	14	C	26,6	29,2	3,6	10,8	29,8
		S	26,2	25,4	2,3	6,6	39,5
		O	24,2	12,9	13,0	14,1	35,9
		OS	27,9	12,6	2,2	12,4	45,0
IT83-D	7	C	31,8	19,5	2,8	9,4	36,5
		S	29,3	32,6	2,9	12,6	22,5
		O	25,9	22,2	4,9	16,4	30,6
		OS	27,2	37,3	3,7	10,7	21,2
	14	C	26,9	29,8	5,2	14,2	23,9
		S	29,2	28,5	4,9	13,7	23,8
		O	27,6	27,6	5,6	14,4	24,8
		OS	31,8	34,4	5,7	10,7	17,4

Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: Os valores são expressos em porcentagem do teor total de ácidos graxos a partir de três repetições biológicas independentes. Os dados em negrito pertencem a sub-conjuntos que se fundem parcialmente ao conjunto de dados de base, os dados em negrito com fundo cinza pertencem aos sub-conjuntos estritamente distintos (ANOVA de sentido único e teste *post-hoc* de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ). PC, fosfatidilcolina; PG, fosfatidilglicerol; PI, fosfatidilinositol; PE, fosfatidiletanolamina; PA, ácido fosfático; DPG, difosfatidilglicerol; 16:0, ácido hexadecanóico; 18:0, ácido octadecanóico; 18:1, ácido-9-octadecanóico; 18:2, ácido-9,12-octadecadienóico; 18:3, ácido-9,12,15-octadecatrienóico.

### 10.11 Identificação do gene de *Vigna unguiculata* codificando para uma cardiolipina sintase

O cDNA completo codificando putativamente a cardiolipina sintase (CLS) de *V. unguiculata* foi amplificado utilizando-se oligonucleotídios específicos como sondas (ver Materiais e Métodos). A análise manual dos eletroforegramas do sequenciamento mostrou que o cDNA sequenciado apresenta 981 pb, que corresponde à fase de leitura aberta (ou ORF para *open reading frame*) codificando um polipeptídeo de 326 aa (Figura 25).

A anotação dos genes nas espécies da ordem Fabales permitiu verificar que a enzima CLS é codificada por somente 1 gene. A comparação da sequência em aminoácidos deduzida de *VuCLS* indicou níveis de identidade de 93,52% com a CLS de *Phaseolus vulgaris*, 87,7% com a CLS de *Glycine max* e 83,74% com a CLS de *Cajanus cajan*. O alinhamento realizado entre as sequências de CLS dessas espécies mostra as regiões-consenso identificadas (Figura 26). As regiões N-terminal (MVLFRKFL) e C-terminal (VVSNSV) do polipeptídeo são bastante conservadas nas plantas da ordem Fabales (*Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* e *Cajanus cajan*). Esses níveis de identidade e de homologia com as sequências conhecidas permitem afirmar que essa sequência codifica para a cardiolipina sintase em *Vigna unguiculata*.

A identificação da sequência de cDNA completo e a comparação com as sequências conhecidas permitiram escolher um par de iniciadores específicos para o gene da cardiolipina sintase afim de estudar sua expressão em condições de seca e de ozônio em *Vigna unguiculata* bem como de fazer um estudo filogenético entre as espécies vegetais.

A árvore filogenética construída com o auxílio de ferramentas de bioinformática, comparando-se as sequências de aminoácidos nas plantas da ordem Fabales, *Arabidopsis thaliana* (ordem Brassicales) e *Oryza sativa* (ordem Cyperales), representa as relações de parentesco entre as espécies (Figura 27). Ela mostra que a sequência da CLS em *Vigna unguiculata* é mais próxima de *Phaseolus vulgaris*, seguida por *Vigna angularis*, *Glycine max* e *Cajanus cajan*. As sequências da CLS em *Lupinus angustifolius* e *Arachis hypogaea* são muito próximas entre elas, bem como as sequências em *Cicer arietinum*, *Medicago truncatula* e *Trifolium pratense*. Além disso, a CLS em *Arabidopsis thaliana*, sendo uma dicotiledônea, é mais próxima da CLS nas espécies da ordem Fabales, também dicotiledôneas, do que em *Oryza sativa*, uma monocotiledônea.

Figura 25 - Sequências nucleotídicas (em preto) e de aminoácidos (em azul) deduzidas do cDNA de *VuCLS* que codifica a cardiopina sintase em *V. unguiculata*.

```

ATG GTT CTG TTC CGC AAG TTC CTC AGA GCA ATA CTC GCC GAC AAC ACC CAA GCC 54
M V L F R K F L R A I L A D N T Q A 18
CGA GCC AAA GCC CGA ACC TTC CTC ACC TCA ATA TAC GCA TTC CCC TGG TAC GCG 108
R A K A R T F L T S I Y A F P W Y A 36
CCT CAC CAC AAC AAC CGC CAC TCC CGC TCC CCA ACC AAT AAC AGA TTC CTC TCT 162
P H H N N R H S R S P T N N R F L S 54
CCC GGC CCA GGC CCT GGC CCA GGC CCA GGC CCT CTC TTC CTC TCT CGC CCC CCA 216
P G P G P G P G P G P L F L S R P P 72
TGG AAA CTC TCT CAA TCC GCC ACC CCT CTC TAT TTG CAC GAA AAC GCC GTC GTT 270
W K L S Q S A T P L Y L H E N A V V 90
TTC CCC AAG GTC CAC CCC TTC AAT TTG CTT CGC TCC ACT CCT CCT CTC CCT CTC 324
F P K V H P F N L L R S T P P L P L 108
CGC TTC CCT GAT CCG GCT CCC TCC ATT TCC ACC AAC CCT TCT CTT TTC CAC AGC 378
R F P D P A P S I S T N P S L F H S 126
TTC GTC AAT CTC CCC AAT TTC ATA TCC TTC TCC CGA TTA CTT TCC GGT CCT CTT 432
F V N L P N F I S F S R L L S G P L 144
CTC GCA TGG ATG ATC TCC AAC GAG TTC TAT ACT CCA GCA ATT GTA GGG TTG GCA 486
L A W M I S N E F Y T P A I V G L A 162
CTC TCT GGG GCC ACT GAT TGG CTG GAT GGA TAC GTG GCT CGG AAG ATG AAG ATA 540
L S G A T D W L D G Y V A R K M K I 180
GAT TCC GTA GTG GGT TCC TAC CTT GAT CCC CTT GCT GAC AAG GTT CTT ATT GGT 594
D S V V G S Y L D P L A D K V L I G 198
TGC GTT GCT CTT GCC ATG GTG CAT AAA GAT CTA CTG CAT CCT GGG GTT GTT AGT 648
C V A L A M V H K D L L H P G V V S 216
CTT GTT GTG TTT CGG GAC GTC TTC CTT GTT GGG GGT GCA GTA TTT CTA AGA GCA 702

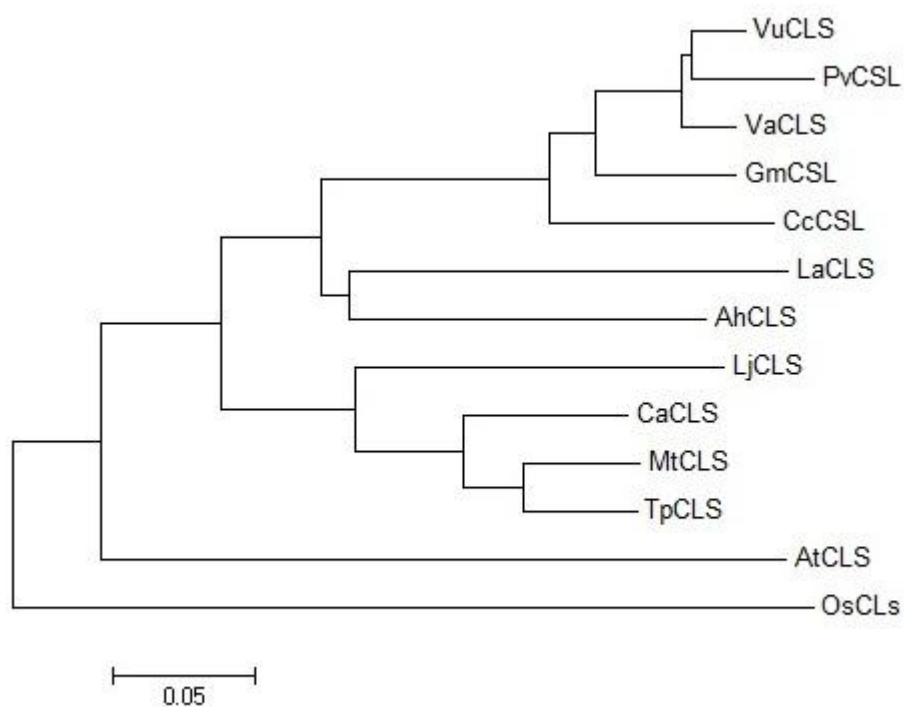
```

L	V	V	F	R	D	V	F	L	V	G	G	A	V	F	L	R	A	234
AAT	AGC	TTG	GGT	TGG	AAG	TGG	AAA	AGC	TGG	TTT	GAT	TTT	TTT	AAC	CTT	GAT	GGA	756
N	S	L	G	W	K	W	K	S	W	F	D	F	F	N	L	D	G	252
ACC	GCC	CGC	CAA	AAG	GTT	GAA	CCA	CTC	CTT	CTA	AGC	AAG	GTG	AAT	ACA	GTA	TTC	810
T	A	R	Q	K	V	E	P	L	L	L	S	K	V	N	T	V	F	270
CAA	TTA	GCA	CTA	GTT	GCT	GCT	GCT	CTT	CTT	CAA	CCA	GAG	TTT	GGA	ACA	CAG	GAA	864
Q	L	A	L	V	A	A	A	L	L	Q	P	E	F	G	T	Q	E	288
ACT	CAA	CCA	TAT	ATT	ACT	TAT	TTG	AGC	TAT	TTA	GTG	GCT	TCA	ACA	ACA	GTG	GCA	918
T	Q	P	Y	I	T	Y	L	S	Y	L	V	A	S	T	T	V	A	306
ACT	ACT	GCA	GCA	TAT	GGA	GCA	CAA	TAC	TTT	AGG	AGA	TTT	ACA	GTA	GTA	TCA	AAC	972
T	T	A	A	Y	G	A	Q	Y	F	R	R	F	T	V	V	S	N	324
TCG	GTC	TAG																981
S	V	-																326

Fonte: ExPASy: *SIB Bioinformatics Resource Portal*.



Figura 27 - Árvore filogenética das sequências de aminoácidos da cardioplipina sintase (CLS) em uma espécie representativa de dicotiledôneas (*At* - *Arabidopsis thaliana*), uma espécie representativa de monocotiledôneas (*Os* - *Oryza sativa*) e espécies representativas da ordem Fabales (*Ah* - *Arachis hypogaea*, *Cc* - *Cajanus cajan*, *Ca* - *Cicer arietinum*, *Gm* - *Glycine max*, *Lj* - *Lotus japonus*, *La* - *Lupinus angustifolius*, *Mt* - *Medicago truncatula*, *Pv* - *Phaseolus vulgaris*, *Tp* - *Trifolium pratense*, *Va* - *Vigna angularis* e *Vu* - *Vigna unguiculata*).



Fonte: Tamura *et al.* (2013).

#### 4.12 Expressão dos genes codificadores das enzimas implicadas no metabolismo dos lipídios de membrana nas folhas de feijão-de-corda

Modificações nos níveis de transcrito codificando para um certo número de proteínas das vias de biossíntese e de degradação dos lipídios de membrana foram analisadas com o auxílio da PCR quantitativa em tempo real (Figura 28). Os genes codificando para duas proteínas da via de biossíntese dos galactolipídios (MGDG sintase, E.C. 2.4.1.46: *VuMGD1* e *VuMGD2*; DGDG synthase, E.C. 2.4.1.241: *VuDGD1* e *VuDGD2*), duas dessaturases cloroplásticas do ácido graxo  $\omega$ -3 (E.C. 1.14.19.3: *VuFAD7* e *VuFAD8*), duas lipases (fosfolipase D tipo  $\alpha$ , E.C. 3.1.4.4: *VuPLD1*; lipídio acil-hidrolase tipo patatina, E.C. 3.1.1.26: *VuPAT1*) e uma proteína da via de biossíntese da cardiolipina mitocondrial (cardiolipina sintase, E.C. 2.7.8.- : *VuCLS*) foram estudados. Os valores obtidos para os genes-alvo foram normalizados em relação à expressão do gene de referência *VuEF1- $\alpha$*  (fator de alongamento).

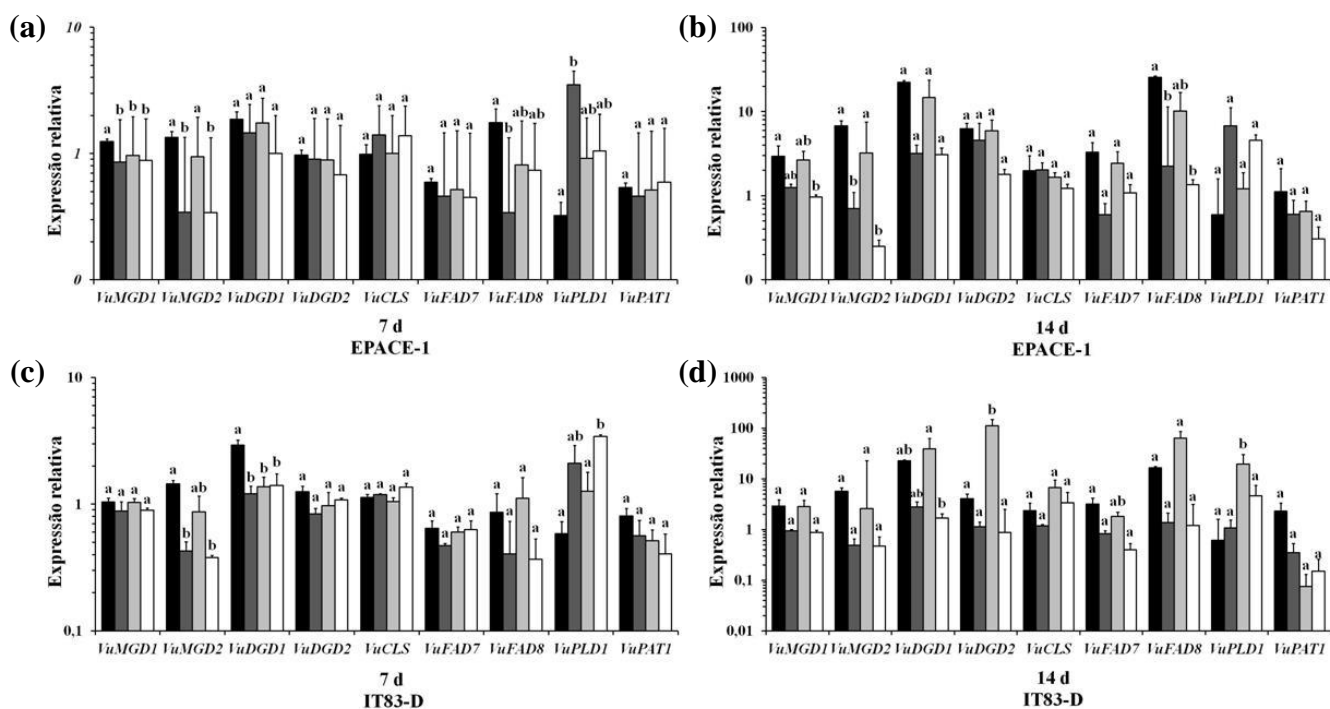
O nível de expressão dos genes analisados nas folhas dos controles dos dois cultivares foi mais elevado após 14 dias que após 7 dias, em particular o de *VuDGD1*, *VuFAD8* e, em menor extensão, de *VuMGD2* (Figura 28).

Em EPACE-1, os tratamentos de seca isolada e combinada ao ozônio, após 7 e 14 dias, causaram uma diminuição significativa da expressão dos genes *VuMGD1* (de aproximadamente 30% após 7 dias e 65% após 14 dias), *VuMGD2* (de aproximadamente 75% após 7 dias e 90% após 14 dias) e *VuFAD8* (de aproximadamente 60% a 80% após 7 dias e 90% após 14 dias), bem como uma tendência à diminuição da expressão de *VuDGD1* (de aproximadamente 85%), *VuDGD2* (de aproximadamente 30% e 70%), *VuFAD7* (de aproximadamente 70% e 80%) e *VuPAT1* (de aproximadamente 40% e 70%) após 14 dias, quando comparados ao controle (Figura 28a, b). Diferentemente, após 7 e 14 dias, esses tratamentos induziram um aumento da expressão de *VuPLD1* (de 90% e 225% após 7 dias e 1000% e 650% após 14 dias) comparado ao controle (Figura 28a, b). O tratamento com ozônio isolado causou uma diminuição significativa de aproximadamente 20% da expressão de *VuMGD1* após 7 dias (Figura 28a) e reprimiu a expressão de *VuPAT1* em aproximadamente 40%, após 14 dias, comparado ao controle (Figura 28b).

Em IT83-D, os tratamentos de seca isolada e combinada ao ozônio também causaram uma redução da expressão da maioria dos genes estudados (Figura 28c, d). Uma diminuição significativa foi observada para os genes *VuMGD2* após 7 dias (de aproximadamente 70%) e *VuDGD1* após 7 dias (de aproximadamente 55%) e 14 dias (de aproximadamente 90%), comparado ao controle. O gene *VuFAD8* mostrou uma tendência à diminuição de aproximadamente 55% após 7 dias e de aproximadamente 90% após 14 dias (Figura 28c, d). A expressão de *VuMGD1*, *VuDGD2* e *VuFAD7* mostrou uma tendência à redução em torno de 70% e *VuPAT1* em torno de 90%, comparado ao controle, após 14 dias (Figura 28d). Entretanto, a expressão do gene implicado na degradação dos fosfolipídios, *VuPLD1*, foi superregulado por esses tratamentos: de aproximadamente 260% e 480% após 7 dias e de aproximadamente 75% e 650% após 14 dias, comparado ao controle (Figura 28c, d). O tratamento com ozônio estimulou a expressão dos genes de biossíntese *VuDGD1* (de aproximadamente 70%), *VuDGD2* (de aproximadamente 2700%), *VuCLS* (de aproximadamente 190%) e *VuFAD8* (de aproximadamente 280%) e do gene de degradação *VuPLD1* (de aproximadamente 3100%), após 14 dias, comparado ao controle (Figura 28d). No entanto, no mesmo período de tratamento, a expressão de *VuPAT1* mostrou uma tendência à redução de aproximadamente 95%, quando comparada ao controle (Figura 28d).



Figura 28 - Expressão relativa de genes implicados no metabolismo dos lipídios nas folhas de plantas EPACE-1 (a, b) e IT83-D (c, d) submetidas aos seguintes tratamentos: controle, seca, ozônio, ozônio + seca.



Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: controle (C, barras em preto), seca (S, barras em cinza escuro), ozônio (O, barras em cinza claro), ozônio + seca (OS, barras em branco). As medidas foram realizadas 7 e 14 dias após o início dos tratamentos. As médias  $\pm$  SEM estão indicadas (n = 3). Cada resultado é a média de duas repetições técnicas. A expressão de genes-alvo foi calibrada em relação à expressão do gene de referência *VuEF1- $\alpha$* . As letras indicam os sub-conjuntos homogêneos a cada ponto de tempo para um dado cultivar (ANOVA de sentido único e teste *post-hoc* de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ). *VuMGD1*, monogalactosil-diacilglicerol sintase tipo 1; *VuMGD2*, monogalactosil-diacilglicerol sintase tipo 2; *VuDGD1*, digalactosil-diacilglicerol sintase tipo 1; *VuDGD2*, digalactosil-diacilglicerol sintase tipo 2; *VuCLS*, cardiolipina sintase; *VuFAD7*, dessaturase de ácidos graxos  $\omega$ -3 tipo 7; *VuFAD8*, dessaturase de ácidos graxos  $\omega$ -3 tipo 8; *VuPLD1*, fosfolipase D tipo  $\alpha$ ; *VuPAT1*, lipídio acil-hidrolase tipo patatina; *VuEF1- $\alpha$* , fator de alongamento da tradução tipo 1 alfa.

## 5 DISCUSSÃO

Para melhor entender os efeitos da seca, do ozônio e da combinação desses estresses na biossíntese e degradação de lipídios de membrana de folhas, galactolipídios e fosfolipídios, foram analisados seu teor e composição em ácidos graxos, além do estudo da expressão de genes que codificam enzimas-chave das vias de seu metabolismo. A fim de encontrar marcadores de tolerância a esses estresses, trabalhou-se com dois cultivares de *Vigna unguiculata*, um tolerante e outro suscetível à seca. Resultados importantes em relação ao metabolismo dos lipídios e às respostas fisiológicas das plantas foram obtidos comparando-se os dois cultivares, bem como comparando-se os diferentes estresses aplicados. Esses resultados são discutidos abaixo.

### 5.1 Respostas fisiológicas e moleculares à seca

Em ambas os cultivares de feijão-de-corda, EPACE-1 e IT83-D, a seca causou um fechamento gradual dos estômatos, porém precoce (Figura 18). Conforme descrito em um estudo anterior (CRUZ DE CARVALHO; LAFFRAY; LOUGUET, 1998), ambos os cultivares apresentaram uma estratégia de evitar a seca através da precoce regulação da abertura dos estômatos, mas também uma capacidade de ajustamento estomático, já que as plantas mantiveram seus estômatos parcialmente abertos quando o estresse hídrico aumentou. Em consequência, os dois cultivares foram capazes de limitar a perda de água e manter a sua capacidade fotossintética em um nível elevado, como mostram as reduções moderadas no TRA e no rendimento quântico do PSII, respectivamente (Figuras 16 e 17b). No entanto, a regulação estomática induzida pela seca restringiu as trocas gasosas e a assimilação de CO<sub>2</sub>, o que parou a produção de biomassa aérea após a primeira semana de tratamento (Figura 15). Durante o estresse hídrico, a diminuição da taxa de fixação de CO<sub>2</sub> é esperada depender de uma inibição direta da fotossíntese (componente não-estomático) e de um fechamento dos estômatos (componente estomático) (CRUZ DE CARVALHO; LAFFRAY; LOUGUET, 1998).

Apesar dessa forte restrição sobre o crescimento das plantas, os resultados indicam que os dois cultivares foram capazes de resistir à seca em âmbito celular. Em primeiro lugar, as folhas das plantas submetidas à seca não apresentaram sintomas visíveis de lesões ou de

acumulação de  $H_2O_2$  (Figura 19). Em segundo lugar, o teor e a composição dos lipídios de membrana não foram alterados nos tecidos foliares das plantas em tratamento de seca, com exceção de uma tendência ao aumento do teor de DPG (ou cardiolipina) (Figuras 20, 21 e 24, Tabelas 4, 5 e 6). O fato de que (i) os genes relacionados com a síntese de galactolípídios e com a dessaturação foram subexpressos em resposta à seca, enquanto que o teor dos galactolípídios e a composição de ácidos graxos não foram modificados e (ii) a atividade fotossintética ( $\Phi_{PSII}$ ) foi reduzida em tratamento de seca sem sintomas de lesão foliar, enquanto que o teor de clorofila e o rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) mantiveram-se inalterados, sugere que ambos os cultivares responderam à privação de água ajustando adequadamente sua atividade metabólica.

Ao contrário dos resultados dos estudos anteriores (CRUZ DE CARVALHO; LAFFRAY; LOUGUET, 1998; VASQUEZ-TELLO *et al.*, 1990), IT83-D não parece mais sensível ao estresse hídrico que EPACE-1. É provável que, nas condições experimentais utilizadas, a gravidade da seca não foi suficiente para revelar as diferenças na tolerância à seca entre os dois cultivares. Concomitante a isso, algumas características das respostas do feijão-de-corda a uma seca severa, como a diminuição do teor dos lipídios de membrana de folhas (MONTEIRO DE PAULA *et al.*, 1990; TORRES-FRANKLIN *et al.*, 2007) e a indução da expressão de *VuPAT1* (MATOS *et al.*, 2001), não foram observadas no presente trabalho. Os dois cultivares mantiveram o nível de insaturação de ácidos graxos da membrana lipídica sob estresse hídrico (Tabelas 4, 5 e 6), embora *VuFAD7* e *VuFAD8* tenham sido reprimidos (Figura 28), o que pode indicar uma capacidade de aclimação ao estresse (UPCHURCH, 2008). Além disso, a seca estimulou a expressão de *VuPLD1* em ambos os cultivares (Figura 28). A superexpressão dessa PLD tipo  $\alpha$  a nível transcricional, mesmo por um déficit hídrico moderado, foi observada nas folhas de feijão-de-corda (EL-MAAROUF *et al.*, 1999). O fato de que isso tenha ocorrido aqui sem as mudanças esperadas nos fosfolipídios de membrana sugere um papel para *VuPLD1* na sinalização ao invés de um papel na degradação da membrana. Assim, *PLD $\alpha$ 1*, a fosfolipase D mais abundante nas plantas, demonstrou estar envolvida na resposta à seca moderada através da promoção do efeito do ABA no fechamento dos estômatos, enquanto que a degradação da membrana induzida pela PLD foi realizada sob um estresse severo e prolongado (HONG; ZHENG; WANG, 2008). A *PLD $\alpha$ 1* medeia a sinalização do ABA em parte através do intermediário de seu produto lipídico, o ácido fosfatídico (PA), o qual inibe um regulador

negativo do fechamento estomático induzido por ABA (ZHANG *et al.*, 2005). Aqui, o teor de PA efetivamente aumentou, mas isso ocorreu no final do tratamento e não foi bem correlacionado com a expressão de *VuPLD1* (Figuras 24 e 28). Esta diferença poderia resultar da presença de diferentes quantidades de PA, já que este também é produzido *de novo* como um precursor da síntese de fosfolípidios (MUNNIK; TESTERINK, 2005).

## 5.2 Respostas fisiológicas e moleculares ao ozônio

O tratamento com ozônio, em contraste com a seca, teve um impacto limitado sobre a fotossíntese e a produção de biomassa, porém causou efeitos mais importantes nos âmbitos celular e molecular. Alguns desses efeitos foram encontrados em ambos os cultivares de feijão-de-corda.

Em primeiro lugar, a exposição ao ozônio causou sintomas de lesões foliares e de acumulação de  $H_2O_2$  (Figura 19). A morte celular induzida pelo ozônio tem sido relatada em diversas espécies de plantas e está associada com a acumulação de EROs (LANGEBARTELS *et al.*, 2002). Em segundo lugar, o tratamento com ozônio induziu uma diminuição dos teores dos galactolipídios plastidiais, MGDG e DGDG, em ambos os cultivares (Figura 21). Reduções dos teores de galactolipídios também foram relatadas em folhas de plantas de espinafre e de feijão-vagem (SAKAKI *et al.*, 1990; WHITAKER; LEE ROWLAND, 1990) submetidas à exposição aguda ao ozônio e em plantas de ervilha e de trigo submetidas a concentrações moderadas de ozônio (CARLSSON *et al.*, 1994). Estudos sobre os efeitos de exposição aguda mostraram que a diminuição de galactolipídios plastidiais não foi diretamente causada pelo ozônio, mas sim por efeitos secundários sobre o metabolismo lipídico (FONG; HEATH, 1981; NOUCHI; TOYAMA, 1988). Em folhas de espinafre tratadas com ozônio, a redução do teor de MGDG foi concomitante com um aumento acentuado da taxa de triacilgliceróis (TAG), sintetizados a partir dos produtos de degradação de MGDG (SAKAKI; KONDO; YAMADA, 1990). Já que os TAG não foram medidos diretamente neste trabalho, a relação entre os ácidos graxos totais (incluindo os ácidos graxos nos TAG) e os ácidos graxos de membrana foi utilizada para estimar a proporção de lipídios neutros, principalmente de di- e triacilgliceróis, em relação àquela dos lipídios polares (principalmente de galactolipídios). Essa relação aumentou em resposta ao ozônio

(Figura 23), apoiando a hipótese de que ozônio induziu a conversão de MGDG em TAG nas folhas de EPACE-1. As vias putativas para essa conversão nas folhas tratadas com ozônio envolvem uma série de enzimas, incluindo uma ou mais enzimas desacilantes capazes de hidrolisar os galactolipídios, provavelmente as lipídio acil-hidrolases (LAH) (MATOS; PHAM-THI, 2009). A expressão de *VuPAT1*, uma LAH purificada indutível pela seca a partir de folhas de feijão-de-corda com uma elevada especificidade de substrato para galactolipídios (MATOS *et al.*, 2001), foi muito baixa em resposta ao ozônio neste estudo (Figura 28). Portanto, a (s) enzima (s) desacilante (s) responsável (is) pela degradação dos galactolipídios nas folhas de feijão-de-corda tratadas com ozônio resta (m) ainda ser identificada (s).

Uma terceira resposta ao ozônio compartilhada pelos dois cultivares de feijão-de-corda foi o fechamento parcial dos estômatos. Meta-análises dos resultados publicados em árvores (WITTIG *et al.*, 2009) ou em soja (MORGAN; AINSWORTH; LONG, 2003) indicam que uma redução moderada de  $g_s$  é uma resposta geral das plantas ao ozônio elevado. A regulação da condutância estomática desempenha um papel importante na limitação do fluxo de entrada de ozônio e, portanto, do estresse oxidativo induzido por ele (GRULKE; PAOLETTI, 2010). Neste estudo, o tratamento com ozônio não teve efeito sobre o  $\Phi_{PSII}$  (Figura 17b), o que exclui uma regulação negativa de  $g_s$  devido às taxas de fotossíntese reduzidas. Em vez disso, é sugerido que o ozônio afetou diretamente as células-guarda (MCAINSH *et al.*, 2002). Em contraste com a resposta dos estômatos à seca, o fechamento dos estômatos induzido pelo ozônio não está correlacionado com a indução da expressão de *VuPLD1* (Figuras 18 e 28), sugerindo que a atividade da PLD não estava envolvida na resposta dos estômatos ao ozônio.

### 5.3 Diferenças de sensibilidade ao ozônio entre os cultivares

A maior parte dos efeitos do ozônio observados nas folhas de feijão-de-corda foram mais pronunciados no cultivar IT83-D do que no cultivar EPACE-1, incluindo a extensão da lesão foliar e a diminuição da quantidade de galactolipídios. Em IT83-D, a taxa de oxidação nos tecidos foliares pôde ter sido maior do que em EPACE-1 devido a um  $POD_0$  superior (+ 21%) (Tabela 3). Além disso, IT83-D apresentou respostas ao ozônio que não ocorreram em EPACE-1. O mais impressionante foi que em IT83-D, a diminuição do teor de galactolipídios foi

correlacionada com um aumento significativo na relação DGDG:MGDG, como observado nos cultivares de feijão-de-corda expostos a ozônio agudo (NOUCHI; TOYAMA, 1988; WHITAKER; LEE; ROWLAND, 1990). A diminuição relativa mais elevada em MGDG é consistente com sua extrema sensibilidade a processos de degradação ativados por estresses ambientais, como relatado em *Arabidopsis* (GIGON *et al.*, 2004) e em feijão-de-corda (TORRES-FRANKLIN *et al.*, 2007) submetidos à seca. Além disso, o tratamento com ozônio reduziu a quantidade do ácido graxo 18:3 em MGDG no cultivar IT83-D (Tabela 5a), também encontrado nas folhas de plantas de ervilha (CARLSSON *et al.*, 1994) e de trigo (SANDELIUS *et al.*, 1995) expostas a ozônio moderado. Uma LAH purificada de folhas de feijão-de-corda apresentou a maior especificidade de substrato para (18:3/18:3)-MGDG (SAHSAH *et al.*, 1994) e as atividades de LAH em extratos de folhas de feijão-de-corda reduziram seletivamente o conteúdo de 18:3 em MGDG (SAHSAH *et al.*, 1998). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a redução da quantidade de 18:3 em MGDG reflete a degradação preferencial do MGDG pelas LAHs após a exposição ao ozônio no cultivar sensível de feijão-de-corda, IT83-D.

Foi demonstrado que estresses, tais como lesões, queda de temperatura e seca aumentam a expressão da dessaturase plastidial de ácido graxo  $\omega$ -3, *FAD8* (NISHIUCHI; IBA, 1998; TORRES-FRANKLIN *et al.*, 2009). Além disso, a superexpressão de *FAD8* aumentou a quantidade de 18:3 e a tolerância à salinidade e à seca em plantas de tabaco transgênicas (ZHANG *et al.*, 2005). No presente trabalho, a estimulação da expressão de *VuFAD8* encontrada em IT83-D (Figura 28d) teria atenuado a perda induzida pelo ozônio de 18:3 nos lipídios de membrana. No entanto, essa superexpressão não foi eficaz na manutenção da taxa de insaturação do MGDG (Tabela 5a). Ao lado do seu papel no ajustamento da insaturação dos ácidos graxos, as FADs  $\omega$ -3 parecem estar envolvidas na regulação das respostas de defesa das plantas através da produção de ácidos graxos trienólicos que servem como precursores para a síntese de oxilipinas, tais como o ácido jasmônico (JA) (YAENO; MATSUDA; IBA, 2004). O JA se acumula durante a exposição ao ozônio e atua na contenção da lesão durante o processo de morte celular induzida por ozônio (KANGASJÄRVI; JASPERS; KOLLIST, 2005). Uma vez que *VuFAD7* foi reprimido pelo tratamento com ozônio (Figura 28d), *VuFAD8* poderia ter um papel específico na indução de respostas de defesa ao ozônio através do JA nas folhas do cultivar sensível.

#### 5.4 Participação de DGD2 e de PLD $\alpha$ na remodelação da membrana sob ozônio em IT83-D

Em EPACE-1, a expressão dos genes relacionados à síntese dos galactolipídios permaneceu inalterada ou foi reduzida pelo tratamento com ozônio (Figura 28a, b), o que está de acordo com a diminuição induzida pelo ozônio no teor de MGDG e de DGDG (Figura 21). Uma tendência semelhante foi observada em IT83-D para MGDG e os genes associados à biossíntese (Figuras 21a e 28c, d). No entanto, a relação DGDG:MGDG aumentou em resposta ao ozônio neste cultivar e isso coincidiu com uma forte superexpressão de *VuDGD2* e, em menor grau, de *VuDGD1* (Figuras 22 e 28c, d). As vantagens da substituição parcial de MGDG por DGDG nas membranas de tilacóides são que (i) DGDG é menos sensível à degradação por LAHs (SAHSAH *et al.*, 1998) e (ii) DGDG é um lipídio formador de bicamada, enquanto que MGDG tem uma tendência para formar estruturas não-lamelares (WEBB; GREEN, 1991). Sob tratamento com ozônio, DGDG poderia, portanto, ajudar a manter as membranas dos tilacóides em um estado físico compatível com o funcionamento normal das proteínas de membrana (LEE, 2000). Alternativamente, DGDG poderia substituir os fosfolipídios nas membranas extraplastidiais, como observado em condições de limitação de fosfato (HÄRTEL DORMANN; BENNING, 2001). A acumulação de lipídios não-fosforilados durante a privação de fosfato conduz à redução de fosfoglicerolipídios de 90 a 50%. Estudos indicam que as quantidades de DGDG aumentam acentuadamente durante a carência de fosfato. Quando o fosfato é limitado, os fosfolipídios de membrana das plantas são reduzidos e, pelo menos em parte, substituídos por glicolipídios. Essa alteração da composição lipídica não é limitada aos plastídios, já que durante a privação de fosfato, DGDG se acumula nas membranas extraplastidiais (HÄRTEL *et al.*, 2000).

Os principais fosfolipídios (PC, PG, PE e PI) foram reduzidos em IT83-D em resposta ao ozônio (Figura 24b). No entanto, o fato de que os fosfolipídios diminuíram enquanto que nem a relação DGDG:MGDG ou a expressão da *DGDG sintase* foram modificadas em resposta ao tratamento de ozônio+seca (Figuras 22 e 28d) sugere que DGDG é primariamente envolvido na manutenção da estrutura da membrana dos tilacóides em resposta ao ozônio. Além disso, DGDG poderia estar envolvido na remodelação das membranas extraplastidiais quando a dose de ozônio é maior do que um certo limiar, ou seja, no tratamento com ozônio, em que a absorção estomática de ozônio foi 50% maior do que no tratamento de ozônio+seca. Vários

fatores sustentam essa hipótese. Em primeiro lugar, uma forte superexpressão de *VuDGD2* foi encontrada em IT83-D em resposta ao ozônio aplicado isoladamente, mas não para o tratamento de ozônio+seca (Figura 28d). Considerando que *DGDI* é responsável pela síntese da maior parte de DGDG plastidial, *DGD2* parece estar envolvido em condições específicas de crescimento, tais como a limitação de fosfato (KELLY; DORMANN, 2002) ou a seca severa (TORRES-FRANKLIN *et al.*, 2007). Em seguida, a estimulação de 25 vezes da expressão de *VuDGD2* no tratamento com ozônio coincidiu com a superexpressão equivalente de *VuPLD1*, que foi associada a uma diminuição nos fosfolipídios de membrana (Figuras 28d e 24b). No tratamento seca+ozônio, uma indução de 5 vezes de *VuPLD1* foi encontrada juntamente com a redução do teor de fosfolipídios, mas *VuDGD2* foi, neste caso, fortemente suprimido (Figura 28d). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a atividade da PLD $\alpha$  poderia desempenhar um papel duplo sob estresse com ozônio, principalmente na degradação dos fosfolipídios de membrana, como observado sob estresse hídrico severo (HONG *et al.*, 2008) e também, em resposta a altas doses de ozônio, na regulação de processos de remodelação da membrana que envolveriam a expressão de *DGD2* e a substituição de fosfolipídios por DGDG.

### 5.5 Papel da cardiolipina na tolerância ao ozônio em EPACE-1

Após 14 dias de tratamento, observou-se uma resposta específica do cultivar EPACE-1 identificada como uma característica potencial de tolerância ao ozônio, ou seja, um aumento de 110% nos níveis de DPG (cardiolipina) (Figura 24a). O fato de que a exposição ao ozônio causou uma redução do teor de galactolipídios e sua provável conversão em TAG nas folhas de feijão-de-corda sugere que as plantas responderam ao estresse ajustando adequadamente seus teores de cardiolipina. No entanto, o aumento da quantidade de cardiolipina não pode ser associado à expressão do gene da cardiolipina sintase (*VuCLS*), que não foi modificada em resposta ao ozônio (Figura 28b). Esses resultados sugerem que a cardiolipina, além do seu papel na estabilidade dos complexos respiratórios, pode também desempenhar um papel nos processos de remodelação da membrana para a tolerância das plantas de feijão-de-corda ao ozônio, o que poderia envolver a substituição dos galactolipídios por cardiolipina.



Estudos recentes têm destacado a importância da cardiolipina ou da cardiolipina sintase na resposta de plantas de *Arabidopsis* a estresses (PAN; HU; JONES, 2014; PINEAU *et al.*, 2013). Pineau *et al.* (2013) mostraram que a cardiolipina é necessária para a função mitocondrial e para o desenvolvimento adequado de plantas de *Arabidopsis*, particularmente sob condições de estresse. Para isso, eles caracterizaram três mutantes deficientes no gene da cardiolipina sintase, nomeados mutantes *cls*. Eles relataram que as mudas se desenvolvem somente em condições de pouca luz e que não são férteis quando são transferidas para o solo, apresentando mudanças no transporte de elétrons mitocondrial. Além disso, o sistema antioxidante e a morte celular programada também são exacerbados nos mutantes *cls*, indicando uma perturbação global da resposta ao estresse. Pan, Hu e Jones (2014) utilizaram *Arabidopsis thaliana* para examinar a distribuição subcelular da cardiolipina e da cardiolipina sintase e analisaram a perda de função nos mutantes *cls* para defeito de morfogênese mitocondrial e resposta ao estresse. Eles mostraram que os mutantes *cls* apresentam uma alteração significativa do crescimento, bem como uma integridade estrutural e morfogênese das mitocôndrias alteradas. Além disso, eles revelaram que a cardiolipina também desempenha um papel na resposta da planta ao calor e à escuridão prolongada, estresses que induzem a morte celular programada.

### **5.6 Atenuação pela seca dos efeitos do ozônio através da redução de sua absorção estomática**

Além de reduzir a condutância estomática, o ozônio também é conhecido por alterar as respostas dos estômatos a uma variedade de estímulos ambientais (DUMONT *et al.*, 2013). Em caso de seca, o ozônio pode perturbar a via de transdução do sinal induzida por ABA para um controle estomático que interfere na capacidade das plantas em responder ao estresse hídrico (WILKINSON; DAVIES, 2010). Neste estudo, a taxa e a intensidade do fechamento dos estômatos causadas por déficit hídrico não foram alteradas pelo ozônio no tratamento de ozônio+seca (Figura 28d), sugerindo que o ozônio não interferiu na resposta estomática à seca induzida por ABA/PLD nas folhas de feijão-de-corda. Por outro lado, o fechamento dos estômatos induzido pelo déficit hídrico diminuiu a absorção de ozônio em EPACE-1 e em IT83-D quando a seca e o ozônio foram aplicados em combinação (Tabela 3). Conseqüentemente, os

efeitos do ozônio observados no tratamento com ozônio foram menos pronunciados no tratamento de ozônio+seca, incluindo as lesões na folha, o acúmulo de  $H_2O_2$  e o esgotamento de galactolipídios (Figuras 21 e 19). Além disso, alguns dos efeitos do ozônio não são encontrados no tratamento combinado de ozônio+seca, tais como o aumento específico a IT83-D da relação DGDG:MGDG e a superexpressão coordenada de *VuDGD2*, *VuPLD1* e *VuFAD8* (Figuras 22 e 28d). Por fim, vários efeitos comuns são observados em resposta à seca e à combinação de ozônio+seca em ambos os cultivares: a redução da massa seca da parte aérea (Figura 15), do teor relativo de água (Figura 16) e do rendimento quântico do PSII (Figura 17b) e o aumento do teor de DPG (ou cardiolipina) (Figura 24). Tomados em conjunto, esses dados sugerem que o fechamento dos estômatos induzido pela seca atenuou os efeitos nocivos do ozônio nos tecidos foliares de feijão-de-corda, o que é consistente com os resultados de meta-análises dos efeitos do ozônio em árvores (WITTIG *et al.*, 2007) e em culturas (FENG; KOBAYASHI, 2009). No entanto, seria interessante mostrar se resultados semelhantes são observados quando o estresse pelo ozônio é aplicado antes da seca. Essa situação, provável em condições naturais, poderia levar a mudanças na resposta dos estômatos à seca e/ou na capacidade antioxidante das células e assim colocando em evidência um possível impacto do ozônio na resposta das plantas à seca (WILKINSON; DAVIES, 2009).

## 6 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais utilizadas, nenhuma diferença pôde ser observada entre os dois cultivares em termos de tolerância à seca. Alguns dos parâmetros aqui analisados foram afetados pelo ozônio, independentemente da dose ou do cultivar. No cultivar tolerante (EPACE-1), essas respostas incluem a possível conversão dos galactolipídios em TAG, além de sua substituição por cardiolipina, o que poderia contribuir para a tolerância do cultivar ao ozônio. No cultivar sensível (IT83-D), a exposição ao ozônio estimulou a expressão da PLD $\alpha$ , uma possível explicação para as alterações observadas nos fosfolipídios de membrana. Além disso, este estudo forneceu evidências de que a PLD $\alpha$ , ao lado dos seus reconhecidos papéis na degradação de fosfolipídios e na regulação da resposta estomática ao déficit hídrico, também poderia contribuir para a remodelação da membrana sob exposição ao ozônio através de processos que podem envolver a substituição parcial de fosfolipídios por DGDG. Os dois estresses em combinação conduziram a resultados similares aos observados em resposta ao tratamento de seca aplicada isoladamente. Isso provavelmente reflete a severa restrição da absorção de ozônio resultante do fechamento dos estômatos induzido pela seca. Juntos, esses resultados enfatizam a importância do papel dos lipídios de membrana nos processos de sinalização e ajustes metabólicos que ocorrem em plantas sujeitas a estresses ambientais.

## REFERÊNCIAS

- AHUJA, I.; DE VOS, R.C.H.; BONES, A.M.; HALL, R.D. Plant molecular stress responses face climate change. **Trends in Plant Science** v.15, p.664-674, 2010.
- AINSWORTH, E.A.; ROGERS, A.; LEAKEY, A.D.B. Targets for crop biotechnology in a future high-CO<sub>2</sub> and high-O<sub>3</sub> World. **Plant Physiology** v.147, p.13-19, 2008.
- ARAUS, J. L.; SLAFER, G. A.; REYNOLDS, M. P.; ROYO, C. Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? **Annals of Botany** v.89, p.925-940, 2002.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology** v.141, p.391-396, 2006.
- ASHMORE, M.R. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell & Environment* v.28, p.949-964, 2005.
- AWAI, K.; MARÉCHAL, E.; BLOCK, M.A.; BRUN, D.; MASUDA, T.; SHIMADA, H.; TAKAMIYA, K.; OHTA, H.; JOYARD, J. Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v.98, p.10960-10965, 2001.
- BAGARD, M.; LE THIEC, D.; DELACOTE, E.; HASENFRATZ-SAUDER, M.-P.; BANVOY, J.; GÉRARD, J.; DIZENGREMEL, P.; JOLIVET, Y. Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. **Physiologia Plantarum** v.134, p.559-574, 2008.
- BEISSON, F.; KOO, A.J.; RUUSKA, S.; SCHWENDER, J.; POLLARD, M.; THELEN, J.J.; PADDOCK, T.; SALAS, J.J.; SAVAGE, L.; MILCAMPS, A.; MHASKE, V.B.; CHO, Y.; OHLROGGE, J.B. *Arabidopsis* genes involved in acyl lipid metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tags in organs, and a web-based database. **Plant Physiology** v.132, p.681-697, 2003.
- BLANCO, F.M. Flora de Filipinas [...] Gran edicion [...] [Atlas II], 1980-1983.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology** v. 37(8), p.911-917, 1959.
- BLOCK, M.A.; DOUCE, R.; JOYARD, J.; ROLLAND, N. Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the cytosol. **Photosynthesis Research** v.92, p.225-244, 2007.

BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K.V. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. **Plant Physiology and Biochemistry** v.48 (5), p.359-373, 2010.

BOHLER, S.; SERGEANT, K.; JOLIVET, Y.; HOFFMANN, L.; HAUSMAN, J-F.; DIZENGREMEL, P.; RENAUT, J. A physiological and proteomic study of poplar leaves during ozone exposure combined with mild drought. **Proteomics** v.13, p.1737-1754, 2013.

BOLOGNESE, C.P.; MCGRAW, P. The isolation and characterization in yeast of a gene for *Arabidopsis* S-adenosylmethionine:phospho-ethanolamine N-methyltransferase. **Plant Physiology** v.124, p.1800-1813, 2000.

BOOKER, F.; MUNTIFERING, R.; MCGRATH, M.; BURKEY, K.; DECOTEAU, D.; FISCUS, E.; MANNING, W.; KRUPA, S.; CHAPPELKA, A.; GRANTZ, D. The ozone component of global change: potential effects on agricultural and horticultural plant yield, product quality and interactions with invasive species. **Journal of Integrative Plant Biology** v.51, p.337-351, 2009.

BOTA, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? **New Phytologist** v.162, p.671-681, 2004.

CALATAYUD, A.; BARRENO, E. Chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl. **Environmental Pollution** v.115, p.283-289, 2001.

CALATAYUD, A.; BARRENO, E. Response to ozone in two lettuce varieties on chlorophyll a fluorescence, photosynthetic pigments and lipid peroxidation. **Plant Physiology and Biochemistry** v.42, p.549-555, 2004.

CAMPOS, P.S.; PHAM THI, A.T. Effects of an abscisic acid pretreatment on membrane leakage and lipid composition of *Vigna unguiculata* leaf discs subjected to osmotic stress. **Plant Science** v.130, p.11-18, 1997

CARLSSON, A.S.; HELLGREN, L.I.; SELLDÉN, G.; SANDELIUS, S. Effects of moderately enhanced levels of ozone on the acyl lipid composition of the leaves of garden pea (*Pisum sativum*). **Physiologia Plantarum** v.91, p.754-762, 1994.

CARLSSON, A.S.; WALLIN, G.; SANDELIUS, S. Species- and age-dependent sensitivity to ozone in young plants of pea, wheat and spinach: effects on acyl lipid and pigment content and metabolism. **Physiologia Plantarum** v.98, p.271-280, 1996.

CASTILLO, F.J.; GREPPIN, H. Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. **Environmental and Experimental Botany** v.28, p.231-238, 1988.

CHEN, L.J.; LI, H.M. A mutant deficient in the plastid lipid DGD is defective in protein import into chloroplasts. **The Plant Journal** v.16, p.33-39, 1998.

CHOI, Y.H.; LEE, J.K.; LEE, C.H.; CHO, S.H. cDNA cloning and expression of an aminoalcoholphosphotransferase isoform in *Chinese cabbage*. **Plant Cell Physiology** v.41, p.1080-1084, 2000.

CITADIN, C. T.; IBRAHIM, A.B.; ARAGÃO, F.J. Genetic engineering in cowpea (*Vigna Unguiculata*): history, status and prospects. **GM Crops** v.2(3), p.144-149, 2011.

Climate Change and Food Security: Tropospheric (ground level) ozone.  
Disponível em: <[http://climatechange-foodsecurity.org/trop\\_ozone.html](http://climatechange-foodsecurity.org/trop_ozone.html)>. Acesso em: 18 ago. 2014.

COMINELLI, E.; CONTI, L.; TONELLI, C.; GALBIATI, M. Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. **New Biotechnology**, 2012.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.001>.

CONDE, A.; CHAVES, M.M.; GERÓS, H. Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress. **Plant Cell Physiology** v.52, p.1583-1602, 2011.

CONTOUR-ANSEL, D.; TORRES-FRANKLIN, M.L.; CRUZ DE CARVALHO, M.H.; D'ARCY-LAMETA, A.; ZUILY-FODIL, Y. 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** v.98, p.1279-1287, 2006.

CRUZ DE CARVALHO, M.H. Drought stress and reactive oxygen species. **Plant Signaling & Behavior** v.3, p.156-165, 2008.

CRUZ DE CARVALHO, M.H.; LAFFRAY, D.; LOUGUET, P. Comparison of the physiological responses of *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* cultivars when submitted to drought conditions. **Environmental and Experimental Botany** v.40, p.197-207, 1998.

D'ARCY-LAMETA, A., FERRARI-ILIOU, R., CONTOUR-ANSEL, D., PHAM-THI, A.-T., ZUILY-FODIL, Y. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cdnas responsive to water deficit in cowpea leaves. **Annals of Botany** v.97, p.133-140, 2006.

DAI, A. Drought under global warming: a review. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change** v.2, p.45-65, 2011.

DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F.J.; PALMA, J.M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant Physiology** v.141, p.330-335, 2006.

DELHAIZE, E.; HEBB, D.M.; RICHARDS, K.D.; LIN, J.M.; RYAN, P.R.; GARDNER, R.C. Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA. Overexpression in plants alters the composition of phospholipids. **The Journal of Biological Chemistry** v.274, p.7082-7088, 1999.

DEWEY, R.E.; WILSON, R.F.; NOVITZKY, W.P.; GOODE, J.H. The AAPT1 gene of soybean complements a cholinephosphotransferase-deficient mutant of yeast. **Plant Cell** v.6, p.1495-1507, 1994.

DGHIM, A.A.; DUMONT, J.; HASENFRATZ-SAUDER, M.P.; DIZENGREMEL, P.; THIEC, D.L.; JOLIVET Y. Capacity for NADPH regeneration in the leaves of two poplar genotypes differing in ozone sensitivity. **Physiologia Plantarum**, 2012. doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01686.x.

DIDYK, N.P.; BLUM, O.B. Natural antioxidants of plant origin against ozone damage of sensitive crops. **Acta Physiologiae Plantarum** v.33, p.25-34, 2011.

DIZENGREMEL, P. Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. **Plant Physiology and Biochemistry** v.39 (9), p.729-742, 2001.

DÖRMANN, P.; BALBO, I.; BENNING, C. *Arabidopsis* galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. **Science** v.284, p.2181-2184, 1999.

DÖRMANN, P.; BENNING, C. Galactolipids rule in seed plants. **Trends in Plant Science** v.7, p.112-118, 2002.

DÖRMANN, P.; HOFFMANN-BENNING, S.; BALBO, I.; BENNING C. Isolation and Characterization of an *Arabidopsis* Mutant Deficient in the Thylakoid Lipid Digalactosyl Diacylglycerol. **Plant Cell** v.7, p.1801-1810, 1995.

DUMONT, J.; SPICHER, F.; MONTPIED, P.; DIZENGREMEL, P.; JOLIVET, Y.; LE THIEC, D. Effects of ozone on stomatal responses to environmental parameters (blue light, red light, CO<sub>2</sub> and vapour pressure deficit) in three *Populus deltoides* x *Populus nigra* genotypes. **Environmental Pollution** v.173, p.85-96, 2013.

DUTRA, A.S.; TEÓFILO, E.M. Envelhecimento acelerado para avaliar o vigor de sementes de feijão caupi. **Revista Brasileira de Sementes**, 2006. doi: 10.1590/S0101-31222007000100027.

EL-MAAROUF, H.; D'ARCY-LAMETA, A.; GAREIL, M.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A.-T. Cloning and expression under drought of cDNA coding for two PI-PLCs in cowpea leaves. **Plant Physiology and Biochemistry** v.39, p.167-172, 2001.

EL-MAAROUF, H.; ZUILY-FODIL, Y.; GAREIL, M.; D' ARCY-LAMETA, A.; PHAM-THI, A.T. 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** v.39, p.1257-1265, 1999.

FANGMEIER, A.; BRUNSCHÖN, S.; JÄGER, H.-J. Time course of oxidant stress biomarkers in flag leaves of wheat exposed to ozone and drought stress. **New Phytologist** v.126, p.63-69, 1994.

FENG, Z.; KOBAYASHI, K. Assessing the impacts of current and future concentrations of surface ozone on crop yield with meta-analysis. **Atmospheric Environment** v.43, p.1510-1519, 2009.

FERY, R. Development of improved southern pea varieties for the southern United States: an update on the USDA effort. **Vegetable Association Yearbook (North Carolina Vegetable Growers Association)**, v.53, 2002.

FINLAYSON-PITTS, B.J.; PITTS, J.N. Atmospheric chemistry of tropospheric ozone formation: scientific and regulatory implications. **Air & Waste** v.43, p.1091-1100, 1993.

FISCUS, E.L.; BOOKER, F.L.; BURKEY, K.O. Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. **Plant, Cell & Environment** v.28, p.997-1011, 2005.

FONG, F.; HEATH, R.L. Lipid-content in the primary leaf of bean (*Phaseolus vulgaris*) after ozone fumigation. **Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie** v.104, p.109-115, 1981.

FRANÇA, M.G.C.; MATOS, A.R.; D'ARCY-LAMETA, A.; PASSAQUET, C.; LICHTLÉ, C.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A.T. Cloning and characterization of drought-stimulated phosphatidic acid phosphatase genes from *Vigna unguiculata*. **Plant Physiology and Biochemistry** v.46, p.1093-1100, 2008.

FRENTZEN, M. Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. **Current Opinion in Plant Biology** v.7, p.270-276, 2004.

FRENTZEN, M.; GRIEBAU, R. Biosynthesis of cardiolipin in plant mitochondria. **Plant Physiology** v.106, p.1527-1532, 1994.

FROEHLICH, J.E.; BENNING, C.; DÖRMANN, P. The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry** v.276, p.31806-31812, 2001.

GIGON, A.; MATOS, A.-R.; LAFFRAY, D.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A.-T. Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). **Annals of Botany** v.94, p.345-351, 2004.



GOLLDACK, D.; LI, C.; MOHAN, H.; PROBST, N. Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. **Frontiers in Plant Science** v.5, Article 151, 2014. doi: 10.3389/fpls.2014.00151.

GUERFEL, M.; BACCOURI, O.; BOUJNAH, D.; ZARROUK, M. Changes in lipid composition, water relations and gas exchange in leaves of two young “Chemlali” and “Chetoui” olive trees in response to water stress. **Plant Soil** v.311, p.121-129, 2008.

GUIDI, L.; DEGL'INNOCENTI, E.; SOLDATINI, G.F. Assimilation of CO<sub>2</sub>, enzyme activation and photosynthetic electron transport in bean leaves, as affected by high light and ozone. **New Phytologist** v.156, p.377-388, 2002.

GUIDI, L.; DI CAGNO, R.; SOLDATINI, G.F. Screening of bean cultivars for their response to ozone as evaluated by visible symptoms and leaf chlorophyll fluorescence. **Environmental Pollution** v.107, p.349-355, 2000.

GUO, L.; DEVAIAH, S.P.; NARASIMHAN, R.; PAN, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, W.; WANG, X. Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with phospholipase D $\delta$  to transduce hydrogen peroxide signals in the *Arabidopsis* response to stress. **Plant Cell** v.24, p.2200-2212, 2012a.

HÄRTEL, H.; DÖRMANN, P.; BENNING, C. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids following phosphate deprivation in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v.97, p.10649-10654, 2000.

HÄRTEL, H.; DÖRMANN, P.; BENNING, C. Galactolipids not associated with the photosynthetic apparatus in phosphate-deprived plants. **Journal of Photochemistry and Photobiology B** v.61, p.46-51, 2001.

HÄRTEL, H.; LOKSTEIN, H.; DOÖRMANN, P.; GRIMM, B.; BENNING C. Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology** v.115, p.1175-1184, 1997.

HARWOOD, J.L. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1301, p.7-56, 1996.

HELLGREN, L.I.; SELLDÉN, G.; SANDELIUS, A.S. Effects of moderately enhanced levels of ozone on the acyl lipid composition and dynamical properties of plasma membranes isolated from garden pea (*Pisum sativum*). **Physiologia Plantarum** v.111, p.165-171, 2001.

HOLLAND, M.; KINGHORN, S.; EMBERSON, L.; CINDERBY, S.; ASHMORE, M.; MILLS, G.E.; HARMENS, H. Development of a framework for probabilistic assessment of the economic losses caused by ozone damage to crops in Europe (Report). **NERC/Centre for Ecology and Hydrology**, 2006.

HONG Y.; ZHENG S.; WANG X. Dual functions of phospholipase D alpha1 in plant response to drought. **Molecular Plant** v.1, p.262-269, 2008a.

HONG, Y.; DEVAIAH, S.P.; BAHN, S.C.; THAMASANDRA, B.N.; LI, M.; WELTI, R.; WANG, X. Phospholipase D $\alpha$  and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth. **The Plant Journal** v.58, p.376-387, 2009.

HONG, Y.; ZHANG, W.; WANG, X. Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. **Plant, Cell & Environment** v.33, p.627-635, 2010.

HONG, Y.Y.; PAN, X.Q.; WELTI, R.; WANG, X.M. Phospholipase D alpha 3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis*. **Plant Cell** v.20, p.803-816, 2008b.

HOREMANS, N.; FOYER, C.H.; ASARD, H. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. **Trends in Plant Science** v.5, p.263-267, 2000.

INATSUGI, R.; NAKAMURA, M.; NISHIDA, I. Phosphatidylcholine biosynthesis at low temperature: differential expression of CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase isogenes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiology** v.43, p.1342-1350, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro, 2001. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 18 ago. 2014.

JACOB, F.; MONOD, J. Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. **Journal of Molecular Biology** v.3, p.318-3356, 1961.

JARVIS, P.; DÖRMANN, P.; PETO, C.A.; LUTES, J.; BENNING, C.; CHORY, J. Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis MGD synthase 1* mutant. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v.97, p.8175-8179, 2000.

JENKIN, M.E.; CLEMITSHAW, K.C. Ozone and other secondary photochemical pollutants: chemical processes governing their formation in the planetary boundary layer. **Atmospheric Environment** v.34, p.2499-2527, 2000.

JÚNIOR, R.R.M.; OLIVEIRA, M.S.C.; BACCACHE, M.A.; MONTEIRO DE PAULA, F. effects of water deficit and rehydration on the polar lipid and membranes resistance leaves of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Pérola. **Brazilian Archives of Biology and Technology** v.51 (2), p.361-367, 2008.

KANGASJÄRVI, J.; JASPERS, P.; KOLLIST, H. Signalling and cell death in ozone-exposed plants. **Plant, Cell & Environment** v.28, p.1021-1036, 2005.

KANGASJÄRVI, J.; TALVINEN, J.; UTRIAINEN, M.; KARJALAINEN, R. Plant defence systems induced by ozone. **Plant, Cell & Environment** v.17, p.783-794, 1994.

KAR, R.K. Plant responses to water stress. Role of reactive oxygen species. **Plant Signaling & Behavior** v.6 (11), p.1741-1745, 2011.

KARLSSON, P.E.; MEDIN, E.-L.; WICKSTRÖM, H.; SELLDEN, G.; WALLIN, G.; OTTOSSON, S.; SKÄRBY L. Ozone and drought stress: interactive effects on the growth and physiology of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). **Water, Air and Soil Pollution** v.85, p.1325-1330, 1995.

KATAYAMA, K.; SAKURAI, I.; WADA, H. Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene for cardiolipin synthase located in mitochondria. **FEBS Letters** v.577, p.193-198, 2004.

KELLY, A.A.; DÖRMANN, P. *DGD2*, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. **The Journal of Biological Chemistry** v.277, p.1166-1173, 2002.

KELLY, A.A.; FROEHLICH, J.E.; DÖRMANN, P. Disruption of the Two Digalactosyldiacylglycerol Synthase Genes *DGD1* and *DGD2* in *Arabidopsis* Reveals the Existence of an Additional Enzyme of Galactolipid Synthesis. **Plant Cell** v.15, p.2694-2706, 2003.

KHAN, S., SOJA, G. Yield responses of wheat to ozone exposure as modified by drought-induced differences in ozone uptake. **Water, Air, & Soil Pollution** v.147, p.299-315, 2003.

KINNEY, A.J. Phospholipid head groups. In **Lipid Metabolism in Plants**. Ed. T.S. Moore, p.259-284. Boca Raton. CRC Press, 1993.

KISSOUDIS, C.; VAN DE WIEL, C.; VISSER R.G.F.; VAN DER LINDEN G. Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. **Plant Science**, 2014. doi: 10.3389/fpls.2014.00207.

KOBAYASHI, K.; AWAI, K.; TAKAMIYA, K.; OHTA, H. *Arabidopsis* type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. **Plant Physiology** v.134, p.640-648, 2004.

KREUZWIESER, J.; GESSLER, A. Global climate change and tree nutrition: influence of water availability. **Tree Physiology** v.30, p.1221-1234, 2010.

LANGEBARTELS, C.; SCHRAUDNER, M.; HELLER, W.; ERNST, D.; SANDERMANN, H. Oxidative stress and defense reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation. In INZE, D.; VAN MONTAGU, M., eds, **Oxidative Stress in Plants**. Taylor and Francis, London, p.105-135, 2002.

LANGEBARTELS, C.; WOHLGEMUTH, H.; KSCHIESCHAN, S.; GRUN, S.; SANDERMANN, H. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. **Plant Physiology and Biochemistry** v.40, p.567-575, 2002.

- LARSSON, K.E.; NYSTROM, B.; LILJENBERG, C. A phosphatidylserine decarboxylase activity in root cells of oat (*Avena sativa*) is involved in altering membrane phospholipid composition during drought stress acclimation. **Plant Physiology and Biochemistry** v.44, p.211-219, 2006.
- LAURIANO, J.A.; LIDON, F.C.; CARVALHO, C.A.; CAMPOS, P.S.; MATOS, M. DO C. Drought effects on membrane lipids and photosynthetic activity in different peanut cultivars. **Photosynthetica** v.38, p.7-12, 2000.
- LE COMTE, D. 1996 Weather highlights: around the world. **Weatherwise** v.50, p.25-27, 1997.
- LEE A.G. Membrane lipids: it's only a phase. **Current Biology** v.10, p.377-380, 2000.
- LEITAO, L.; DELACÔTE, E.; DIZENGREMEL, P.; LE THIEC, D.; BIOLLEY, J.-P. Assessment of the impact of increasing concentrations of ozone on photosynthetic components of maize (*Zea mays* L.), a C4 plant. **Environmental Pollution** v.146, p.5-8, 2007.
- LEVITT, J. Responses of plants to environmental stresses. In: **Chilling, Freezing and High Temperature Stresses**, Vol. I, 2nd ed. Academic Press, New York, NY, 1980.
- LI, H.; SHERMAN, L.A. A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. **Journal of Bacteriology** v.182, p.4268-4277, 2000.
- LI, M.; WELTI, R.; WANG, X. Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases D $\zeta$ 1 and D $\zeta$ 2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. **Plant Physiology** v.142, p.756-761, 2006b.
- LI-BEISSON, Y.; SHORROSH, B.; BEISSON, F. *et al.* Acyl-lipid metabolism. **The Arabidopsis Book** v.11, e0133, 2013.
- LOMBARDOZZI, D. L.; SPARKS, J. P.; BONAN, G. B.; LEVIS, S. Ozone exposure causes a decoupling of conductance and photosynthesis: implications for the Ball-Berry stomatal conductance model. **Oecologia** v.169, p.651-659, 2012.
- LOS, D.A.; MURATA, N. Structure and expression of fatty acid desaturases. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1394, p.3-15, 1998.
- LUWE, M.; TAKAHAMA, U.; HEBER, U. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. **Plant Physiology** v.101, p.969-976, 1993.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v.444, p.139-158, 2005.

MARÉCHAL, E.; BLOCK, M.A.; JOYARD, J.; DOUCE, R. Kinetic properties of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. **The Journal of Biological Chemistry** v.269, p.5788-5798, 1994a.

MARÉCHAL, E.; BLOCK, M.A.; JOYARD, J.; DOUCE, R. Comparison of the kinetic properties of MGDG synthase in mixed micelles and in envelope membranes from spinach chloroplast. **FEBS Letters** v.352, p.307-310, 1994b.

MARSHALL, O.J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics** v.20(15), p.2471-2472, 2004.

MATOS, A-R.; D' ARCY-LAMETA, A.; FRANÇA, M.; PÊTRES, S.; EDELMAN, L.; KADER, J.-C.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A-T. A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. **FEBS Letters** v.491, p.188-192, 2001.

MATOS, A-R.; GIGON, A.; LAFFRAY, D.; PÊTRES, S.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A.-T. Effects of progressive drought stress on the expression of patatin-like lipid acyl hydrolase genes in *Arabidopsis* leaves. **Physiologia Plantarum** v.134, p.110-120, 2008.

MATOS, A-R.; PHAM-THI, A.-T. Lipid deacylating enzymes in plants: Old activities, new genes. **Plant Physiology and Biochemistry** v.47, p.491-503, 2009.

MATYSSEK, R.; LE THIEC, D.; LÖW, M.; DIZENGREMEL, P.; NUNN, A.J.; HÄBERLE, K.-H. Interactions between drought and O<sub>3</sub> stress in forest trees. **Plant Biology** v.1, p.11-17, 2005.

MCAINSH, M.R.; EVANS, N.H.; MONTGOMERY, L.T.; NORTH, K.A. Calcium signalling in stomatal responses to pollutants. **New Phytologist** v.153, p.441-447, 2002.

MCCARTNEY, A.W.; DYER, J.M.; DHANOA, P.K.; KIM, P.K.; ANDREWS, D.W.; MCNEW, J.A.; MULLEN, R.T. Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted cotranslationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini. **The Plant Journal** v.37, p.156-173, 2004.

MEKHEDOV, S.; ILARDUYA, O.M.; OHLROGGE, J. Toward a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis. **Plant Physiology** v.122, p.389-401, 2000.

MEYER, S.; GENTY, B. Mapping intercellular CO<sub>2</sub> mole fraction (C<sub>i</sub>) in *Rosa rubiginosa* leaves fed with abscisic acid by using chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology** v.116, p.947-957, 1998.

MIÈGE, C.; MARÉCHAL, E.; SHIMOJIMA, M.; AWAI, K.; BLOCK, M.A.; OHTA, H.; TAKAMIYA, K.; DOUCE, R.; JOYARD, J. Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. **European Journal of Biochemistry** v.265, p.990-1001, 1999.

MILLS, G.; BUSE, A.; GIMENO, B.; BERMEJO, V.; HOLLAND, M.; EMBERSON, L.; PLEIJEL, H. A synthesis of AOT40-based response functions and critical levels of ozone for agricultural and horticultural crops. **Atmospheric Environment** v.41, p.2630-2643, 2007.

MILLS, G.; PLEIJEL, H.; BÜKER, P.; BRAUN, S.; EMBERSON, L.; HARMENS, H.; SIMPSON, D., *et al.* Chapter 3: Mapping Critical Levels for Vegetation Recent. **Mapping Manual** v.2004, p. 100-114, 2011.

MISHRA, A.K.; SINGH, V.P. A review of drought concepts. **Journal of Hydrology** v.391, p.202-216, 2010.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science** v.11, p.15-19, 2006.

MITTLER, R.; BLUMWALD, E. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. **Annual Review of Plant Biology** v. 61, p. 443-62, 2010.

MONKS, D.E.; GOODE, J.H.; DEWEY, R.E. Characterization of soybean choline kinase cDNAs and their expression in yeast and *Escherichia coli*. **Plant Physiology** v.110, p.1197-1205, 1996.

MONTEIRO DE PAULA, F.; PHAM-THI, A-T.; ZUILY-FODIL, Y.; FERRARI-ILIOU, R.; VIEIRA DA SILVA, J.; MAZLIAK, P. Effect of water stress on the biosynthesis and degradation of polyunsaturated lipid molecular species in leaves of *Vigna unguiculata*. **Plant Physiology and Biochemistry** v.31, p.707-715, 1993.

MONTEIRO DE PAULA, F.; PHAM-THI, A-T.; DE SILVA, J.V.; JUSTIN, A.M.; DEMANDRE, C.; MAZLIAK, P. Effects of water stress on the molecular species composition of polar lipids from *Vigna unguiculata* L. leaves. **Plant Science** v.66, p.185-193, 1990.

MOORE, T.S. Phospholipid biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology** v.33, p.325-359, 1982.

MORGAN, P.B.; AINSWORTH, E. A.; LONG, S.P. How does elevated ozone impact soybean? A meta-analysis of photosynthesis, growth and yield. **Plant, Cell & Environment** v.26, p.1317-1328, 2003.

MUDD, J.B.; MCMANUS, T.T.; ONGUN, A.; MCCULLOGH, T.E. Inhibition of glycolipid biosynthesis in chloroplasts by ozone and sulfhydryl reagents. **Plant Physiology** v.48, p.335-339, 1971.

MUDD, S.H.; DATKO, A.H. Synthesis of ethanolamine and its regulation in *Lemna paucicostata*. **Plant Physiology** 91, 587-597, 1989.

MÜLLER, F.; FRENTZEN, M. Phosphatidylglycerophosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters** v.509, p.298-302, 2001.

MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. **Functional Plant Biology** v.31, p.203-216, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd edition, Worth Publishers: New York, ISBN 1-57259-9316. 1255 pp., 2010.

NELSON, G.C.; VALIN, H.; SANDS, R.D.; HAVLIK, P.; AHAMMAD, H.; DERYNGE, D., *et al.* Climate change effects on agriculture: economic responses to biophysical shocks. **PNAS** v. 111 (9), 2014. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1222465110](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1222465110).

NISHIUCHI, T.; IBA K. Roles of plastid omega-3 fatty acid desaturases in defense response of higher plants. **Journal of Plant Research** v.111, p.481-486, 1998.

NOUCHI, I.; TOYAMA, S. Effects of ozone and peroxyacetyl nitrate on polar lipids and fatty acids in leaves of morning glory and kidney bean. **Plant Physiology** v.87, p.638-646, 1988.

NOWICKI, M.; MÜLLER, F.; FRENTZEN, M. Cardiolipin synthase of *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters** v.579, p.2161-2165, 2005.

NUCCIO, M.L.; ZIEMAK, M.J.; HENRY, S.A.; WERETILNYK, E.A.; HANSON, A.D. cDNA cloning of phosphoethanolamine N-methyltransferase from spinach by complementation in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of the recombinant enzyme. **The Journal of Biological Chemistry** v.275, p.14095-14101, 2000.

OHLROGGE, J.; BROWSE, J. Lipid biosynthesis. **Plant Cell** v.7, p.957-970, 1995.

OLTMANS, S.J.; LEFOHN, A.S.; HARRIS, J.M.; GALBALLY, I.; SCHEEL, H.E.; BODEKER, G.; BRUNKE, E.; CLAUDE, H.; TARASICK, D.; JOHNSON, B.J.; SIMMONDS, P.; SHADWICK, D.; ANLAUF, K.; HAYDEN, K.; SCHMIDLIN, F.; FUJIMOTO, T.; AKAGI, K.; MEYER, C.; NICHOL, S.; DAVIES, J.; REDONDAS, A.; CUEVAS, E. Long-term changes in tropospheric ozone. **Atmospheric Environment** v.40, p.3156-3173, 2006.

OSAKABE, Y.; OSAKABE, K.; SHINOZAKI, K.; TRAN, L.S. Response of plants to water stress. **Frontiers in Plant Science** v.13 (5), p. 86, 2014.

PÄÄKKÖNEN, E.; VAHALA, J.; POHJOLA, M.; HOLOPAINEN, T.; KÄRENLAMPI, L. Physiological, stomatal and ultrastructural ozone responses in birch (*Betula pendula* Roth.) are modified by water stress. **Plant, Cell & Environment** v.21, p.671-684, 1998.

PAN, R.; JONES, A.D.; HU, J. Cardiolipin-mediated mitochondrial dynamics and stress response in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** v.26, p.391-409, 2014.

PAOLETTI, E.; GRULKE, N.E. Ozone exposure and stomatal sluggishness in different plant physiognomic classes. **Environmental Pollution** v.158, p.2664-2671, 2010.

PAOLETTI, E.; MANNING, W.J. Toward a biologically significant and usable standard for ozone that will also protect plants. **Environmental Pollution** v.150, p.85-95, 2007.

PARRISH, D. D.; LAW, K. S.; STAEHELIN, J.; DERWENT, R.; COOPER, O. R.; TANIMOTO, H.; VOLZ-THOMAS, A.; GILGE, S.; SCHEEL, H.-E.; STEINBACHER, M.; CHAN, E. Long-term changes in lower tropospheric baseline ozone concentrations at northern mid-latitudes. **Atmospheric, Chemistry and Physics** v.12, p.11485-11504, 2012.

PELL, E. J.; SCHLAGNHAUFER, C.D.; ARTECA, R.N. Ozone-induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. **Physiologia Plantarum** v.100, p.264-273, 1997.

PELL, E.J.; ECKARDT, N.A.; GLICK, R.E. Biochemical and molecular basis for impairment of photosynthetic potential. **Photosynthesis Research** v.39, p.453-462, 1994.

PHAM-THI, A-T.; BORREL-FLOOD, C.; VIEIRA DA SILVA, J.; JUSTIN, A.M.; MAZLIAK, P. Effects of water stress on lipid metabolism in cotton leaves. **Phytochemistry** v.24, p.723-727, 1985.

PINEAU, B.; BOURGE, M.; MARION, J.; MAUVE, C.; GILARD, F.; MANETA-PEYRET, L.; MOREAU, P.; SATIAT-JEUNEMAITRE, B.; BROWN, S.C.; DE PAEPE, R.; DANON, A. The importance of cardiolipin synthase for mitochondrial ultrastructure, respiratory function, plant development, and stress responses in *Arabidopsis*. **Plant Cell** v.25, p.4195-4208, 2013.

QIN, C.; WANG, X. The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD $\zeta$ 1 with distinct regulatory domains. **Plant Physiology** v.128, p.1057-1068, 2002.

QUARTACCI, M.F.; PINZINO, C.; SGHERRI, C.; NAVARI-IZZO, F. Lipid composition and protein dynamics in thylakoids of two wheat cultivars differently sensitive to drought. **Plant Physiology** v.108, p.191-197, 1995.

QUIN, F. M. Introduction. In SING, B. B.; MOHAN RAJ, D. R.; DASHIEL, K. E.; JACKAI, L. E. N. **Advances in Cowpea Research** (Ibadan: II., p. ix-xv), 1997.

REDDY, A.R.; CHAITANYAA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology** v.161, p.1189-1202, 2004.

RENAUT, J.; BOHLER, S.; HAUSMAN, J.-F.; HOFFMANN, L.; SERGEANT, K.; AHSAN, N.; JOLIVET, Y.; DIZENGREMEL, P. The impact of atmospheric composition on plants: a case study of ozone and poplar. **Mass Spectrometry Reviews** v.28, p.495-516, 2009.



- REPELLIN A.; PHAM-THI A-T; TASHAKORIE A.; SAHSAH Y.; DANIEL C.; ZUILY-FODIL Y. Leaf membrane lipids and drought tolerance in young coconut palms (*Cocos nucifera* L.). **European Journal of Agronomy** v.6, p.25-33, 1997.
- RONTEIN, D.; RHODES, D.; HANSON, A.D. Evidence from engineering that decarboxylation of free serine is the major source of ethanolamine moieties in plants. **Plant Cell Physiology** v.44, p.1185-1191, 2003a.
- RONTEIN, D.; WU, W.I.; VOELKER, D.R.; HANSON, A.D. Mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase from higher plants. Functional complementation in yeast, localization in plants, and overexpression in *Arabidopsis*. **Plant Physiology** v.132, p.1678-1687, 2003b.
- ROWLAND, F.S. Stratospheric ozone depletion. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** v.361, p.769-790, 2006.
- RUDOLPHI-SKORSKA, E.; FILEK, M.; ZEMBALA, M. Physicochemical aspects of reaction of ozone with galactolipid and galactolipid-tocopherol layers. **The Journal of Membrane Biology** v.247, p.639-649, 2014.
- SAHSAH, Y.; CAMPOS, P.; GAREIL, M.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A-T. Enzymatic degradation of polar lipids in *Vigna unguiculata* leaves and influence of drought stress. **Physiologia Plantarum** v.104, p.577-586, 1998.
- SAHSAH, Y.; PHAM THI, A-T.; ROY-MACAULEY, H.; D'ARCY-LAMETA, A.; REPELLIN, A.; ZUILY-FODIL, Y. Purification and characterization of a soluble lipolytic acylhydrolase from cowpea (*Vigna unguiculata* L.) leaves. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1215, p.66-73, 1994.
- SAIRAM, R.K.; DESHMUKH, P.S.; SAXENA, D.C. Role of antioxidant systems in wheat genotype tolerance to water stress. **Biologia Plantarum** v.41(3), p.387-394, 1998.
- SAKAKI, T.; KONDO, N.; YAMADA, M. Pathway for the synthesis of triacylglycerols from monogalactosyldiacylglycerols in ozone-fumigated spinach leaves. **Plant Physiology** v.94, p.773-780, 1990.
- SAKAKI, T.; KATO, T.; SAJI, H. Lipid acyl-hydrolase in leaves of different kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars: Purification and characterization of a kidney bean lipid acyl-hydrolase, and foliar lipid changes in the cultivars with ozone exposure. **Plant Science** v.172, p.462-472, 2007.
- SAKAKI, T.; SAITO, K.; KAWAGUCHI, A.; KONDO, N.; YAMADA, M. Conversion of monogalactosyldiacylglycerols to triacylglycerols in ozone-fumigated spinach leaves. **Plant Physiology** v.94, p.766-772, 1990.

SANDELIUS, A.S.; NÄSLUND, K.; CARLSSON, A.S.; PLEIJEL, H.; SELLDÉN, G. Exposure of spring wheat (*Triticum aestivum*) to ozone in open-top chambers. Effects on acyl lipid composition and chlorophyll content of flag leaves. **New Phytologist** v.131, p.231-239, 1995.

SANG, Y.; ZHENG, S.; LI, W.; HUANG, B.; WANG, X. Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D $\alpha$ . **The Plant Journal** v.28, p.135-144, 2001.

SCHERER, G.F.E.; RYU, S.B.; WANG, X.; MATOS, A-R.; HEITZ, T. Patatin-related phospholipase A: nomenclature, subfamilies and functions in plants. **Trends in Plant Science** v.15, p.693-700, 2010.

SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation** v.46, p.209-221, 2005.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, Article ID 217037, 26 pages, 2012.

SHARMA, Y.K.; DAVIS, K.R. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. **Free Radical Biology and Medicine** v.23, p.480-488, 1997.

SHIMOJIMA, M.; WATANABE, T.; MADOKA, Y.; KOIZUMI, R.; YAMAMOTO, M. P.; MASUDA, K., *et al.* Differential regulation of two types of monogalactosyldiacylglycerol synthase in membrane lipid remodeling under phosphate-limited conditions in sesame plants. **Frontiers in Plant Science** v.4:469, 2013. doi: 10.3389/fpls.2013.00469

SILVA, G.S. Nematóides. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: EMBRAPA, cap. 13, p.487-497, 2005.

SINGH, B. B.; TARAWALI, S. A. Cowpea and its improvement: key to sustainable mixed crop/livestock farming systems in West Africa. In: RENARD, C. (Ed.), **Crop residues in sustainable mixed crop/livestock farming system** p.79-100, 1997.

SLAMA, A. ; SALEM M.B. ; NACEUR, M.B. ; ZID, E. Les céréales en Tunisie : production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. **Sécheresse** v.16 (3), p.225-229, 2005.

SMIRNOFF, N.; CONKLIN, P.L.; LOEWUS, F.A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v.52, p.437-467, 2001.

SOLOMON, S. Stratospheric ozone depletion: a review of concepts and history. **Reviews of Geophysics** v.37, p.275-316, 1999.

SPRENT, J.I.; ODEE, D.W.; DAKORA, F.D. African legumes: a vital but under-utilized resource. **Journal of Experimental Botany** v.61 (5), p.1257-1265, 2010.

STANFORD, N. P.; SANTOS, D. R.; SILVA, V. M.; SANTOS, C. E. R. .; MONTEIRO, M. C. Fixação do N<sub>2</sub> e matéria seca do caupi em dois solos do semi-árido brasileiro submetidos à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v.14, p.283-290, 1990.

SUN, Y.; SOLOMON, S.; DAI, A.; PORTMANN, R.W. How often does it rain? **Journal of Climate** v.19, p.916-934, 2006.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** v.30, p.2725-2729, 2013.

TASSEVA, G.; RICHARD, L.; ZACHOWSKI, A. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis under salt stress involves choline kinase in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters** v.566, p.115-120, 2004.

TESTERINK, C.; MUNNIK, T. Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. **Trends in Plant Science** v.10, p.368-375, 2005.

TORRES-FRANKLIN, M.-L.; GIGON, A.; DE MELO, D.F.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A.-T. Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. **Physiologia Plantarum** v.131, p.201-210, 2007.

TORRES-FRANKLIN, M.-L.; REPELLIN, A.; HUYNH, V.-B.; D'ARCY-LAMETA, A.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A.-T. Omega-3 fatty acid desaturase (*FAD3*, *FAD7*, *FAD8*) gene expression and linolenic acid content in cowpea leaves submitted to drought and after rehydration. **Environmental and Experimental Botany** v.65, p.162-169, 2009.

UPCHURCH, R.G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. **Biotechnology Letters** v.30, p.967-977, 2008.

VAN MEER, G.; VOELKER, D.R.; FEIGENSON, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** v.9, p.112-124, 2008.

VANDESOMPELE, J. ; DE PRETER, K. ; PATTYN, F. ; POPPE, B. ; VAN ROY, N. ; DE PAEPE, A. ; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology** 3, RESEARCH0034, 2002.

VENEGAS-CALERÓN, M.; MURO-PASTOR, A.M.; GARCÉS, R.; MARTÍNEZ-FORCE, E. Functional characterization of a plastidial omega-3 desaturase from sunflower (*Helianthus annuus*) in cyanobacteria. **Plant Physiology and Biochemistry** v.44, p.517-525, 2006.

VERCOURT, B. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the "Flora of Tropical East Africa" IV. **Kew Bulletin** v.24 (3), p.507-569, 1970.

VINGARZAN, R. A review of surface ozone background levels and trends. **Atmospheric Environment** v.38, p.3431-3442, 2004.

VON GUNTEN, U. The basics of oxidants in water treatment. **Part B: Ozone Reactions** v. 55(12), p. 25-29, 2007.

WAGG, S.; MILLS, G.; HAYES, F.; WILKINSON, S.; COOPER, D.; DAVIES, W.J. Reduced soil water availability did not protect two competing grassland species from the negative effects of increasing background ozone. **Environmental Pollution** v.165, p.91-99, 2012.

WANG, X.; DEVAIAH, S.P.; ZHANG, W.; WELTI, R. Signaling functions of phosphatidic acid. **Progress in Lipid Research** v.45, p.250-278, 2006.

WANG, X.M.; MOORE, T.S. Phosphatidylcholine biosynthesis in castor bean endosperm. **Plant Physiology** v.93, p.250-255, 1990.

WEBB, M.S.; GREEN B.R. Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1060, p.133-158, 1991.

WHITAKER, B.D.; LEE, E.H; ROWLAND, R.A. EDU and ozone protection: foliar glycerolipids and steryl lipids in snapbean exposed to O<sub>3</sub>. **Physiologia Plantarum** v.80, p.286-293, 1990.

WILKINSON, S.; DAVIES, W.J. Ozone suppresses soil drying and abscisic acid (ABA)-induced stomatal closure via an ethylene-dependent mechanism. **Plant, Cell & Environment** v.32, p.949-959, 2009.

WILKINSON, S.; DAVIES, W.J. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. **Plant, Cell & Environment** v.33, p.510-525, 2010.

WILKINSON, S.; DAVIES, W.J. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. **Plant, Cell & Environment** v.25, p.195-210, 2002.

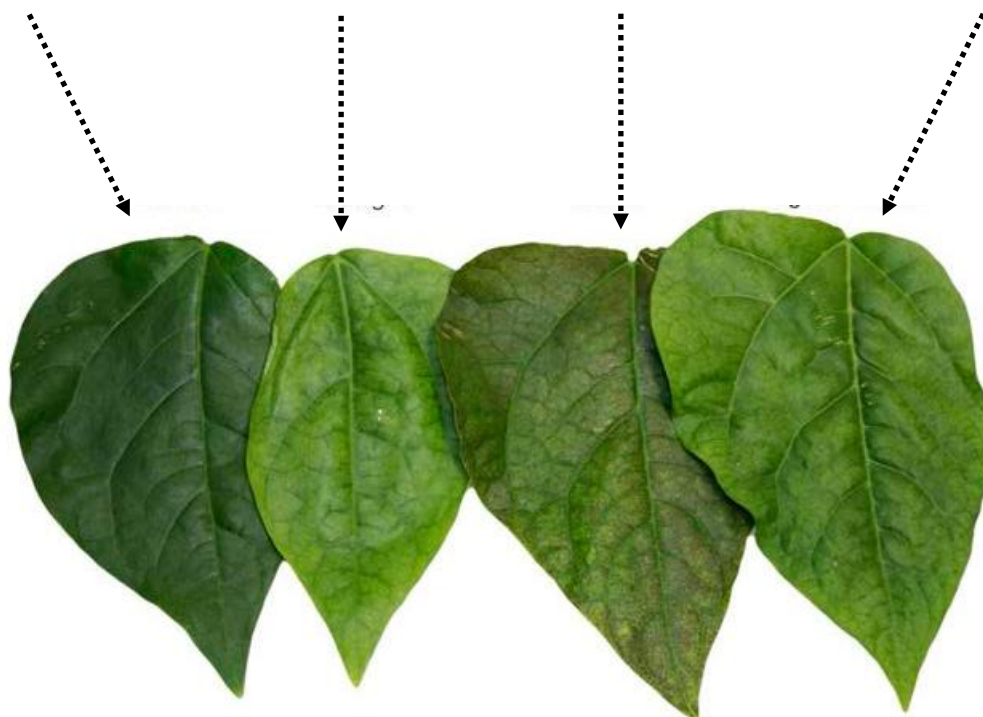
WILKINSON, S.; MILLS, G.; ILLIDGE, R.; DAVIES, W.J. How is ozone pollution reducing our food supply? **Journal of Experimental Botany**, 2012. doi:10.1093/jxb/err317

WITTIG, V.E.; AINSWORTH, E.A.; LONG, S.P. 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** v.30, p.1150-1162, 2007.

- WITTIG, V.E.; AINSWORTH, E.A.; NAIDU, S.L.; KARNOSKY, D.F.; LONG S.P. Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis. **Global Change Biology** v.15, p.396-424, 2009.
- WOLFENDEN, J.; WELLBURN, A.R. Effects of summer ozone on membrane lipid composition during subsequent frost hardening in Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst]. **New Phytology** v.118, p.323-329, 1991.
- YAENO, T.; MATSUDA, O.; IBA, K. Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. **The Plant Journal** v.40, p.931-941, 2004.
- YU, L.; NIE, J.; CAO, C.; JIN, Y.; YAN, M.; WANG, F.; LIU, J.; XIAO, Y.; LIANG, Y.; ZHANG, W. Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytology** v.188, p.762-773, 2010.
- ZHANG, M.; BARG, R.; YIN, M.; GUETA-DAHAN, Y.; LEIKIN-FRENKEL, A.; SALTS, Y.; SHABTAI, S.; BEN-HAYYIM, G. Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct omega-3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants. **The Plant Journal** v.44, p.361-371, 2005.
- ZHANG, W.; WANG, C.; QIN, C.; WOOD, T.; OLAFSDOTTIR, G.; WELTI, R.; WANG, X. The oleate-stimulated phospholipase D, PLDd, and phosphatidic acid decrease H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in *Arabidopsis*. **Plant Cell** v.15, p.2285-2295, 2003.
- ZHANG, Y.Y.; ZHU, H.Y.; ZHANG, Q.; LI, M.Y.; YAN, M.; WANG, R.; WANG, L.L.; WELTI, R.; ZHANG, W.H.; WANG, X.M. Phospholipase D alpha 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. **Plant Cell** v.21, p.2357-2377, 2009.



transportado pelo plasmídio, que codifica a  $\beta$ -galactosidase. Essa enzima hidrolisa o substrato X-Gal presente no meio de cultura, dando origem a um pigmento insolúvel azul brilhante, o 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo. Já as colônias que integraram o vetor recombinante, chamadas de positivas, permaneceram com coloração branca, pois a inserção do amplicon no sítio de policlonagem do plasmídio interrompe o gene *lacZ*, produzindo uma  $\beta$ -galactosidase inativa, não hidrolizando a X-Gal presente no meio de cultura.

**ANEXO 2:****Fotos das plantas e das folhas com 14 dias de tratamentos:****EPACE-1****Controle****Seca****Ozônio****Ozônio + Seca**



## IT83-D

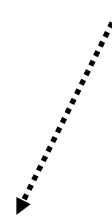
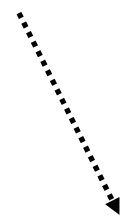


Controle

Seca

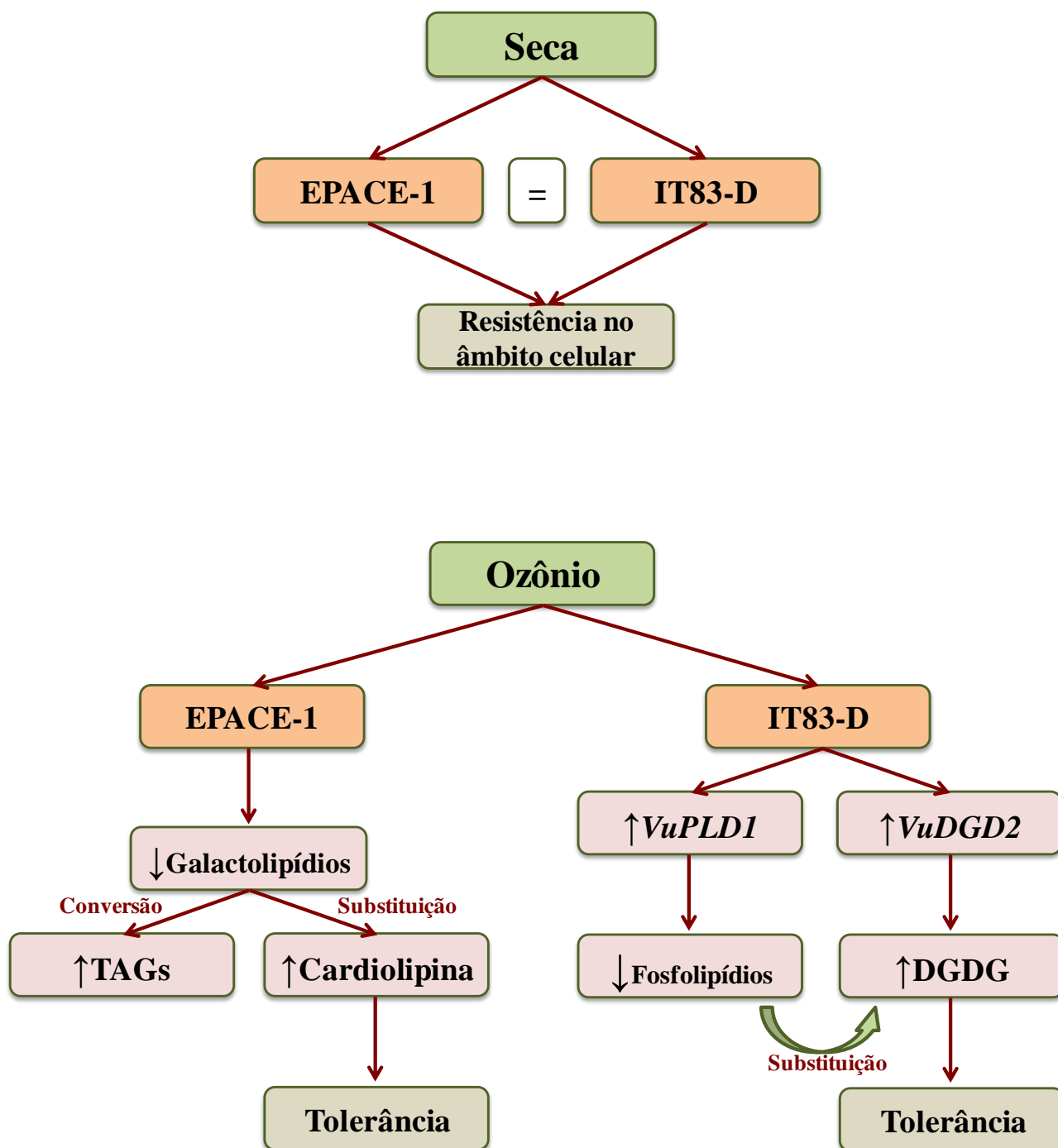
Ozônio

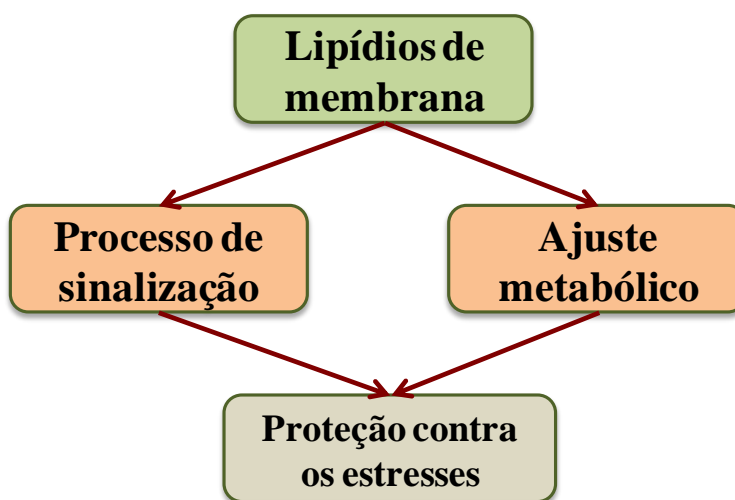
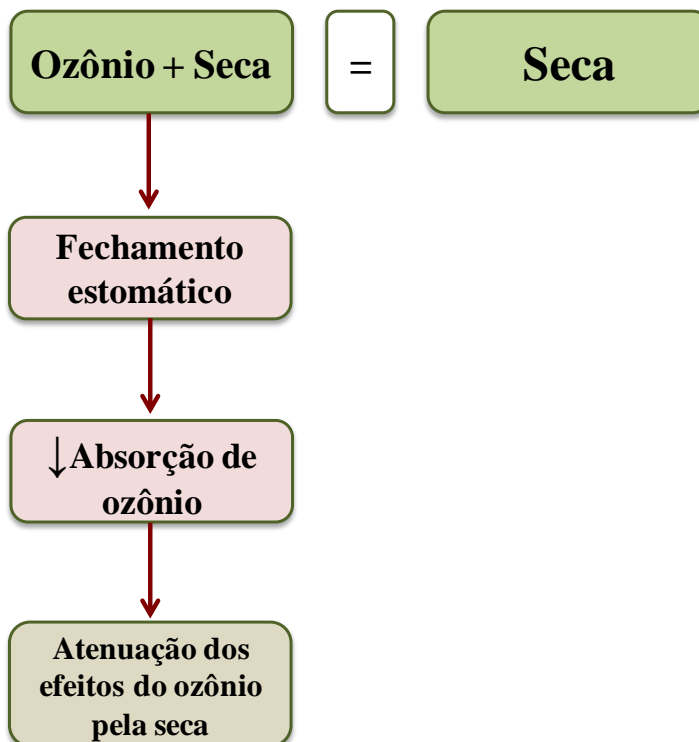
Ozônio + Seca



## ANEXO 3:

Resumo esquemático de resultados e discussão:





**ANEXO 4:****Lista dos artigos:**

1- Título: **Membrane remodeling and lipid signaling in leaves of two cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) cultivars exposed to a combination of drought and ozone treatments**

Autores: **Deborah Moura Rebouças**; Yuri Maia de Sousa; Matthieu Bagard; José Helio Costa; Yves Jolivet; Dirce Fernandes de Melo; Anne Repellin.

Submetido à *Plant, Cell & Environment* em 9 de abril de 2014 (Recusado).

Submetido à *Environmental and Experimental Botany* em 10 de setembro de 2014 (Recusado).

2- Título: **Involvement of plastidial terminal oxidase (PTOX) and mitochondrial proteins (AOX and pUCP) in the response of *Vigna unguiculata* to combined drought stress and ozone exposure**

Autores: Yuri Maia; Matthieu Bagard; José Hélio Costa; Marie-Noëlle Vaultier; **Deborah Moura Rebouças**; Neuza Felix Gomes; Pierre Dizengremel; Anne Repellin; Dirce Fernandes de Melo; Yves Jolivet.

Submetido à *Plant, Cell & Environment* em 1º de outubro de 2012 (Recusado).

Submetido à *Environmental and Experimental Botany* em 14 de março de 2014 (Recusado).