

**SÍNTESE DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM MITOCÔNDRIAS DE FRUTOS:
PAPEL DO ESTADO REDOX DA UBIQUINONA E INTERAÇÃO COM A VIA
OXIDASE ALTERNATIVA**

ALINE ANGELICA DE OLIVEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2018

**SÍNTESE DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM MITOCÔNDRIAS DE FRUTOS:
PAPEL DO ESTADO REDOX DA UBIQUINONA E INTERAÇÃO COM A VIA
OXIDASE ALTERNATIVA**

ALINE ANGELICA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO DE 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

042/2018

O48 Oliveira, Aline Angelica de.

Síntese de ácido ascórbico em mitocôndrias de frutos: papel do estado redox da ubiquinona e interação com a via oxidase alternativa / Aline Angelica de Oliveira. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

81 f. : il.

Bibliografia: f. 54 – 68.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.

Orientador: Jurandi Gonçalves de Oliveira.

1. Enzima L-galactona-1,4-lactona desidrogenase. 2. Cadeia Transportadora de Eletrons Mitocondrial. 3. Ubiquinol. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 635.642

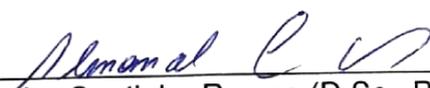
**SÍNTESE DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM MITOCÔNDRIAS DE FRUTOS:
PAPEL DO ESTADO REDOX DA UBIQUINONA E INTERAÇÃO COM A VIA
OXIDASE ALTERNATIVA**

ALINE ANGELICA DE OLIVEIRA

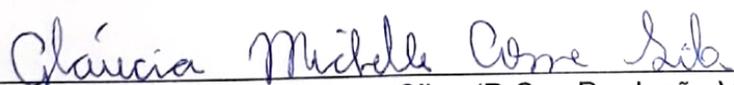
Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

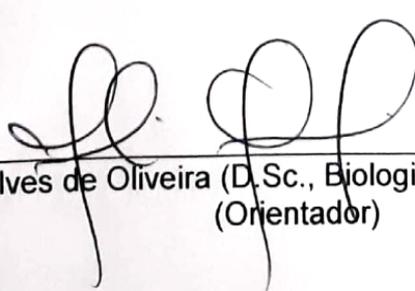
Aprovada em 26 de Fevereiro de 2018

Comissão Examinadora


Prof. Alessandro Coutinho Ramos (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF


Prof. Eldo Campos (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UFRJ


Dr^a Gláucia Michelle Cosme Silva (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF


Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira (D.Sc., Biologia Vegetal) – UENF
(Orientador)

Dedico este trabalho a Deus, à minha mãe Maria Ilda, ao meu pai Adalberto e aos meus irmãos Denis e Elaine, também ao meu amigo e companheiro Marcos Vinícius, razões da minha busca, aos quais sempre me deram apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela dádiva da vida, por ter me dado todos os subsídios para esta conquista. Por ter me iluminado em cada momento de dificuldade. Meu Pai amado e querido. A Ele, toda a honra e toda a glória!

Aos meus pais Adalberto e Maria Ilda por todo apoio e incentivo em todo tempo, e por todo o amor e esforço para me oferecer um ótimo estudo e a qualidade de vida;

Aos meus irmãos Elaine e Denis por todas as palavras de incentivo, por sua amizade e por estarem comigo em todo tempo;

Ao meu amado namorado Marcos Vinícius, agradeço pela paciência, amor e companheirismo, além do carinho e conforto que me oferece, sempre acalmando meu coração. Agradeço por você ter feito parte dessa etapa. Essa conquista também pertence a você!

À Dra. Gláucia Michele Cosme Silva por todo o empenho em ensinar, pela dedicação e ajuda fundamental durante todas as fases do desenvolvimento deste trabalho, além é claro da amizade;

Ao Dr. Luis Miguel Mazorra Morales, agradeço pela ajuda teórica e prática durante todo o trabalho;

Ao André Vicente de Oliveira pela incrível disposição em me ajudar sempre que precisei, além da amizade sincera;

Ao Diederson Bortolini conhecido como Diu, pelo apoio em todas as atividades desenvolvidas e a dedicação que teve para com o trabalho;

A minha amiga de caminhada, Thamiris Fernandes de Oliveira, por compartilhar comigo momentos de tristeza, estresse, mas também de alegrias e por toda a ajuda quando precisei;

A todos os colaboradores de Iniciação Científica, Bárbara e Luana e também à bolsista de apoio, Raissa, por toda a ajuda durante minhas análises;

Ao meu orientador, professor Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira, pelo aprendizado, apoio e incentivo nas minhas atividades acadêmicas, pelo ensino, pela dedicação, pela paciência e pela confiança;

Ao pesquisador Pierre Baldet do Institut National de La Recherche Agronomique, da Université Bordeaux, França, pela concessão das sementes de tomate utilizadas no trabalho;

Aos professores Dr. Silvério de Paiva Freitas e Dr. Silvio de Jesus Freitas pela concessão da casa de vegetação onde foram produzidos os frutos para as análises do meu trabalho;

Ao Laboratório de Biotecnologia, comandado pelo professor Dr. Vanildo Silveira, pela concessão de equipamentos necessários para a continuidade do trabalho;

Ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT), comandado pela professora Dra. Claudete Santa-Catarina por toda a colaboração e pela concessão de equipamentos necessários para a continuidade do trabalho;

Ao Laboratório da Prof^a Rosana Rodrigues (Melhoramento Visando Resistência a Doenças e Recursos Genéticos Vegetais- LMGV) pela colaboração e pela concessão de equipamentos necessários para a continuidade do trabalho;

A todos os professores que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento das minhas análises e do meu projeto como um todo;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal pela infraestrutura e oportunidade de cursar o mestrado;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES - pelos 24 meses de bolsas concedidos;

Agradeço a todos que de alguma forma tenham contribuído para a realização deste trabalho. A ausência de qualquer um de vocês impossibilitaria minha conclusão do mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1.Ácido ascórbico (AA)	4
2.1.1. Função e importância do ácido ascórbico	4
2.1.2. Biossíntese de ácido ascórbico	6
2.1.3. Enzima L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH)	8
2.2. Oxidases terminais da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria	12
2.2.1. Citocromo c oxidase (COX).....	12
2.2.2. Oxidase alternativa.....	13
2.3. Ciclo da ubiquinona (UQ)	16
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo geral	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Produção e obtenção do material vegetal	20
4.2. Padronização dos frutos.....	21
4.2.1. Coloração do epicarpo	21
4.2.2. Firmeza do fruto	21

4.3. Isolamento das mitocôndrias.....	21
4.4. Determinação da integridade de membrana	22
4.5. Ensaio.....	23
a. Influência da atividade da enzima GalLDH e da síntese de AA no estado redox da UQ.	23
b. Avaliação da atividade da GalLDH	24
c. Atividade Respiratória	25
d. Determinação da participação da AOX e COX	26
e. Determinação do teor de AA.....	26
4.6. Relação da GalLDH na biossíntese de H ₂ O ₂	27
4.7. Análises estatísticas.....	28
5. RESULTADOS.....	29
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

RESUMO

A enzima L-galactona-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) catalisa o último passo na via principal de síntese de ácido ascórbico (AA) em plantas. Experimentos demonstraram que a atividade da GalLDH não é um fator limitante para a formação do AA. Trabalhos sugerem uma ligação entre a atividade da GalLDH e a via oxidase alternativa (AOX). Propondo a participação da ubiquinona (UQ) como um mediador entre a GalLDH e a AOX, objetivou-se detalhar o papel do ciclo da UQ na transferência de elétrons entre a enzima GalLDH e a via AOX em três genótipos de tomate cereja: o selvagem (WT) e duas linhagens transgênicas (GalLDH 5-13 e GalLDH 8-14) em estágio de maturação verde. Foram avaliados, a participação da AOX, a atividade da GalLDH, o estado redox da UQ e a produção de AA em mitocôndrias isoladas dos frutos. As linhas transgênicas mantiveram a taxa de acumulação de AA semelhante ao controle. Ao mesmo tempo, apresentaram maior atividade da AOX, onde a inibição dessa via com seu bloqueador SHAM promove brusca queda na atividade da enzima GalLDH e no acúmulo de AA nos três genótipos, sugerindo que a acumulação de AA pode ser independente da atividade da GalLDH e reforçando a possibilidade da AOX ser necessária para tal processo. Verificou-se aumento na atividade da GalLDH e na respiração iniciada com o substrato L-galactona-1,4-lactona (GalL) quando se forneceu UQ oxidada. No genótipo WT houve aumento na quantidade de UQH₂ (UQ reduzida, ou

ubiquinol) na presença do substrato Gall, reforçando a hipótese de transferência de elétrons entre a GalLDH e a AOX via *pool* da UQ. Observou-se a insensibilidade das vias AOX e COX aos seus respectivos inibidores quando as mitocôndrias foram tratadas com Gall, verificando-se ainda um consumo de O₂ e conseqüentemente aumento na produção de H₂O₂, após adição de Gall, sendo notável a menor produção desse nas linhagens transgênicas, o que confirma a hipótese da produção de H₂O₂ pela GalLDH. Houve brusca queda do H₂O₂ após inibição da AOX, sugerindo que o bloqueio desta via levaria à inibição da atividade da GalLDH, provocando uma redução significativa na formação de H₂O₂, comprovando a estreita ligação entre a GalLDH e a AOX. Os resultados aqui apresentados sugerem uma ligação muito próxima entre a atividade da enzima GalLDH e a AOX, intermediada pelo *pool* de UQ. Outros estudos são necessários para esclarecer qual o nível de influência dessa ligação e a possível existência de um mecanismo ainda desconhecido capaz de consumir O₂, mesmo na presença dos bloqueadores da COX e AOX.

ABSTRACT

The enzyme L-galactone-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) catalyzes the last step in the main ascorbic acid (AA) synthesis pathway in plants. Experiments have shown that the activity of GalLDH is not a limiting factor for the formation of AA. Studies have suggested a link between GalLDH activity and the alternative oxidase pathway (AOX). The objective of this study was to evaluate the role of the UQ cycle in the transfer of electrons between a GalLDH enzyme and the AOX pathway in three types of cherry tomatoes: wild (WT) and two transgenic lines (*P_{35S}:Slgaldh^{RNAi}* 5-13 and *P_{35S}:Slgaldh^{RNAi}* 8-14) at green maturation stage. AOX participation, an activity of the Galaxy, the redox state of the UQ and a production of AA in mitochondria isolated from the fruits were evaluated. As transgenic lines maintained a rate of accumulation of AA similar to the control. At the same time, greater activity of the AOX, suggesting that the accumulation of AA is independent of the activity of GalLDH and reinforcing the possibility of AOX being necessary for the process. Increase of the discharge and irrigation activity with substrate L-galactone-1,4-lactone (GalL) when oxidized UQ was supplied. The WT genotype had no increase in the amount of electron transfer between a population and an AOX via pool of the UQ. Observe that the insensitivity of the AOX and COX pathways at the same time as the mitochondria were treated with GalL, with an O₂ consumption and consequently increasing the H₂O₂ production, after the addition of GalL, being remarkable the

lower production of this in the transgenic lines , which confirm the production of H_2O_2 by GalLDH. There is no inhibition of H_2O_2 after inhibition of the AOX, suggesting that it is eliminated by the inhibition of activity of GalLDH, causing a significant reduction in the production of H_2O_2 , the document of the flag of GalLDH and AOX. The results are in a new close direction between enzyme activity and an AOX, mediated by the pool of UQ. Further studies are needed to clarify the level of binding that may have existed and O_2 can still be exported, even in the presence of COX and AOX blockers.

1. INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico (AA) não é sintetizado pelo organismo humano (Nishikimi et al., 1994, Cui et al., 2011). É essencial à saúde, onde desempenha papel fundamental no desenvolvimento e regeneração dos músculos, peles, dentes e ossos, na formação do colágeno, na regulação da temperatura corporal, na produção de diversos hormônios e no metabolismo em geral. A falta de AA no organismo pode resultar em doenças, como o escorbuto, que é letal se não tratada (Diplock et al., 1998). Estudos anteriores também demonstraram que o AA está envolvido na prevenção de várias outras doenças, desencadeadas por estresse oxidativo, tais como câncer, doenças cardiovasculares e envelhecimento precoce (Davey et al., 2000). Assim, os seres humanos devem ingerir vitamina C, principalmente de frutas frescas, legumes dentre outros (Li e Schellhorn, 2007).

O ácido ascórbico (AA) também é um metabólito que atua como cofator enzimático e composto antioxidante no metabolismo celular das plantas, tendo papel fundamental no desenvolvimento das mesmas (Conklin et al., 1996; Szarka et al., 2012).

A L-galactona-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH), enzima terminal da biossíntese de AA em plantas, se encontra associada ao complexo I da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (CTEm) (Millar et al., 2003). Durante

a síntese de AA, a GalLDH converte o L-galactona-1,4-lactona (GalL) em AA, sendo o citocromo c reduzido, antes deste doar elétrons para o complexo citocromo c oxidase (COX), último complexoceptor de elétrons da CTEM (Bartoli et al., 2005).

No entanto, trabalhos preliminares demonstraram que em plantas de tomate com silenciamento do gene que codifica a GalLDH, a concentração do AA no fruto não se altera significativamente, quando comparado à planta selvagem (WT), indicando que a atividade da GalLDH não é um fator limitante para a formação do AA. Ao mesmo tempo, é evidente o crescimento mais lento das plantas com a GalLDH silenciada, assim como também são menores os frutos na comparação com as plantas WT (Alhag Dow et al., 2007).

Diante do exposto e a partir de ensaios realizados pelo grupo de pesquisa do laboratório e cujos resultados ainda não foram publicados, é provável que a síntese de AA também seja influenciada pela atividade da alternativa oxidase (AOX), uma oxidase terminal, insensível à antimicina A e ao cianeto, capaz de realizar o transporte de elétrons mitocondrial, independente da via COX. Encontrada nas membranas internas das mitocôndrias vegetais, a AOX utiliza os elétrons provenientes da ubiquinol (UQH₂) (a forma de ubiquinona - UQ - reduzida) para reduzir o oxigênio à água (Moller, 2001; Vanlerberghe, 2013), impedindo a passagem desses pelos complexos III e IV. Por essa via há uma diminuição significativa na capacidade de síntese de ATP na mitocôndria. Portanto, AOX regula o estado de alta energia da membrana, consumindo elétrons e impedindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) na mitocôndria (Vanlerberghe e MacIntosh, 1997; Millar et al., 2011).

Em alguns trabalhos já realizados pelo grupo de pesquisa do laboratório, foi mostrado a diminuição da atividade da GalLDH e do conteúdo total de AA após o uso do ácido salicilhidroxâmico (SHAM), inibidor da AOX, em mitocôndrias isoladas de frutos de mamoeiro, morangueiro e tomateiro. O mesmo foi verificado por Bartoli et al. (2006), usando plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* com linhas antisense da AOX e linhas com aumento da expressão da AOX, onde o acúmulo e a síntese de AA foram maiores em plantas onde a capacidade da AOX era mais elevada.

Plantas de tomate das linhas transgênicas (5-13 e 8-14) com a GalLDH silenciada mostraram maior atividade da AOX comparado à espécie selvagem

e grande acúmulo de AA, mesmo com a baixa atividade da enzima GalLDH daquelas linhas (Alhagdow et al., 2007). Isto sugere que a AOX pode ser fundamental para a acumulação de AA (Silva, 2016).

Esses resultados são fortes indícios da possibilidade da AOX, mesmo em baixas quantidades, ser imprescindível para manter a síntese e acumulação de AA em mitocôndrias de frutos, sendo essa via independente da redução do citocromo c.

Sabe-se que a via AOX funciona para manter o *pool* de UQ em um estado mais oxidado (Vanlerberghe, 2013) evitando a super redução da CTEM em caso de queda na velocidade da via principal, (via COX), evitando assim a formação subsequente de ERO.

Com base nos estudos já realizados que se tem conhecimento até o momento, é explícito que há uma ligação entre a síntese de AA e a atividade da AOX. Porém, pouco se conhece como acontece essa interação entre a AOX e a GalLDH, enzima responsável por catalisar o último passo da biossíntese de AA em plantas. Especula-se que o ciclo da UQ esteja intimamente envolvido nessa interação entre a AOX e a GalLDH na via de síntese do AA em mitocôndrias de plantas. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo investigar o papel do estado redox da UQ na interação entre a síntese do AA e a respiração alternativa promovida pela AOX.

Tais estudos podem ajudar no descobrimento de uma nova rota de fluxo de elétrons ainda desconhecida, na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, o que favoreceria o desenvolvimento de métodos e procedimentos para prolongar a vida de prateleira de frutos perecíveis. Além disso, estes estudos poderão ajudar no entendimento da formação do AA, componente este indispensável para a saúde de diversos organismos, inclusive seres humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ácido ascórbico (AA)

2.1.1. Função e importância do ácido ascórbico

O AA ou ascorbato foi identificado pela primeira vez em amostras de suco de limão isoladas por Szent Gyorgyi (1928), sendo atualmente considerado como um antioxidante hidrossolúvel (Gonçalves, 2008). Conhecido pela fórmula molecular $C_6H_8O_6$ (Figura 1), ou pelo nome químico 2-oxi-L-treohexônio-1,4-lactona-2,3-enediol, é composto por seis átomos de carbono, tendo o grupo enediol nos átomos de carbono 2 e 3, podendo ser encontrado na forma reduzida e ativa (ácido L-ascórbico) ou na forma oxidada (ácido L-deidroascórbico) (Morán et al., 2006).

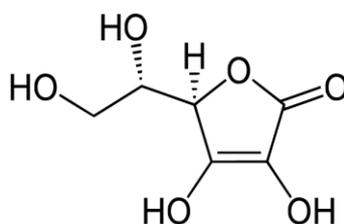


Figura 1. Estrutura química do ácido ascórbico

Os mecanismos utilizados pelas plantas para a regulação da síntese e acúmulo de AA ainda não são plenamente conhecidos. Sabe-se que fatores como síntese, catabolismo e reciclagem influenciam no acúmulo de AA, dependendo do tecido da planta (Ishikwa e Smirnoff, 2006). Por exemplo, foi verificado que o mutante de *A. thaliana* cuja síntese de AA é 30% menor, apresenta o mesmo nível de oxidação do AA do verificado no tipo selvagem (Conklin et al., 1996).

Atualmente, o AA é considerado o antioxidante muito importante no tecido vegetal, extremamente necessário no desenvolvimento da planta, atuando como cofator de várias reações enzimáticas e protegendo as células contra a ação de ERRO (Kerchev et al., 2011). O AA também atua como modulador na sinalização celular em vários processos no desenvolvimento vegetal incluindo a divisão e expansão celular, na formação de parede celular, principalmente durante o crescimento das plantas (Conklin e Barth, 2004; Wolucka et al., 2005; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2012).

De modo geral, o AA desempenha também outras funções importantes, nas plantas. Seu papel na fotoproteção é bem estabelecido (Muller-Moule et al., 2002; Muller-Moule et al., 2004), enquanto novas funções em processos redox estão relacionadas com o crescimento celular, respostas hormonais (Pignocchi e Foyer, 2003), respostas relacionadas à morte celular programada, na senescência e como resposta ao ataque de patógenos estão sendo confirmadas na literatura (Pastori et al., 2003; Barth et al., 2004; Chen e Gallie, 2004).

Em frutos, o teor de AA pode variar de acordo com a espécie, variedade, condições de cultivo, estágio de desenvolvimento e ponto de colheita. Fatores como o processo fotossintético, temperatura ambiente e exposição ao sol, também afetam a síntese e produção de AA (Lee e Kader, 2000). Em tomate (*Solanum lycopersicum*) e *A. thaliana*, condições ambientais, como luz e estresse, podem induzir a expressão de genes relacionados à síntese de AA (Huang et al., 2005; Ioannidi et al., 2009). Em geral, quanto menor a intensidade da luz durante o crescimento, menor o teor de AA nos tecidos vegetais (Harris, 1975).

Esta variação é diferente durante a maturação dos frutos, de forma que o teor de AA pode aumentar, como no caso do kiwi e do mamão, permanecer inalterado como no caso do morango (Lee e Kader, 2000; Cordenunsi et al., 2002) ou ainda diminuir no caso da acerola (De Assis et al., 2001; Malegori et al., 2016). Esse fato pode ser resultante da combinação de vários processos como a biossíntese, reciclagem e transporte do AA.

2.1.2. Biossíntese de ácido ascórbico

Apesar do conhecimento acerca da importância do AA para animais e vegetais, a compreensão da sua biossíntese em plantas ainda não está totalmente esclarecida, em parte devido à diversidade das vias alternativas da síntese que foram propostas nos últimos tempos.

A biossíntese do AA ocorre diferentemente entre animais e plantas. Em animais, a via de biossíntese do AA já está bem caracterizada desde os anos 60 (Burns, 1960). Enquanto em plantas a via predominante ainda não está completamente compreendida. A primeira via proposta aceita para a síntese do AA em plantas foi apresentada por Wheeler et al. (1998). Esta via sugere que o AA é formado a partir da D-glicose, com nucleotídeos e açúcares como intermediários (Wheeler et al., 1998). Estes autores demonstraram também, a partir de folhas de *Arabidopsis*, que a L-galactose-1,4-lactono (GalL) é o precursor imediato do AA.

A existência de outras vias alternativas para a biossíntese do AA também foi sugerida. A primeira rota proposta foi a via biossintética a partir da L-gulose, cuja etapa final é a oxidação de L-gulono-1,4-lactona a AA (Wolucka et al., 2003). Também foi proposta uma possível participação do mio-inositol como possível precursor da biossíntese do AA através da formação de UDP-glucuronato a partir da oxidação do mio-inositol, verificado em *Arabidopsis* (Lorence et al., 2004). Uma terceira rota sugerida é a partir do ácido D-galacturônico, componente principal das pectinas da parede celular, produzido a partir da atividade da D-galacturonato redutase, verificado como possível via para a biossíntese de AA em morango (Loewus, 1999; Agius, 2003) (Figura 2).



Figura 2. Vias biossintéticas do ácido ascórbico. 1) via Wheeler-Smirnoff, a partir da D-glicose; 2) via a partir da GDP-L-gulose; 3) via a partir do Myo-Inositol e 4) via a partir do ácido D-galacturônico, componente principal das pectinas da parede celular.

Trabalhos com *A. thaliana* utilizando mutantes dos genes *VTC1* (GDP-mannose pirofosforilase) e *VTC2* (GDP-L-galactose phosphorylase) sugerem que a via de biossíntese do AA a partir do L-galactose tem pouca expressão na síntese deste, sendo responsável por uma proporção relativamente pequena na acumulação deste composto (Conklin et al., 1999; Linster e Clarke, 2008). No entanto, também utilizando *A. thaliana* a partir de mutantes duplos dos genes *VTC2* e *VTC5* da GDP-L-galactose fosforilase, a principal enzima responsável pela via L-galactose, Linster et al. (2008) verificaram que o silenciamento desses genes foi letal para as plantas, sugerindo que a via da L-galactose é a principal via para a síntese de AA em *Arabidopsis*.

Essas descobertas foram importantes para entender melhor as etapas da via de biossíntese do AA que não estavam totalmente esclarecidas. A partir dessas descobertas, por exemplo, foi possível determinar que a biossíntese do AA em plantas superiores ocorre a partir da via D-manose-L-galactose (via Wheeler-Smirnoff), onde a D-manose é convertida em L-galactose (Wheeler et al., 1998). Nas etapas finais da via, a L-galactose é então oxidada a GalL, o qual é convertido a AA, em uma reação catalisada pela GalLDH, uma enzima localizada na membrana interna das mitocôndrias (Bartoli et al., 2000; Millar et al., 2003). Esta reação necessita do citocromo c na forma oxidada como um aceptor de elétrons do processo de síntese de AA (Oba et al., 1995; Hervás et al., 2013).

A D-manose-1-P e a L-galactose foram considerados precursores limitantes na biossíntese de AA em plantas (Davey et al., 1999). Testes realizados demonstraram que o fornecimento exógeno do D-manose-1-P não resultou em maior acúmulo de AA (Wheeler et al., 1998; Davey et al., 1999). Entretanto, quando fornecidos exogenamente a L-galactose e a GalL, observa-se um aumento significativo na taxa de biossíntese de AA, sendo verificado aumento em cerca de 30 a 70 vezes (Davey et al., 1999). Isto visto, leva a conclusão de que a via L-galactose é a mais importante rota para a biossíntese de AA em plantas.

Em trabalhos realizados com mudas de *A. thaliana* verificou-se maior acumulação de AA após a inserção dessas plantas sob alta intensidade de luz. A atividade da enzima GDP-L galactose fosforilase e a expressão do gene *VTC2* aumentaram rapidamente após a transferência das plantas para um ambiente bem iluminado, mas a atividade de outras enzimas da via foi pouco afetada (Dowdle et al., 2007). Estas observações sugerem que a GDP-L-galactose fosforilase deve desempenhar também um papel importante no controle da biossíntese do AA em condições de exposição à alta radiação (Dowdle et al., 2007).

2.1.3. Enzima L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH)

A enzima GalLDH é uma aldonolactona oxidoreductase pertencente ao grupo vanilil-álcool oxidase (VAO) da família das flavoproteínas (Fraaije et al.,

1998; Leferink et al., 2008a). Foi verificada pela primeira vez a sua atividade em plantas em 1954 (Isherwood et al., 1954; Mapson et al., 1954) e desde então, muitos progressos aconteceram na compreensão das propriedades desta enzima mitocondrial (Yabuta et al., 2000; Rodríguez-Ruiz et al., 2017).

A GalLDH contém um grupamento FAD que catalisa o passo terminal da via de Smirnof-Wheeler durante a biossíntese do AA (Leferink et al., 2008). A maioria das flavoproteínas possui um FAD covalentemente ligado e age como oxidases utilizando oxigênio molecular para reoxidar a flavina, resultando na produção de H_2O_2 (Leferink et al., 2008b). Porém, a GalLDH tem pouca afinidade pelo oxigênio molecular e contém o FAD ligado não covalentemente, motivo pelo qual é considerada uma desidrogenase e não uma oxidase (Leferink et al., 2008b). Estudos sobre a GalLDH revelaram que esta enzima possui apenas um polipeptídeo, em torno de 56-57 kDa (Ôba et al., 1994; Ôba et al., 1995; Imai et al., 1998). Todavia, pouco ainda é conhecido sobre a natureza do sítio ativo, assim como sobre o mecanismo de ação da GalLDH (Leferink et al., 2008a).

Há pouca informação disponível a respeito do mecanismo de ação das aldonolactonas. Foi proposto por Logan et al. (2007) que as aldonolactonas de *Trypanosoma cruzi* abrigassem um grupamento FMN não covalentemente ligado como cofator. Embora isolado de diferentes tecidos animais e vegetais, as aldonolactonas oxidoredutases foram caracterizadas parcialmente. Os determinantes moleculares para diferenciar a ligação da enzima ao cofator, assim como a especificidade de substrato para estas enzimas não estão devidamente definidos, como também não há informação disponível sobre a natureza do seu sítio ativo e nenhuma estrutura 3D para este grupo de flavoenzimas.

A GalLDH é responsável por catalisar a etapa final da via de biossíntese do AA em plantas, também chamada de via “Smirnof-Wheeler”, quando acontece a oxidação do GalL a AA, no interior das mitocôndrias (Bartoli et al., 2000; Millar et al., 2003). A GalLDH é responsável pela transferência dos elétrons para o citocromo c (Oba et al., 1995; Bartoli et al., 2005; Rodríguez-Ruiz et al., 2017).

A atividade da GalLDH e a produção de AA já foi verificada em diferentes tecidos e espécies, incluindo feijão fava (Arrigoni et al., 1997),

morango (Baig et al., 1970), espinafre (Hausladen e Kunert, 1990), batata (Ôba et al., 1994), milho (De Gara et al., 1994), batata-doce (Ôba et al., 1995; Imai et al., 1998), couve-flor (Ostergaard et al., 1997), pimenta (Rodríguez-Ruiz et al., 2017) entre vários outros. Além disso, há trabalhos que demonstram que a GalLDH é fundamental para a atividade respiratória do complexo I em mitocôndrias de plantas (Pineau et al., 2008).

A função exercida pela GalLDH na biossíntese do AA sugere que a mesma esteja localizada na membrana interna das mitocôndrias. Contudo, a exata localização dessa enzima ainda não está totalmente esclarecida, uma vez que a GalLDH já foi identificada como uma proteína integral da membrana interna (Siendones et al., 1999; Bartoli et al., 2000), mas atualmente é considerada uma proteína periférica (Leferink et al., 2008b; Schertl et al., 2012; Rodríguez-Ruiz et al., 2017).

No entanto, a GalLDH tem sido apontada como parte do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, isto é, a NADH: ubiquinona oxidorreductase. Trabalhos mostraram que quando o complexo I é bloqueado pelo seu inibidor específico, rotenona, a enzima GalLDH também perde sua atividade. Por conseguinte, foi especulado que subunidades do complexo I podem ser importantes para a regulação da GalLDH, por controlarem a velocidade do fluxo de elétrons através deste complexo, a partir da oxidação do NADH (Millar et al., 2003).

Millar et al. (2003) verificaram a presença da GalLDH anexada a uma versão ligeiramente menor do complexo I, chamada de complexo I*, de abundância relativamente baixa na CTEM. Recentemente, a atividade de GalLDH foi detectada em três complexos de membrana diferentes, incluindo os complexos de 850, 470 e 420 kDa (Schertl et al., 2012). O complexo I* tem uma massa molecular de cerca de 850 kDa, o que certamente o faz necessitar de algumas das subunidades presentes na forma principal do complexo I para sua plena atividade. Contudo, a identificação das outras duas subunidades e a composição exata do complexo I* ainda não foram comprovadas (Schertl et al., 2012).

Surpreendentemente, descobriu-se que a enzima GalLDH é necessária para a montagem do complexo I, de tal forma que em mutante com a GalLDH silenciada, o complexo I não foi detectável, ou seja, a organização do complexo

I é alterada na ausência da GalLDH (Pineau et al., 2008). O complexo I é responsável por oxidar e transferir elétrons do NADH para a UQ (Brandt, 2006; Hirst, 2013). Em plantas de *A. thaliana*, o complexo I possui pelo menos 44 subunidades, incluindo 9 proteínas expressas a partir do genoma mitocondrial sendo montado na matriz da mitocôndria (Meyer, 2012; Peters et al., 2013).

Usando uma abordagem proteômica, Schertl et al. (2012) concluíram que a GalLDH e o complexo I não constituem um mesmo complexo na cadeia transportadora de elétrons. À GalLDH é atribuído papel importante durante a montagem do complexo I (Schertl et al., 2012), no entanto, qual seria exatamente o papel da GalLDH durante a montagem do complexo I ainda não se sabe. Também carece de esclarecimento, se esse papel (na montagem do complexo I) está ligado ou não à função da GalLDH na síntese do AA ou se a função da proteína GalLDH na produção do AA é necessária para o funcionamento do complexo I (Szarka et al., 2013).

Schimmeyer et al. (2016) confirmaram que a GalLDH está associada às subunidades 400 e 450 kDa do complexo I, sugerindo que esta enzima é um fator fundamental para a montagem da porção transmembrana do complexo I. Segundo esses autores, a GalLDH estaria anexada à membrana mitocondrial através de, pelo menos, um domínio transmembranar muito curto de 20 aminoácidos, sendo o restante da estrutura da proteína no estado periférico. Além disso, Schimmeyer et al. (2016) sugerem que esta função (associada à montagem do complexo I) seja independente do papel da GalLDH na síntese de AA, propondo que esta enzima seja uma proteína de função dupla que tenha uma segunda função não enzimática, quando participa da montagem desse complexo.

Estudos realizados utilizando folhas de tomateiros transgênicos (*Lycopersicon esculentum*) com silenciamento do gene da malato desidrogenase demonstraram que quando o complexo II foi bloqueado, ocorreu um aumento entre 5 a 7 vezes no acúmulo de AA nestes tomateiros transgênicos em relação ao tipo selvagem. Porém, quando avaliado o efeito do bloqueio do complexo II sobre a atividade da GalLDH ou na concentração dos ácidos galacturônico e glucurônico, intermediários na via de síntese do AA, nenhuma diferença foi verificada entre tomateiros transgênicos e selvagens. Embora a razão para este fenômeno ainda não esteja totalmente

compreendida, a partir dos resultados obtidos até o momento, sugere-se que a atividade da cadeia respiratória possa ter grande influência sobre o metabolismo do AA (Nunes-Nesi et al., 2005).

Szarka et al. (2013) demonstraram em folhas de tabaco que a adição do malonato ou tenoiltrifluoracetona (TTFA), inibidores específicos do complexo II, resultou no aumento na produção de AA. Ainda, a adição de succinato, substrato respiratório que atua diretamente no complexo II, resultou em elevada e acentuada produção de AA mediante adição de dehidroascorbato (DHA).

Trabalho publicado por Alhag Dow et al. (2007) mostrou que o silenciamento do gene que codifica a GalLDH em tomate não afeta a concentração do AA, não sendo limitante para a formação do AA. No entanto, as plantas silenciadas possuem um crescimento claramente mais lento e produzem frutos menores. Ao mesmo tempo, o metabolismo das mitocôndrias destas plantas (com o gene da GalLDH silenciado) é significativamente alterado. Concluiu-se, portanto, que a GalLDH pode influenciar outros processos respiratórios e metabólicos na mitocôndria, além da sua participação na formação do AA.

Embora tenha sido estabelecido que a GalLDH catalisa o último passo da via biossintética de AA em várias espécies de plantas (Østergaard et al., 1997; Ioannidi et al., 2009; Xu et al., 2013), nenhuma correlação clara entre o conteúdo de AA e a expressão da GalLDH foi detectada ainda.

2.2. Oxidases terminais da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria

2.2.1. Citocromo c oxidase (COX)

A COX ou complexo IV é um complexo transmembranar localizado na membrana interna mitocondrial e componente da CTEM. Na COX ocorre a oxidação do citocromo c, que transfere elétrons para o oxigênio molecular, formando água (Millar et al., 2003).

Estruturalmente, a COX é composta de 14 subunidades (com massa de 204 kDa), sendo formada por várias proteínas com cofatores metálicos, entre as quais 2 citocromos com grupos heme (citocromos a e a₃) e dois

centros contendo cobre (CuA e CuB). O citocromo a3 e o centro CuB formam juntos o local de redução do oxigênio. Entre as 14 subunidades da COX, apenas 3 são codificadas pelo DNA mitocondrial (Peiffer et al., 1990).

Tal como acontece nos complexos I e III, o complexo IV também é responsável pela transferência de prótons da matriz para o espaço intermembranar (Rodríguez-Roldán et al., 2006). A COX é bloqueada por íon CN^- , azida e pelo monóxido de carbono, que tem maior afinidade pelo oxigênio que o centro Fe–Cu da COX, impedindo assim a oxidação do citocromo c e a redução do oxigênio à água.

Dessa forma, é possível fazer associações entre a atividade COX e o metabolismo do AA, uma vez que é necessário o citocromo c na sua forma oxidada para que ocorra a síntese do AA. A GalLDH contribui com o transporte de elétrons e redução da COX. A GalLDH catalisa a oxidação do GalL com a redução do citocromo c, quando o GalL é convertido a AA e a COX é reduzida. Assim, indiretamente, a atividade da COX contribui para o mecanismo antioxidante não enzimático a partir da síntese do AA, ajudando a diminuir os níveis de ERRO (Bartoli et al., 2000; Millar et al., 2003; Blokhina e Fagerstedt, 2010).

Segundo Bartoli et al. (2000), a taxa de síntese de AA foi completamente inibida na presença de cianeto (CN^-), um conhecido bloqueador da COX. A inibição da COX mantém o citocromo c na forma reduzida, inibindo a atividade da GalLDH. Por outro lado, outro inibidor da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, a antimicina A, aumentou a produção de AA, uma vez que a inibição do complexo III pela antimicina A impede a redução do citocromo c, disponibilizando maior quantidade deste na forma oxidada, favorecendo a atividade da GalLDH e por consequência a síntese de AA. Em todo o processo a via AOX permaneceu funcionando normalmente.

2.2.2. Oxidase alternativa

A respiração insensível ao CN^- foi observada pela primeira vez em plantas em 1929 em ervilha doce (Genevois, 1929). Em 1978, uma oxidase foi solubilizada a partir de mitocôndrias de *Arum maculatum* (Huq e Palmer, 1978; Rich, 1978) e a respiração alternativa resistente ao CN^- foi atribuída a uma

enzima a qual se chamou de oxidase alternativa (AOX) (Vanlerberghe e MacIntosh, 1997).

A AOX é uma enzima que participa de outro mecanismo de dissipação de energia na CTE_m. Encontrada nas membranas internas das mitocôndrias vegetais, oxida diretamente o ubiquinol (UQH₂) levando a redução de O₂ a H₂O (Moller, 2001; Vanlerberghe, 2013). Em consequência, quando os elétrons fluem através da via AOX, impedindo a passagem desses pelos complexos III e IV, não existe assim bombeamento de H⁺ e aumento do gradiente eletroquímico de prótons pelo transporte de elétrons a partir da UQH₂ (Vanlerberghe e MacIntosh, 1997; Millar et al., 2011).

O fluxo de elétrons para a AOX regula o estado de energia da membrana minimizando a formação de ERO na CTE_m (Maxwell et al., 1999; Cvetkovska e Vanlerberghe, 2012). A capacidade da via AOX varia de acordo com o tipo de tecido e estágio de desenvolvimento da planta (Millar et al., 1998; Clifton et al., 2006). A capacidade AOX geralmente aumenta diante de alguma perturbação no metabolismo, como, por exemplo, o estresse abiótico (Vanlerberghe, 2013).

A AOX é uma enzima insensível aos inibidores que atuam nos complexos III (por exemplo, mixotiazol e antimicina A) e complexo IV (por exemplo, íon CN⁻) da CTE_m. Por outro lado, pode ser inibida especificamente por alguns agentes complexantes de ferro incluindo o ácido benzohidroxâmico (BHAM) e o ácido salicilhidroxâmico (SHAM), além do N-propilgalato e o tiocianato de potássio, sendo estimulada por ácidos orgânicos como o piruvato (Moore e Siedow, 1991; Millar et al., 2007).

A proteína AOX é expressa constitutivamente e o gene que a codifica possui regiões que são conservadas, sugerindo que essa via alternativa é uma rota importante no metabolismo das plantas (Vanlerberghe e McIntosh, 1997). Apesar de não estar totalmente esclarecido, uma função da AOX tem sido relatada em Anonáceae, Araceae, Arecaceae, Aristolochiaceae, Cycadaceae, Nymphaeaceae, Winteraceae, Illiciaceae, Magnoliaceae, Rafflesiaceae e Nelumbonaceae, neste caso especificamente a AOX está participando da liberação de compostos voláteis que funcionam como atrativos para polinizadores. Outra função da AOX é na prevenção do estresse oxidativo

desencadeado pelo estresse por frio (Elthon e McIntosh, 1986; Grant et al., 2009).

Outros trabalhos sugeriram que a AOX estaria atuando sob condições de estresse, para diminuir a produção de ERO nas mitocôndrias (Maxwell et al., 1999; Cvetkovska e Vanlerberghe, 2012). Além de um papel direto na modulação do estresse oxidativo nas mitocôndrias, a AOX também pode desempenhar um papel importante na manutenção e regulação das vias de sinalização mitocondrial, tanto pela redução de ERO quanto pelo desacoplamento do transporte de elétrons da síntese de ATP (Van Aken et al., 2009; Vanlerberghe et al., 2009).

O papel termogênico da via AOX na geração de calor em inflorescência de plantas para atrair insetos polinizadores tem grande importância na propagação dessas espécies (Millar et al., 2011). Além disso, foi demonstrado seu envolvimento no crescimento e desenvolvimento de plantas superiores, incluindo *Salsola divaricata*, uma planta intermediária C3-C4 (Gandin et al., 2014). Assim como também tem sido relatado o papel da AOX em várias condições de estresse biótico e abiótico (Vanlerberghe, 2013).

As proteínas AOX são classificadas, de modo geral, em duas subfamílias, AOX1 e AOX2, codificadas por genes nucleares (Considine et al., 2002). Membros da família AOX1, presentes em monocotiledôneas e não monocotiledôneas são mais estudados, sendo regulados de maneira diferenciada em diferentes órgãos e estádios de desenvolvimento. A AOX1 é altamente responsiva ao estresse abiótico e biótico, bem como a disfunções no metabolismo respiratório (Clifton et al., 2006). Já a AOX2, por outro lado, possui maior expressão gênica constitutiva e está presente somente em não monocotiledôneas (Considine et al., 2002).

Borecký et al. (2006) propuseram a existência de uma terceira família, a AOX3. Plantas de *Arabidopsis* expostas a baixas temperaturas (4°C), mostraram que o gene *AOX1d* sofria regulação negativa em relação aos demais genes da família AOX1 identificados. Devido a este padrão de resposta, os autores sugeriram que este gene pertenceria a uma terceira família, a qual foi denominada de AOX3. Essa distinção molecular sugere uma divergência entre as famílias de AOX nas plantas e pode ter implicações nas rotas fisiológicas nas diferentes espécies de plantas (Considine et al., 2002).

Experimentos com soja demonstram a expressão do gene *AOX1* em cotilédones, enquanto o gene *AOX3* está presente em folhas. Nenhum registro mostra a expressão do gene *AOX2* em soja, apesar de sua expressão relevante em outras espécies, sendo esta família de genes ainda pouco conhecida. Todos os genes da AOX sequenciados até o momento codificam uma proteína muito semelhante, possuindo uma região C-terminal e outra N-terminal, voltadas para a matriz, indicando uma estrutura helicoidal no espaço intermembranar. A porção N-terminal conserva resíduos de cisteína que postulam uma ponte dissulfeto lábil na AOX (Fiorani et al., 2005; Umbach et al., 2005; Giraud et al., 2008).

O gene *AOX1*, assim como os demais genes, responsáveis por codificarem a AOX, são comumente induzidos por diversas situações estressantes para o vegetal, como também pela disfunção do complexo I e por outros danos no metabolismo respiratório, como inibição da ATP sintase, desacoplamento do CTE_m e inibição do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT) (Vanlerberghe et al., 1997; Juszczuk et al., 2012). A indução da AOX ocorre na presença de inibidores convencionais da CTE_m que afetam a atividade do complexo III e IV, como a antimicina A ou o CN⁻ (Helmerhorst et al., 2002).

O uso de inibidores da COX tem sido empregado para induzir a transcrição do gene da AOX, assim como para aumentar os níveis da proteína AOX em plantas e fungos. Fatores externos, tais como baixa temperatura e infecção por patógenos também podem influenciar na expressão do gene e na síntese da proteína AOX (Vanlerberghe e MacIntosh, 1997). Uma vez que a via alternativa pode ser bastante ativa mesmo quando a via do citocromo está interrompida (Ribas-Carbo et al., 1995), sugere-se que essas duas vias respiratórias atuem simultaneamente para equilibrar o estado redox da ubiquinona. Sabe-se que os níveis de UQH₂ são determinantes para a atividade AOX (Siedow e Umbach, 2000).

2.3. Ciclo da ubiquinona (UQ)

A coenzima Q, também conhecida como UQ, é um transportador de elétrons lipofílico essencial da CTE_m (Hatefi, 1985; Lenaz et al., 2007). Esta

molécula é constituída por um anel de benzoquinona ligado a uma cadeia de poliprenil (Marbois et al., 2005; Kawamukai, 2009; Pierrel et al., 2010).

A UQ pode movimentar-se ao longo da bicamada lipídica. Está localizada na membrana mitocondrial interna, onde participa da CTE_m sendo responsável, também, pela translocação de H⁺ na mitocôndria, juntamente com os citocromos e as desidrogenases mitocondriais. As desidrogenases oxidam os NADH, NADPH e FADH₂ e transferem elétrons para a UQ, reduzindo-a a UQH₂. Este por sua vez transfere prótons para espaço mitocondrial intermembranar e os elétrons são translocados até o complexo III, onde os elétrons são repassados ao citocromo c e a partir do citocromo c para a COX. Dessa forma, a COX é usada para a redução do O₂ a H₂O (Figura 3). A transferência de H⁺ para o espaço intermembrana é fundamental para a produção de ATP (Dallner et al., 2000; Nohl et al., 2001).

O ciclo redox da UQ, porém, também é capaz de transferir elétrons para aceptores que não participam da via preferencial da CTE_m, como a AOX, que utiliza esses elétrons provenientes da UQH₂ para reduzir o oxigênio à água, competindo com a passagem desses elétrons pelos complexos III e IV (Moller, 2001; Vanlerberghe, 2013). A oxidação parcial do UQH₂ gera a semiquinona, que ao sofrer a oxidação completa leva à formação da UQ. Dessa maneira, a UQ oxidada possui grande poder antioxidante controlando a formação de ERO na CTE_m. Tal atividade está limitada ao meio lipossolúvel, devido à sua longa cadeia lateral (Larson et al., 1998; Dallner et al., 2000).

Além de sua função na transferência de elétrons, a UQ também desempenha outras funções importantes dentro da célula. Nos últimos anos, foi demonstrado que a UQ na sua forma reduzida, atua como importante antioxidante, prevenindo o dano do DNA e a peroxidação lipídica das membranas celulares através da eliminação de ERRO (Bentinger et al., 2010). Além disso, o estado redox da UQ determina os níveis de ERO e desempenha um papel regulador chave na resistência basal de *Arabidopsis* contra patógenos bacterianos e em resposta a ambientes de estresse oxidativo elevado (Dutta et al., 2015). A UQ também participa no controle da abertura dos poros de transição da membrana mitocondrial e regula a atividade das proteínas desacopladoras (Bentinger et al., 2010).

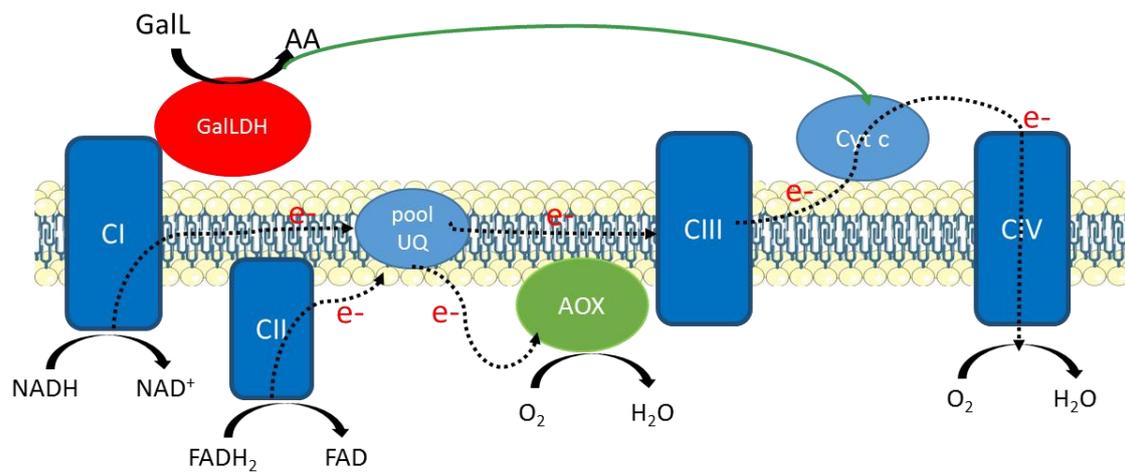


Figura 3. A ubiquinona (UQ) participa da cadeia de transporte de elétrons recebendo os elétrons oriundos dos complexos I (CI) e II (CII), transferindo-os para o complexo III (CIII), os quais por meio do citocromo c, são doados ao complexo IV (CIV) para a redução do O_2 à água via COX. Por outra rota, a UQ também é capaz de transferir elétrons para a oxidase alternativa (AOX), que utiliza esses elétrons para reduzir o oxigênio à água (linha tracejada).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Detalhar o papel do ciclo da UQ na transferência de elétrons entre a enzima GaLLDH e a via AOX em plantas de tomateiro do tipo selvagem (WT) e duas linhagens transgênicas (linhas 5-13 e 8-14) com silenciamento da enzima GaLLDH.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar a influência da atividade da enzima GaLLDH e da síntese de AA no estado redox da UQ em tecidos de polpa de tomate do tipo selvagem e de duas linhagens transgênicas com silenciamento da enzima GaLLDH;
- 2) Determinar a influência da disponibilidade da UQ na atividade da enzima GaLLDH em mitocôndrias de frutos dos diferentes genótipos de tomate;
- 3) Explorar a influência da disponibilidade da UQ na capacidade respiratória das vias AOX e COX em mitocôndrias de frutos dos diferentes genótipos de tomate;
- 4) Determinar a influência da disponibilidade de UQ na capacidade das mitocôndrias em sintetizar e acumular AA em mitocôndrias de frutos dos diferentes genótipos de tomate.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Produção e obtenção do material vegetal

Frutos de tomate foram produzidos em casa de vegetação na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CCTA-UENF), em Campos dos Goytacazes - RJ. Foram utilizados três genótipos de tomate cereja (*Solanum lycopersicum* 'West Virginia 106'), sendo um do tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas ($P_{35S}:Slgalldh^{RNAi}$ 5-13 e 8-14) com silenciamento da enzima GalLDH. As sementes foram cedidas pelo pesquisador Pierre Baldet do Institut National de La Recherche Agronomique, Université Bordeaux, França, e foram plantadas em vasos plásticos com volume de 5 litros com terra vegetal misturada com areia e enriquecida com 10% de húmus. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, regadas segundo a necessidade, diariamente, sendo mantidas com adubações e tratamentos culturais de acordo com as necessidades da cultura. Os frutos de tomate foram colhidos no estágio 0 de maturação e após seleção, transportados para o Setor de Fisiologia Vegetal (SFV/LMGV) da UENF, onde foram realizados os ensaios. Foram utilizados frutos no estágio de desenvolvimento verde (maturação fisiológica). A padronização dos estágios de desenvolvimento foi baseada principalmente pela coloração da casca e firmeza dos frutos.

4.2. Padronização dos frutos

4.2.1. Coloração do epicarpo

As medições de coloração do epicarpo foram realizadas utilizando um colorímetro portátil. (Croma meter, modelo CR-300, Minolta, Japão). Foram realizadas três medições em pontos equidistantes e distintos na superfície equatorial de cada fruto, analisando três parâmetros a partir do espaço de cor CIELab: a luminosidade (L^*) dos frutos, variando de $L^* = 0$ (preto), percorrendo o cinza até $L^* = 100$ (branco) e ângulo de cor, *hue*, que ao apresentar valores próximos a 90° está indicando que a coloração da casca está amarela, enquanto resultados próximos aos 180° estão tendendo à cor verde (McGuire, 1992).

4.2.2. Firmeza do fruto

A firmeza dos frutos foi mensurada utilizando um texturômetro digital (Texture analyser, modelo TA.XT Express, UK) com ponta de prova de 2 milímetros de diâmetro e com um deslocamento vertical de 1 cm a partir da casca aprofundando-se através da polpa. A velocidade de penetração da sonda nos frutos foi de $1,0 \text{ mm s}^{-1}$, sendo registrados os valores quando a sonda detectou resistência igual a 0,1 Newton. Foram efetuadas duas medições em cada fruto sempre na região equatorial e em lados opostos, sendo registrada pelo equipamento a maior força durante a penetração e os resultados expressos em Newtons.

4.3. Isolamento das mitocôndrias

As mitocôndrias foram isoladas a 4°C a partir de amostra da polpa do tomate contendo cerca de 40 g de massa fresca. O tecido foi homogeneizado em mixer (modelo R16720, Walita, Brasil) em aproximadamente 300 mL de solução tampão de isolamento (sacarose 0,4 M, MOPS 50 mM, EDTA 8 mM, Cys 4 mM, BSA 0,5%, PVP-25 0,4% (p/v), pH 7,4), sob agitação constante. O macerado teve o pH final ajustado para 7,6 e foi filtrado através de uma camada de Miracloth (Calbiochem, CA, USA) para ser centrifugado a 2.000 g por 15 min. O sobrenadante foi centrifugado a 11000 g

por 20 min, sendo o pellet ressuspendido em tampão de lavagem (sacarose 0,4 M, MOPS 10 mM, EDTA 0,5 mM, BSA 0,5 % (p/v), pH 7,2). Esta suspensão foi centrifugada a 1.000 g por 8 min, sendo o sobrenadante, novamente, centrifugado a 10.000 g por 15 min, para obtenção das mitocôndrias lavadas.

Para a purificação das mitocôndrias foi utilizado um gradiente em *Percol*. O pellet gerado na fase anterior foi suspenso em 1 a 2 mL do tampão de lavagem e vertido sobre 30 mL de tampão de purificação (*Percol* 22,5 % (v/v), manitol 0,7 M, MOPS 10 mM, BSA 0,5 % (p/v), pH 7,2), sendo centrifugado a 12.000 g por 45 min. As mitocôndrias, purificadas, foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur, na região compreendida entre o terço médio e o último terço do tubo no sentido de cima para baixo. Após a coleta, as mitocôndrias foram diluídas aproximadamente dez vezes com tampão de lavagem, sendo centrifugadas a 10.000 g por 15 min. Todo o procedimento seguiu o protocolo proposto por Oliveira et al. (2015) e a concentração de proteínas foi determinada espectrofotometricamente a 595nm, como descrito por Bradford, (1976), utilizando BSA como proteína padrão.

4.4. Determinação da integridade de membrana

O ensaio foi conduzido a 25°C. Em 1,0 mL do meio de reação [manitol 0,35 M, tampão fosfato 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA 0,5% (p/v), pH 7,2] foram adicionados 5-20 µL de mitocôndrias purificadas seguindo-se de adição de AA 500 mM para iniciar o consumo de O₂, sendo registrada a taxa respiratória (a), após ser adicionado citocromo c 5 mM, para possível detecção de aumento na taxa respiratória (b) caso as membranas mitocondriais estejam rompidas e o citocromo c tenha acesso à membrana interna. Após isso foi efetuada a adição de Triton®, detergente que provoca o rompimento de membranas, com intuito de verificar se após sua adição ocorreria aumento na taxa respiratória(c), caso isso ocorresse significaria que o citocromo c adicionado anteriormente teve acesso ao interior da organela pelo seu rompimento. Foi medida a taxa respiratória nestas três etapas para detectar a integridade das organelas através da expressão seguinte, segundo Oliveira et al. (2017):

$$1 - \frac{\text{Taxa respiratória}(b) - \text{Taxa respiratória}(a)}{\text{Taxa respiratória}(c) - \text{Taxa respiratória}(a)} \times 100$$

4.5. Ensaio

a. Influência da atividade da enzima GalLDH e da síntese de AA no estado redox da UQ

Foram utilizados frutos verdes homogêneos do tipo selvagem (WT) e das duas linhagens transgênicas (GalLDH 5-13 e GalLDH 8-14). Os frutos receberam os tratamentos descritos na Tabela 1 com o auxílio de uma seringa e permaneceram armazenados em repouso em câmara com controle de umidade ($85\% \pm 5\%$) e temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), durante 24 horas. Em seguida, foi realizado o procedimento de extração do tecido mesocárpico dos frutos, que foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posterior avaliação do estado redox da ubiquinona como descrito a seguir.

Tabela 1. O experimento foi constituído por seis tratamentos utilizando-se para isto três genótipos de tomate tratados com água (controle) e tratados com GalL (10Mm) através do método de injeção.

GENÓTIPOS	TRATAMENTOS	
WT	Água	GalL
GalLDH 5-13	Água	GalL
GalLDH 8-14	Água	GalL

Todo o processo foi realizado rapidamente em ambiente escuro para evitar oxidação do material vegetal.

O protocolo para determinação do estado redox da ubiquinona em tomate tomou como base o protocolo utilizado para *Arabidopsis thaliana*, segundo Yoshida et al. (2010), com algumas alterações, quando se fez necessário.

Para a extração de quinonas, aproximadamente 400mg de tecido da polpa foram macerados em cerca de 2000 μL de acetona resfriada. O macerado foi centrifugado durante 1 min a 6590 g. Ao pellet foram adicionados

800 μL de acetona, e em seguida, a amostra foi centrifugada novamente durante 1 min a 6590 g, sendo o sobrenadante descartado.

Para obter uma alta eficiência de extração, 1500 μL de hexano, um solvente com elevada solubilidade lipídica, foi adicionado ao sedimento, e centrifugado de forma semelhante, sendo o sobrenadante evaporado até a secura sob uma corrente de vácuo.

O sedimento contendo extratos de quinona recolhidos anteriormente foi dissolvido em cerca de 300 μL de acetona. Finalmente, as amostras foram centrifugadas durante 2 min a 10000 g para a remoção de impurezas.

Ao pellet foram adicionados 300 μL de acetona. A amostra foi para o sistema de HPLC para a separação completa e quantificação de quinonas como descrito a seguir. Em termos de detectores, foram utilizados um detector de PDA (SPD-M20A, Shimadzu, Kyoto, Japan) e um detector de fluorescência (RF-10A, Shimadzu).

A separação de quinonas foi realizada por uma coluna "Ultra C18" ϕ 4,6 x 150 mm, partículas de 3 μm , (Tosoh, Tokyo, Japan) a 40 °C. A taxa de fluxo foi de 1,5 ml min^{-1} [acetonitrila:etanol 3:1(v / v)]. Os volumes de injeção para padrões e extratos de plantas foram de 20 μL para ambos.

b. Avaliação da atividade da GalLDH

A atividade da enzima GalLDH foi mensurada em mitocôndrias purificadas de frutos na presença do substrato GalL 5 mM. Cerca de 1 mg de mitocôndrias purificadas foi incubado em tampão Tris 50 mM, pH 7,8 na presença de citocromo c 5 mM, Triton X-100 5% (v/v) e azida 5 mM (para manter o citocromo c reduzido). A reação se iniciou com a adição de GalL 5 mM e a redução do citocromo c pelo GalL foi monitorada a 550 nm em intervalos de 10 segundos durante aproximadamente 2 minutos.

Foi obtido um tratamento apenas na presença do substrato GalL 5 mM. Além disso, sua atividade também foi avaliada após adição subsequente do inibidor SHAM 50 mM.

Para verificar o efeito da disponibilidade de UQ na atividade da enzima GalLDH, as mitocôndrias receberam UQ 10 μM , iniciando-se a atividade da

enzima após a adição de GalL 5 mM. Seu efeito também foi avaliado após adição sequencial do inibidor da via AOX, SHAM 50 mM (Tabela 2).

A atividade da GalLDH foi avaliada espectrofotometricamente a partir da redução do citocromo c a 550 nm, acompanhando o método similar ao descrito por Ôba et al. (1995), com algumas modificações.

Tabela 2. O experimento será constituído pelos tratamentos utilizando-se para isto três genótipos (WT, GalLDH 5-13 e GalLDH 8-14), como descrito a seguir. Utilizou-se as concentrações de GalL (5 mM), SHAM (50 mM) e UQ (10 μ M).

GENÓTIPOS	TRATAMENTOS			
	GalL	GalL+SHAM	GalL+UQ	GalL+UQ+SHAM
WT	GalL	GalL+SHAM	GalL+UQ	GalL+UQ+SHAM
GalLDH 5-13	GalL	GalL+SHAM	GalL+UQ	GalL+UQ+SHAM
GalLDH 8-14	GalL	GalL+SHAM	GalL+UQ	GalL+UQ+SHAM

c. Atividade Respiratória

Foi utilizado 1 mg de proteína para determinação da atividade respiratória das mitocôndrias isoladas, pelo método polarográfico, usando um eletrodo de O₂ tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK) em 1,0 mL de meio de reação [manitol 0,35 M, tampão fosfato 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA 0,5% (p/v), pH 7,2] à temperatura de 25°C.

Todo o ensaio foi realizado na presença de NADH 8 mM como substrato oxidável. Após a adição de 100 nmoles de ADP ao meio de reação foram registrados os estados 3 e 4 da respiração, sendo determinado o controle respiratório, evidenciando a capacidade fosforilativa das mitocôndrias (Duque e Arrabaça, 1999; Pinheiro et al., 2004; Mariano et al., 2008; Oliveira et al., 2015), usado como indicativo de boas preparações mitocondriais.

A capacidade da via AOX foi determinada a partir da taxa de consumo de O₂ na presença de azida 3 mM, em mitocôndrias no estado 4 (Oliveira et al., 2015). Enquanto a adição de 20 μ M de SHAM tem como objetivo a inibição da AOX.

A partir dos registros do consumo de O₂ foram calculadas a taxa respiratória total, a taxa respiratória da via COX e a taxa respiratória da via

AOX para efeito de comparação entre as duas vias de consumo de O₂ seguindo o protocolo proposto por Oliveira et al. (2015).

d. Determinação da participação da AOX e COX

A atividade respiratória em mitocôndrias de frutos foi mensurada somente na presença de GalL 5mM. E, para verificar o efeito da UQ na participação das vias AOX e COX, as mitocôndrias purificadas receberam UQ 10 µM, iniciando-se o processo respiratório com a adição do substrato GalL 5 mM. Também foi verificado o efeito da UQ utilizando o NADH 8 mM como substrato inicial.

Para a inibição das vias AOX e COX foram utilizados o SHAM 4 mM e azida 5 mM, respectivamente.

Foi utilizado 1 mg de proteína para determinação da atividade respiratória das mitocôndrias isoladas, pelo método polarográfico, usando um eletrodo de O₂ tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK) em 1,0 mL de meio de reação [manitol 0,35 M, tampão fosfato 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA 0,5% (p/v), pH 7,2] a 25°C.

A determinação da participação da AOX foi obtida a partir da medição da taxa de consumo de O₂ com a adição de SHAM 50 mM no estágio 4 da respiração e expressa em porcentagem, após adicionou-se azida de potássio 0,08 M para confirmar que a respiração restante é proveniente da COX, processo adaptado de Duque e Arrabaça (1999).

e. Determinação do teor de AA

Para determinar o teor de AA, foi utilizado um tratamento somente na presença de GalL 5 mM. E, para verificar o efeito da UQ na acumulação de AA, as mitocôndrias purificadas foram pré-tratadas com GalL 5 mM em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 em presença da UQ 10 µM com volume final de 275 µL. O teor de AA também foi mensurado somente na presença de UQ 10 µM (Tabela 3).

As quantificações do teor de AA foram medidas 2 horas após serem incubadas na solução acima descrita. Ao fim do tempo foi adicionado TFA (5%)

para precipitar as proteínas. A solução foi centrifugada a 10.000 g por 10 min e o sobrenadante, congelado imediatamente para avaliação do AA.

Para a quantificação do teor de AA, as amostras foram condicionadas à condição neutra adicionando-se tampão fosfato 100 mM, pH 13,0 (K₂HPO₄) seguido de incubação com DTT 5 mM por 5 min. As amostras foram filtradas com filtro de nylon, com diâmetro de poro de 0,22 µm ou 0,45 µm.

Para a determinação do teor de AA foram injetadas 20 µL das amostras em HPLC (modelo LC-10AD, Shimadzu, Japan) acoplado a um registrador/integrador (chromatopac, modelo C-R6A, Shimadzu, Japan). A corrida foi realizada com uma coluna "Spherisorb ODS C18" a uma velocidade de fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, sendo o pico de AA identificado aos 2,5 min, padronizado pelo uso de solução padrão de AA. Os resultados foram expressos em µmol.mg proteína⁻¹.

Tabela 3. O experimento será constituído pelos tratamentos utilizando-se para isto três genótipos (WT, GalLDH 5-13 e GalLDH 8-14), como descrito a seguir. Utilizou-se as concentrações de GalL (5 mM) e UQ (10 µM).

GENÓTIPOS	TRATAMENTOS		
	GalL	UQ	GalL + UQ
WT	GalL	UQ	GalL + UQ
GalLDH 5-13	GalL	UQ	GalL + UQ
GalLDH 8-14	GalL	UQ	GalL + UQ

4.6. Relação da GalLDH na biossíntese de H₂O₂

A relação da atividade GalLDH na formação de H₂O₂ foi quantificada seguindo protocolo proposto por Invitrogen® (2009), utilizando Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay para medir a formação de H₂O₂ via fluorescência.

A medição consistiu na detecção da atividade da peroxidase em extrato mitocondrial na faixa de excitação de 550 nm e emissão de 600 nm. O extrato foi suplementado com GalL 1M para estímulo da via GalLDH. Foram utilizados os inibidores das vias oxidases terminais AOX e COX e UQ oxidada como estimulante respiratório para detecção da influência destes na formação de H₂O₂ em conjunto com GalLDH.

Os dados coletados baseiam-se no aumento ou diminuição da taxa de produção de peróxido, uma vez que normalmente já existe uma produção basal de H₂O₂ independente da adição de quaisquer substratos.

4.7. Análises estatísticas

O experimento foi conduzido seguindo um DIC, sendo composto por três genótipos: selvagem (WT) e as duas linhagens transgênicas (GalLDH 5-13 e GalLDH 8-14) no estágio de maturação verde, com 5 repetições de cada tratamento realizado.

Após a coleta dos dados, estes foram submetidos à ANOVA ($P < 0,05$) e as médias foram comparadas por Teste Tukey em nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Assistat.

5. RESULTADOS

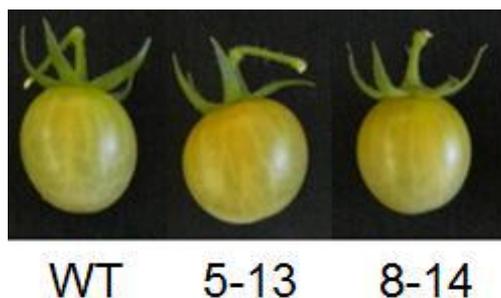
Caracterização do estágio de amadurecimento

A caracterização do estágio de amadurecimento dos frutos foi determinada utilizando os parâmetros de coloração da casca (luminosidade (L^*) e ângulo *hue*) e firmeza da polpa, sendo utilizados frutos no estágio verde, colhidos aproximadamente 25 dias após a antese para os três genótipos.

A coloração característica do epicarpo dos frutos de tomate cereja no estágio verde está demonstrada na Figura 4. Os valores de luminosidade não diferiram ($P \leq 0,05$) entre os genótipos, apresentando médias de 62,1, 63,2 e 63,8 respectivamente, para os genótipos WT, GalLDH 5-13 e GalLDH 8-14 (Figura 4). No que diz respeito ao ângulo de cor *hue*, os valores também não diferiram entre os genótipos. As médias variaram de 114,4 °h, 116,4 °h e 116,6 °h, respectivamente, para os genótipos WT, 5-13 e 8-14 (Figura 4).

Não se observou diferença significativa ($P \leq 0,05$) para nenhum parâmetro de cor entre os genótipos WT, GalLDH 5-13 e GalLDH 8-14.

Nas médias de firmeza dos frutos foi verificada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os genótipos, onde a linhagem 8-14 apresentou a maior média de 9,7 N, exigindo maior força para o rompimento desta (Figura 4). Os genótipos WT e GalLDH 5-13 apresentaram média de força de 8,5 N (Figura 4).



Genótipos	Luminosidade <i>L</i> *	Ângulo de cor <i>hue</i> (h°)	Firmeza (N)
WT	62,1 a	114,4 a	8,5 b
GalLDH 5-13	63,2 a	116,4 a	8,5 b
GalLDH 8-14	63,8 a	116,6 a	9,7 a

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Figura 4. Caracterização dos frutos de tomate cereja (*S. lycopersum* 'West Virginia 106') do tipo selvagem (WT) e linhas transgênicas (5-13 e 8-14) com a GalLDH silenciada em estágio de maturação verde de acordo com os respectivos parâmetros de coloração e firmeza.

Influência da atividade da enzima GalLDH e da síntese de AA no estado redox da UQ

Os resultados obtidos mostram que apenas no genótipo WT apresentou média superior ($P \leq 0,05$) à adição de GalL, de forma que os demais genótipos apresentaram apenas tendências. Os dados demonstram aumento ($P \leq 0,05$) de aproximadamente 67% na quantidade de UQ reduzida produzida para o genótipo WT (Figura 5). A aplicação de 10 mM de GalL aumentou ($P \leq 0,05$) o nível de redução da UQ em relação ao tratamento controle (não tratado com GalL), com médias variando de 883,86 nmol/g MF e 527,07 nmol/g MF, respectivamente (Figura 5).

Resultados distintos podem ser observados nas linhas transgênicas (5-13 e 5-14) com a GalLDH silenciada, onde a adição do GalL não influenciou ($P \leq 0,05$) no estado redox da UQ quando comparado ao controle, não aumentando a produção de UQ reduzida. Foram verificados valores médios para a razão UQH_2/UQ entre frutos tratados com GalL e não tratados,

respectivamente de 681,81 nmol/g MF e 608,97 nmol/g MF para a linha 5-13 e 626,72 nmol/g MF e 621,02 nmol/g MF para a linha 8-14 (Figura 5).

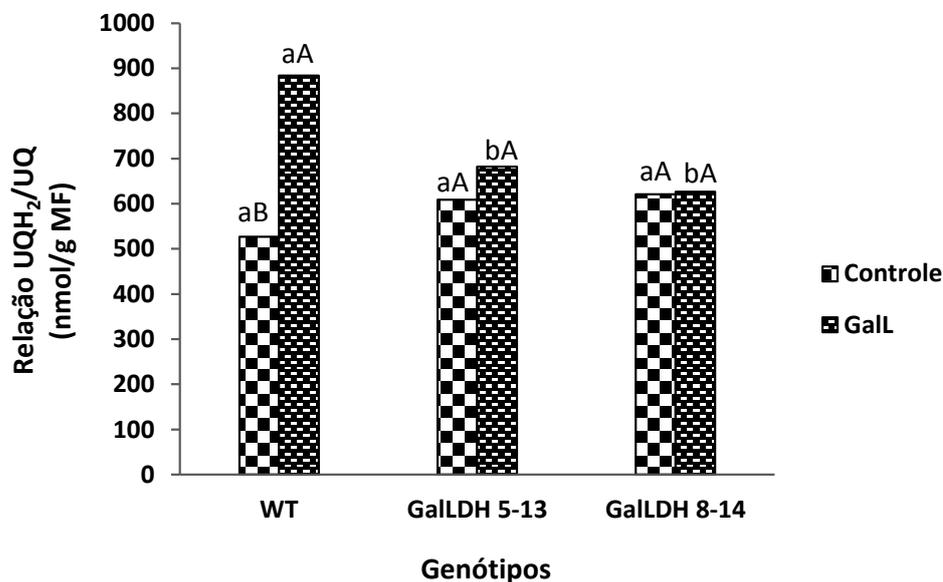


Figura 5. Relação UQH₂/UQ (nmol/g MF) em frutos verdes de tomate de três genótipos (WT, 5-13 e 8-14) tratados com 10 mM de GalL em comparação aos frutos não tratados (controle).

*As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre a relação UQH₂/UQ para o mesmo genótipo, enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre os genótipos pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Influência da disponibilidade da UQ na atividade da enzima GalLDH

Os resultados mostram que a atividade da enzima GalLDH foi aproximadamente 2 vezes maior ($P \leq 0,05$) no genótipo WT quando comparado com as linhas transgênicas 5-13 e 8-14 (Figura 6), o que já era esperado devido ao silenciamento da GalLDH. A linha 5-13 apresentou aproximadamente 45% da atividade da GalLDH, enquanto a linha 8-14 apresentou cerca de 47% da atividade da enzima, quando comparadas ao genótipo WT.

A adição do inibidor da via AOX, SHAM, levou a uma redução intensa ($P \leq 0,05$) na atividade da GalLDH em todos os genótipos (Figura 6). Entre os genótipos, o WT apresentou queda de 72% na atividade GalLDH após a adição de SHAM. Já as linhas transgênicas 5-13 e 8-14 apresentaram quedas

aproximadas de 100% e 94%, respectivamente, na atividade GalLDH. É possível observar uma queda menos drástica no genótipo WT, quando comparado às linhas transgênicas. Esse resultado já era esperado, uma vez que a atividade da GalLDH foi maior no genótipo WT (Figura 6).

A adição de UQ marcadamente aumentou ($P \leq 0,05$) a atividade GalLDH em todos os genótipos analisados (Figura 6). No genótipo WT o efeito da adição de UQ na atividade GalLDH foi menos intenso que nas linhas transgênicas com aumentos médios de 23% para o genótipo WT e de 90% e 37% para as linhas 5-13 e 8-14, respectivamente, enquanto que a atividade da enzima se mostrou igualmente reduzida após a adição de SHAM (na presença de UQ) em todos os genótipos (Figura 6).

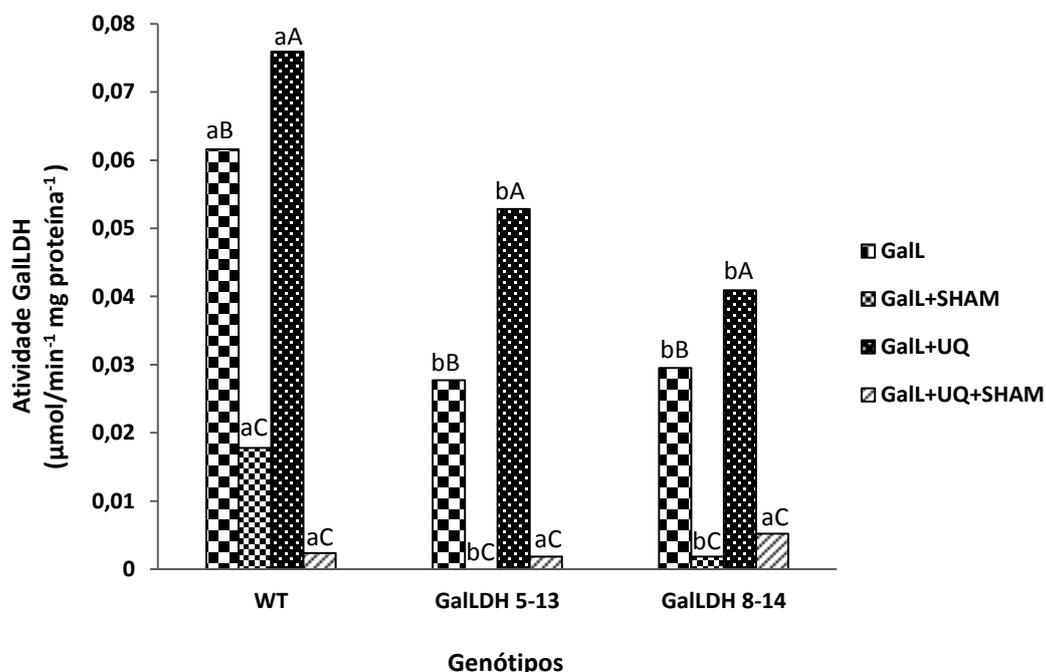


Figura 6. Atividade GalLDH (determinada pela redução do citocromo c) em mitocôndrias purificadas de frutos verdes de tomate de três genótipos (WT, 5-13 e 8-14) tratados com 5 mM de GalL na presença ou não de 5 mM de UQ e de 50 mM de SHAM (inibidor da AOX). As adições não foram sequenciais. Durante todo o processo a COX permaneceu inibida com azida.

*As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre a atividade da GalLDH do mesmo genótipo, enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre os genótipos pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Atividade respiratória em mitocôndrias isoladas

O isolamento e a purificação das mitocôndrias, por meio do gradiente em *percoll*, possibilitaram a obtenção de mitocôndrias com integridade de membrana superior a 80% em todas as preparações. Testes preliminares foram realizados para a checagem da pureza e integridade das mitocôndrias obtidas a partir da polpa dos frutos. Os resultados mostram que o controle respiratório (CR) apresentou valores médios de 1,7, 1,6 e 1,5 para os genótipos WT, GalLDH 8-14 e GalLDH 5-13, respectivamente, indicando que as mitocôndrias estavam com bom nível de acoplamento na oxidação do NADH (Oliveira et al., 2017). A Figura 7 mostra as taxas de consumo de O₂ das mitocôndrias de frutos de tomate selvagem e transgênicos com a GalLDH silenciada, representando a respiração total e a respiração devido à participação da COX e da AOX.

Os resultados não apresentaram diferença ($P \leq 0,05$) em relação à respiração total, com taxas médias de 169,27; 213,36 e 209,66 nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ para os genótipos WT, GalLDH 8-14 e GalLDH 5-13, respectivamente (Figura 7). Por outro lado, o genótipo WT apresentou a maior ($P \leq 0,05$) participação da COX, na comparação com os demais genótipos, enquanto a participação da AOX foi maior ($P \leq 0,05$) nas linhas transgênicas comparativamente ao genótipo WT (Figura 7). No genótipo WT, a maior parte da respiração é dada pela COX, com cerca de 64% do consumo total de O₂ das mitocôndrias, enquanto cerca de 36% do consumo de O₂, se deve à participação da AOX na respiração. Resultados distintos foram encontrados para as linhas transgênicas GalLDH 8-14 e GalLDH 5-13, onde a participação da AOX foi superior à COX, apresentando cerca de 67 e 77% da respiração dada pela AOX, enquanto a participação da COX foi de cerca de 33 e 23%, respectivamente (Figura 7).

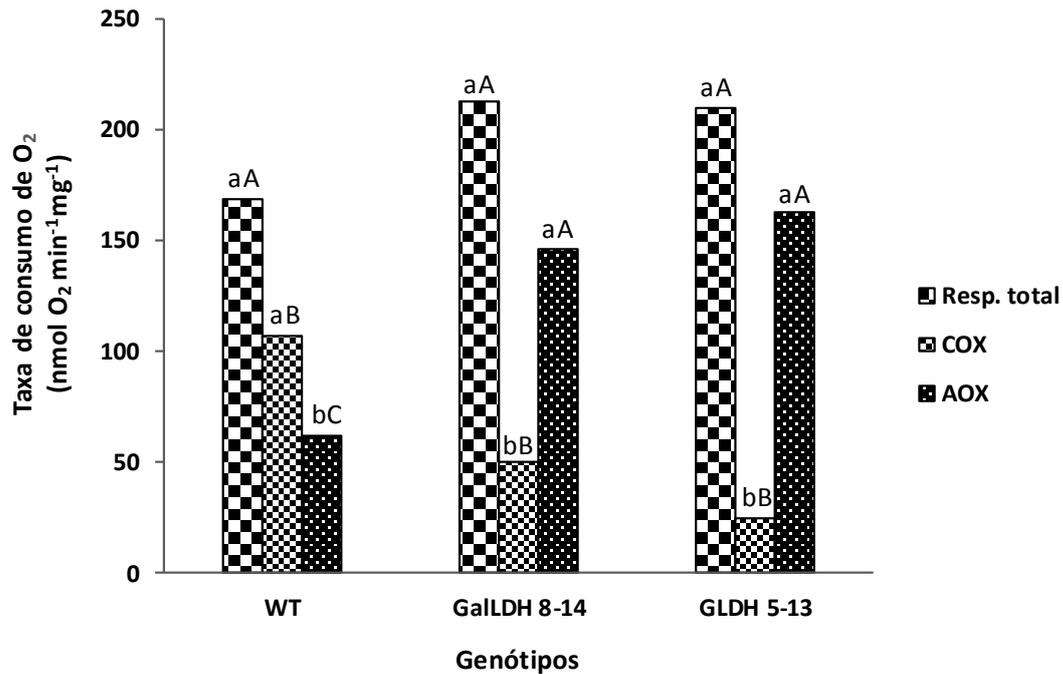


Figura 7. Taxa de consumo de O₂ (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹) total e participação das vias citocromo c oxidase (COX) e oxidase alternativa (AOX) em mitocôndrias de frutos de tomate de três genótipos (WT, 5-13 e 8-14) iniciada com o substrato respiratório NADH 8 mM no meio de reação. As adições foram sequenciais.

*As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre as taxas respiratórias para o mesmo genótipo, enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre os genótipos (WT, 5-13 e 8-14), pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Influência da disponibilidade de UQ na capacidade respiratória das vias AOX e COX em mitocôndrias de frutos dos diferentes genótipos de tomate

Os resultados mostram que a respiração nas mitocôndrias isoladas no genótipo WT, assim como nas linhas transgênicas 8-14 e 5-13 foi visualmente maior quando utilizado o NADH na comparação com o Gall como substratos da respiração (Figuras 8A e 8B). No genótipo WT, a respiração total iniciada com o substrato NADH foi 5 vezes maior, quando se utilizou o Gall como substrato. Em contrapartida, as linhas transgênicas, 5-13 e 8-14, apresentaram taxas respiratórias 3 vezes maior quando se utilizou o NADH como substrato.

Cabe ressaltar que essa comparação é visual, não tendo sido testada estatisticamente.

Na avaliação da respiração pelo consumo de GalL como substrato, observa-se um incremento ($P \leq 0,05$) da taxa respiratória após a adição de UQ em todos os três genótipos avaliados (Figura 8A). O genótipo WT apresentou incremento de aproximadamente 46%, enquanto as linhas 5-13 e 8-14 apresentaram aumentos próximos a 62% e 41% após adição da UQ quando comparado ao controle, onde não houve adição de UQ.

A adição do bloqueador da via AOX, SHAM não inibiu ($P \leq 0,05$) o consumo de O_2 nas mitocôndrias isoladas tanto no genótipo WT como nas linhas 5-13 e 8-14. Ainda, o bloqueio adicional (a via AOX já estava bloqueada) da via COX pela adição de azida também não inibiu significativamente a respiração nos genótipos WT e nas linhas 8-14 e 5-13 (Figura 8A). Após adição dos inibidores, o genótipo WT ainda permaneceu com aproximadamente 61% do consumo de O_2 inicial, enquanto as linhas 8-14 e 5-13 mantiveram aproximadamente 47% e 45% do consumo de O_2 inicial, respectivamente. A respiração do GalL foi maior ($P \leq 0,05$) na linha 8-14 em relação aos genótipos WT e linha 5-13, os quais não diferiram ($P \leq 0,05$) entre si (Figura 8A).

Quando foi utilizado o NADH 8mM como substrato respiratório, verificou-se diferença ($P \leq 0,05$) na taxa respiratória total entre o genótipo WT e as linhas transgênicas GalLDH 5-13 e GalLDH 8-14, não sendo verificadas diferenças significativas entre esses dois genótipos (Figura 8B). Diferentemente do observado quando foi utilizado o GalL como substrato respiratório (Figura 8A), quando se utilizou o NADH na respiração, a adição de UQ não influenciou ($P \leq 0,05$) na taxa respiratória em nenhum dos genótipos analisados, de forma a perceber apenas tendências (Figura 8B). Quando utilizado o NADH na respiração, a adição do bloqueador da AOX, SHAM, inibiu ($P \leq 0,05$) a respiração no genótipo WT e na linha transgênica 5-13, não sendo efetivo ($P \leq 0,05$) na linha 8-14 (Figura 8B). Por outro lado, ao ser bloqueado também a via COX a partir da adição de azida, verificou-se uma inibição ($P \leq 0,05$) da taxa respiratória em todos os genótipos (Figura 8B), diferentemente do verificado quando utilizado o GalL como substrato respiratório (Figura 8A). Após adição dos inibidores, o genótipo WT apresentou

apenas cerca de 5% do consumo de O₂ inicial, enquanto as linhas 8-14 e 5-13 mantiveram aproximadamente 10% e 7% do consumo de O₂ inicial, respectivamente, o que é considerado aceitável (Figura 8B).

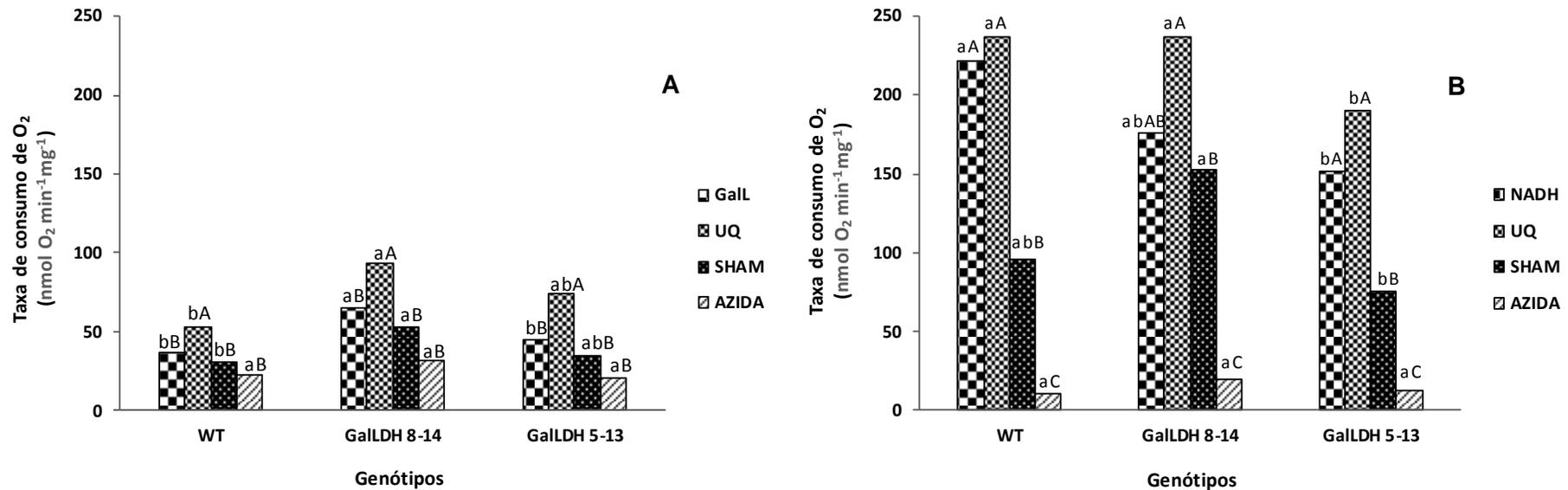


Figura 8. Taxa de consumo de O₂ (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹) em função da disponibilidade de UQ 10 μM e da presença dos inibidores da AOX, SHAM (4 mM) e da COX, azida (5 mM) em mitocôndrias purificadas de frutos verdes de tomate de três genótipos (WT, 5-13 e 8-14). Foram utilizados o GalL 5 mM (A) e o NADH 8 mM (B) como substratos respiratórios. As adições de GalL, UQ, SHAM e azida foram sequenciais.

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre as taxas respiratórias para o mesmo genótipo, enquanto as médias seguidas da mesma letra minúsculas não diferem entre si na comparação entre os genótipos pelo teste Tukey (P≤0,05).

Influência da disponibilidade de UQ na capacidade das mitocôndrias em sintetizar e acumular AA

A acumulação total de AA em mitocôndrias de frutos de tomate foi mensurada em presença do substrato respiratório GalL e da adição de UQ por um tempo de incubação de 2 h.

A síntese de AA não apresentou diferença ($P \leq 0,05$) na presença do substrato respiratório GalL para nenhum dos genótipos. Os valores médios de acúmulo de AA permaneceram muito baixos, variando de 8,0 nmol mg⁻¹ proteína⁻¹ para o genótipo WT e de 8,0 nmol mg⁻¹ proteína⁻¹ e 10,0 nmol mg⁻¹ proteína⁻¹ para as linhas 5-15 e 8-14, respectivamente (Figura 9).

Ao adicionar a UQ isoladamente para quantificação do acúmulo de AA, os resultados também não se mostraram significativos para nenhum dos genótipos e nem em comparação aos demais tratamentos (Figura 9). A adição da UQ produziu quantidades semelhantes de AA ao tratamento em que se adicionou o GalL isoladamente, com médias que variaram de 7,0 nmol mg⁻¹ proteína⁻¹ para o WT e 8,0 nmol mg⁻¹ proteína⁻¹ e 9,0 nmol mg⁻¹ proteína⁻¹ para as linhas 5-13 e 8-14, respectivamente (Figura 9).

Ao adicionar GalL e UQ à mesma amostra também não houve diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os genótipos e nem em relação aos demais tratamentos (Figura 9). Os valores permaneceram praticamente os mesmos para os três genótipos variando de 9,0 a 10,0 nmol mg⁻¹ proteína⁻¹ (Figura 9).

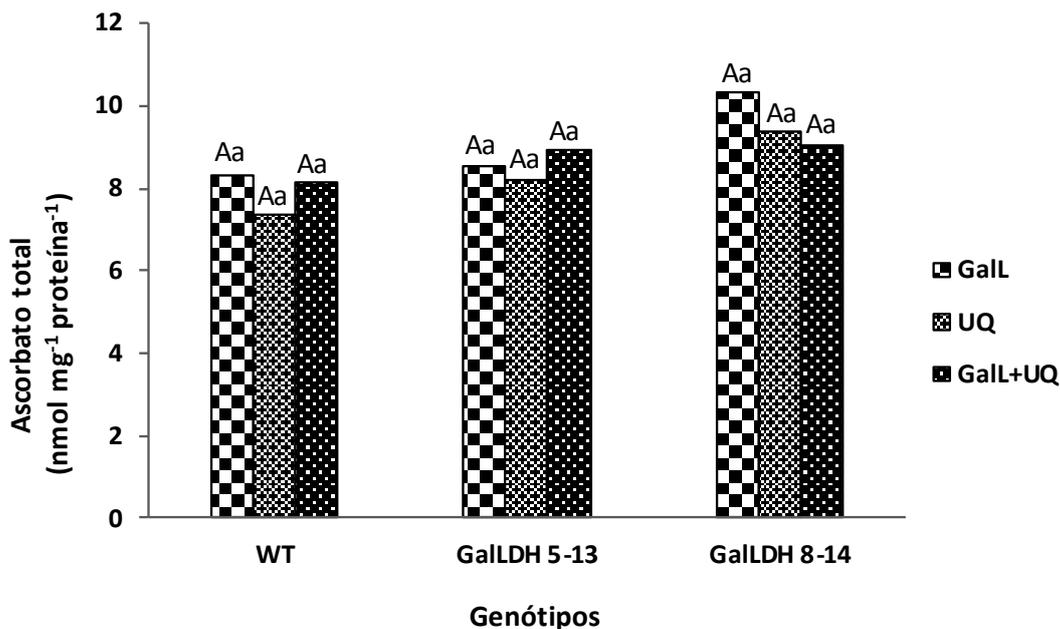


Figura 9. Produção de AA ($\text{nmol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$) em função da disponibilidade de UQ ($10 \mu\text{M}$) em mitocôndrias purificadas de frutos verdes de tomate de três genótipos (WT, 5-13 e 8-14). As adições de GalL (5 mM), UQ e GalL+UQ não foram sequenciais.

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre a acumulação de AA para o mesmo genótipo, enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre os genótipos (WT, 5-13 e 8-14) pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Influência da GalLDH na produção de H_2O_2

A Figura 10 apresenta as taxas de aumento na produção de H_2O_2 diante da adição de diversos componentes, lembrando que existe já uma produção basal de H_2O_2 na mitocôndria.

Ao avaliar a produção de H_2O_2 após a adição de GalL, verificou-se um aumento ($P \leq 0,05$) nas taxas de produção de H_2O_2 , aproximadamente 1,5 vezes, no genótipo WT quando comparado às linhagens transgênicas (Figura 10). As médias foram de $2560,5 \text{ unidade mg}^{-1} \text{ proteína}$ para o genótipo WT, $1847,7 \text{ unidade mg}^{-1} \text{ proteína}$ para a linha 5-13 e $1794,5 \text{ unidade mg}^{-1} \text{ proteína}$ para a linha 8-14 (Figura 10). Quando adicionada a UQ sequencialmente ao meio, o aumento na taxa de produção de H_2O_2 foi menor ($P \leq 0,05$) do que na presença de GalL isoladamente, para os três genótipos. Os valores de

produção de H_2O_2 reduziram ($P \leq 0,05$) passando a 514,6 unidade mg^{-1} proteína para o genótipo WT, a 612,3 unidade mg^{-1} proteína para a linha 5-13 e 700,5 unidade mg^{-1} proteína para a linha 8-14.

Quando a UQ foi adicionada ao meio isoladamente, a produção de H_2O_2 foi maior ($P \leq 0,05$) apenas para o WT, quando comparado ao tratamento com Gall e UQ juntos, apresentando valores médios de 1597,5 unidade mg^{-1} proteína e 514,65 unidade mg^{-1} proteína, respectivamente (Figura 10). Já ao ser comparado com o tratamento que recebeu apenas o substrato Gall, o aumento na produção de H_2O_2 reduziu ($P \leq 0,05$) em todos os genótipos. As médias caíram para 1597,5 unidade mg^{-1} proteína para o genótipo WT, 1205,9 unidade mg^{-1} proteína para a linha 5-13 e 864,5 unidade mg^{-1} proteína para a linha 8-14 (Figura 10).

A adição do inibidor da via AOX levou a uma inibição na produção de H_2O_2 , em todos os genótipos, sendo essa inibição mantida, independente da presença ou não do substrato Gall e da UQ, apresentando aumentos na produção de H_2O_2 próximos a zero, ou seja, a inibição da via AOX não permite aumentos na taxa de produção de H_2O_2 , mantendo apenas a produção basal de H_2O_2 (Figura 10).

Por outro lado, a inibição da via COX, pela adição de azida, promoveu um aumento expressivo ($P \leq 0,05$) na taxa de produção de H_2O_2 , com valores médios de 4552,5 unidade mg^{-1} proteína para o genótipo WT, 4642,5 unidade mg^{-1} proteína para a linha 5-13 e 3933,1 unidade mg^{-1} proteína para a linha 8-14. Os resultados não apresentaram diferenças significativas entre os três genótipos (Figura 10).

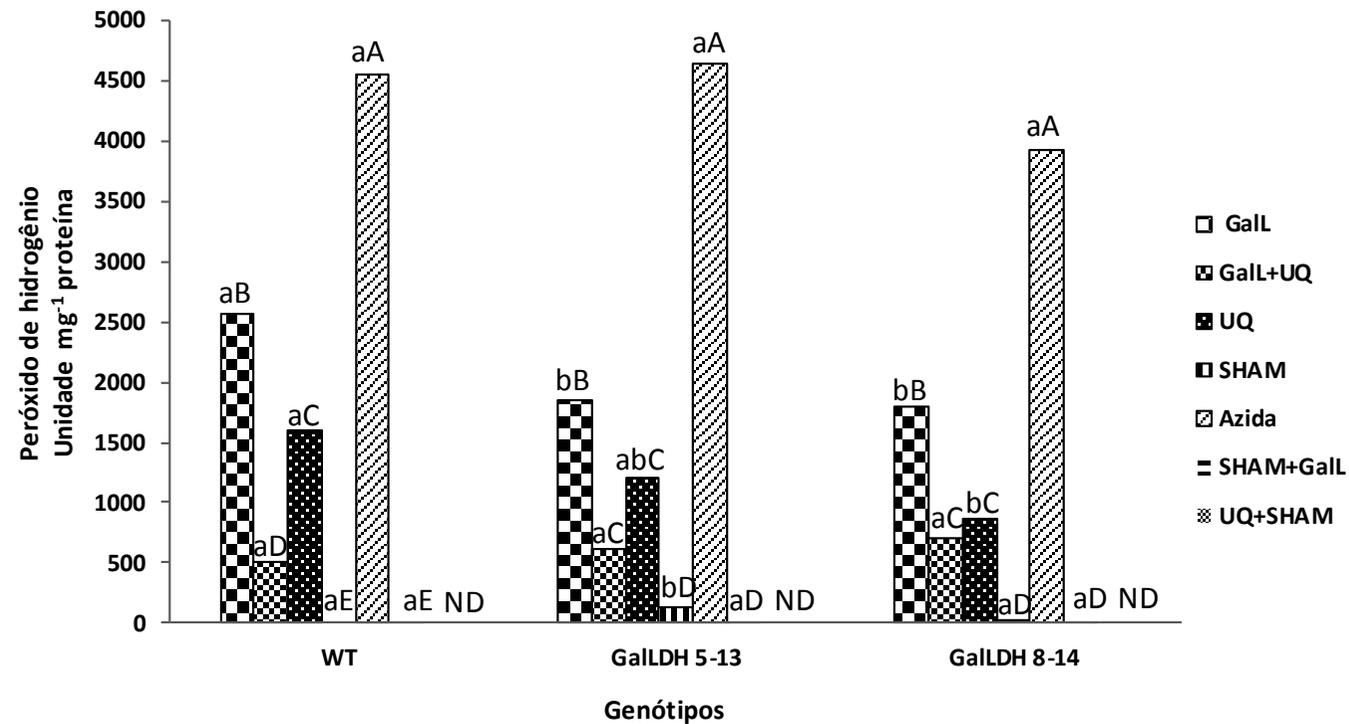


Figura 10. Produção de H₂O₂ (unidade mg⁻¹ proteína) em função das adições de GalL (5 mM), UQ (10 μM), inibidor da AOX, SHAM (2 mM) e do inibidor da COX, azida (2 mM) em mitocôndrias purificadas de frutos verdes de tomate de três genótipos (WT, 5-13 e 8-14).

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre a produção de H₂O₂ para o mesmo genótipo, enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre os genótipos (WT, 5-13 e 8-14) pelo teste Tukey (P≤0,05).

*ND= valor não detectável.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho optou-se por trabalhar com frutos no estágio de amadurecimento verde devido à sua maior homogeneidade. Durante o processo de amadurecimento ocorrem várias transformações bioquímicas que determinam as características de qualidade evidenciadas por mudanças na composição de todo o fruto (Chitarra & Chitarra, 2005). Entre essas transformações destacam-se alteração do metabolismo dos carboidratos, perda de firmeza da polpa, síntese de voláteis (Jain et al., 2003; Fonseca et al., 2007; Bouzayen et al., 2010) e a mudança na coloração, devido à degradação das clorofilas e à síntese dos carotenoides (Jain et al., 2003), o que levam esses frutos a ficarem menos homogêneos, dificultando a caracterização. Assim, os frutos no estágio de maturação mais precoce ajudam na coleta de um material mais homogêneo com menor tendência ao erro.

Os resultados mostram que os frutos de tomate apresentaram boa coloração clara, o que condiz com um fruto verde fisiologicamente maduro e coloração verde claro, tendendo para o amarelo, com valores de luminosidade (L^*) em torno de 60, enquanto o ângulo *hue* apresentou variações em torno de 115 °h, mas sem apresentarem diferença significativa entre os genótipos de acordo com os parâmetros de coloração avaliados nos frutos verdes (Figura 4). Como esperado, devido ao fato de estar trabalhando com genótipos no mesmo

estádio de maturação, é possível perceber que os valores dos parâmetros de coloração se apresentaram similares para os três genótipos, justificando que os frutos no estágio de maturação mais precoce são mais homogêneos.

Outro parâmetro avaliado foi a firmeza dos frutos. Os valores de firmeza apresentados neste trabalho foram de 8,5 N, 8,5 N, e 9,7 N, respectivamente para os genótipos WT, GalLDH 5-13 e GalLDH 8-14, onde o GalLDH 8-14 apresentou valor significativamente superior (Figura 4). Essas médias tendem a diminuir com o passar do tempo, devido à hidrólise de componentes da parede celular, tais como pectina, hemicelulose e celulose causada por enzimas específicas, cuja atividade torna mais pronunciada durante o desenvolvimento do fruto (Cordenunsi et al., 2005; Gayosso-García et al., 2010).

O acréscimo no acúmulo de AA pode ser consequência do aumento da síntese de intermediários precursores da acumulação de AA formados durante o processo de amadurecimento (Mercado-silva et al., 1998; Upadhyaya et al., 2010). Este processo é responsável pela diminuição da firmeza do tecido (Dumville e Fry, 2003; Fontes e Gilbert, 2010). Então se pode afirmar que o aumento no acúmulo de AA está na maioria das vezes relacionado com a perda de firmeza dos frutos (Wheeler et al., 1998; Pinto et al., 2013).

A enzima GalLDH é considerada necessária para o controle da biossíntese de AA (Bartoli et al., 2005). Trabalhos com folhas de tomate inoculadas com *Botrytis cinerea* mostraram uma correlação positiva entre o teor de AA mitocondrial e a atividade máxima da GalLDH (Kuźniak e Skłodowska, 2004). Em trabalho realizado com batatas fatiadas, Oba et al. (1994) verificaram a estimulação da enzima GalLDH aumentando os níveis de AA. Tabata et al. (2001) verificaram a redução no acúmulo de AA em tabaco com o silenciamento do gene da GalLDH. O aumento da expressão desta enzima em tabaco aumentou os níveis de AA de 2 a 4 vezes e aumentou significativamente o processo redox (Chen et al., 2003).

No entanto, apesar da enzima ser necessária para a síntese de AA, nenhuma relação clara entre o conteúdo de AA e a quantidade de proteínas de GalLDH foi encontrada até a data, indicando que a atividade da GalLDH não é um bom marcador da acumulação de AA (Bartoli et al., 2005). Essa baixa correlação entre a atividade da enzima GalLDH e a síntese de AA também foi

verificada no presente trabalho. Não se observou relação direta entre a atividade da enzima GalLDH e a síntese de AA nos genótipos de tomate avaliados, de forma que mesmo sob baixa atividade da enzima a taxa de produção de AA foi mantida similar ao genótipo do tipo selvagem (WT), o que não era esperado uma vez que ao considerar a enzima GalLDH responsável pelo último passo de via de síntese de AA, na sua ausência haveria diminuição na produção de AA, o que não ocorreu.

Outro trabalho que corrobora com os dados aqui apresentados foi realizado por Imai et al. (2009), onde uma tentativa de aumentar a síntese de AA por meio da superexpressão da GalLDH em tabaco também não produziu resultados positivos, levando a evidências de que a acumulação de AA nas mitocôndrias pode não ser tão dependente da atividade da GalLDH.

Essa baixa correlação entre a atividade da enzima GalLDH e a síntese de AA, leva a especulações da existência de um novo caminho de fluxo de elétrons estar fazendo parte do processo de biossíntese de AA em plantas. Acredita-se que durante um mal funcionamento da via COX, e conseqüentemente a não oxidação do citocromo c, a via AOX torna-se necessária para manter a acumulação do AA.

Um resultado importante verificado aqui mostra a diminuição da atividade da GalLDH após o uso do SHAM, inibidor da via AOX nos três genótipos, como verificado na Figura 6. Resultado semelhante foi obtido por Silva (2016), onde trabalhando com mitocôndrias isoladas de frutos de mamoeiro, morangueiro e tomateiro também verificou redução na atividade da enzima GalLDH e do conteúdo total de AA ao bloquear a via AOX. Esse mesmo autor, ao estimular a via AOX utilizando o piruvato, aumentou a produção de AA em mitocôndrias de frutos de mamão e morango.

Ao mesmo tempo, as linhagens transgênicas, GalLDH 5-13 e GalLDH 8-14, apresentaram alta participação da via AOX durante o processo respiratório, sugerindo que na falta ou silenciamento da enzima GalLDH, a AOX atua de forma complementar para manter a síntese de AA (Figura 7 e Figura 9). O trabalho conduzido por Bartoli et al. (2006) corrobora com essa suspeita, mostrando que plantas transgênicas de *A. thaliana* com aumento da expressão da AOX, tanto em folhas inteiras como em mitocôndrias isoladas, apresentam maior acúmulo e a síntese de AA quando comparadas a plantas

controle. Assim, parte-se do pressuposto de que a AOX é necessária para manter a atividade da GalLDH e a acumulação do AA.

As evidências cada vez mais consistentes a respeito da relação direta entre a via AOX e a produção da AA dão suporte aos resultados aqui obtidos, e ajudando a entender como as linhas transgênicas (5-13 e 8-14) da GalLDH silenciadas em frutos de tomate produziram quantidades similares de AA quando comparadas ao tipo selvagem (WT) (Figura 9), corroborando com as evidências de que a acumulação de AA nas mitocôndrias pode ser independente da atividade da GalLDH. O mesmo foi percebido em trabalhos realizados por Alhag Dow et al. (2007), mostrando que mesmo nas linhas GalLDH 5-13 e 8-14, em que a atividade da GalLDH foi significativamente afetada, a taxa de acumulação de AA foi mantida ao mesmo nível que das plantas controle, ao mesmo tempo em que eles verificaram maior atividade da AOX nas linhas transgênicas da GalLDH silenciadas (5-13 e 8-14).

Outro resultado que reforça a relação entre a via AOX, a atividade da GalLDH e a síntese de AA é explícito na atividade respiratória dos frutos. Avaliando-se a taxa respiratória dos genótipos, verificou-se que as linhas com a enzima GalLDH silenciada (5-13 e 8-14) apresentaram expressão da AOX significativamente maior quando comparado ao genótipo WT (Figura 7). Esses dados são consistentes com os de Silva (2016) e Alhag Dow et al. (2007), onde as mesmas linhas transgênicas mostraram maior atividade da AOX comparado ao genótipo selvagem e similar acúmulo de AA mesmo com as baixas quantidades da enzima GalLDH daquelas linhas. Isto reforça ainda mais a hipótese da atividade AOX ser fundamental para a acumulação de AA em frutos.

Ao se analisar a atividade da GalLDH verificou-se que a atividade da enzima é significativamente superior no genótipo WT quando comparado às linhagens transgênicas, de forma que este deveria apresentar uma maior síntese de AA, o que não ocorre, como aqui verificado. Quando foi bloqueada a via AOX com seu respectivo inibidor, SHAM, verificou-se uma queda brusca na atividade da enzima GalLDH, em ambos os genótipos (Figura 6). De forma consistente, os dados aqui apresentados estão de acordo com o fato de que a atividade GalLDH por si só, não define a síntese de AA nem em tecidos fotossintéticos, nem em tecidos não fotossintéticos (Ioannidi et al., 2009;

Mazorra et al., 2014). Ainda, reforça cada vez mais a hipótese da participação da AOX, mesmo em baixas quantidades, na síntese e acumulação de AA (Silva, 2016).

Dado que a atividade da via AOX funciona para manter o *pool* de UQ em um estado mais oxidado (Vanlerberghe, 2013) e que a superexpressão de AOX em plantas transgênicas de *Arabidopsis* elevou a síntese de AA (Bartoli et al., 2006), examinou-se a hipótese de transferência de elétrons da GalLDH até a AOX via UQ na presença do precursor GalL. Primeiramente, verificou-se o efeito da disponibilidade de UQ na atividade da enzima GalLDH na presença do seu precursor GalL. O efeito também foi avaliado na presença do inibidor da via AOX (SHAM).

Os resultados deste trabalho mostram um aumento significativo na atividade da enzima GalLDH quando se forneceu UQ oxidada, em ambos os genótipos. A enzima GalLDH possui um grupo FAD não covalentemente ligado, que promove a conversão do FAD a FADH₂ no processo de síntese de AA (Leferink et al., 2008b). A transferência de elétrons durante síntese de AA por meio da GalLDH foi testada usando a enzima purificada, observando-se a conversão do FAD a FADH₂ antes de reduzir o citocromo c (Leferink et al., 2009). Considerando que esse trabalho foi realizado com a enzima em conjunto com outros componentes da cadeia transportadora de elétrons, levantou-se a hipótese de que os elétrons provenientes da síntese de AA que são direcionados para o grupo FAD, poderiam ser transportados de alguma maneira (o que precisa ser comprovado) para o *pool* de UQ e, finalmente, até a via AOX em caso de bloqueio da via COX.

Outro resultado interessante que reforça essa hipótese foi observado durante a quantificação da síntese e acúmulo de AA. Ao adicionar a UQ na ausência do GalL, que é o precursor da síntese desse antioxidante, a síntese de AA permaneceu similar quando se utilizou apenas o substrato GalL. Acredita-se que ao aumentar o *pool* de UQ oxidada, esta se torna mais disponível para receber os elétrons do grupo FADH₂, estimulando então a síntese de AA.

Além disso, essa hipótese apresentada de fluxo de elétrons da GalLDH via UQ se torna mais autêntica ao quantificar o estado redox da UQ por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, na presença de GalL, de forma a

estimular a atividade da GalLDH. Foi possível verificar um aumento na quantidade de UQH₂ na presença do precursor GalL apenas para o genótipo WT. Essa resposta já era esperada, uma vez que nas linhagens transgênicas onde houve o silenciamento da GalLDH não foi verificado estímulo à redução da UQ em resposta à adição do GalL, provavelmente devido à maior capacidade da AOX nas mitocôndrias das linhagens transgênicas, como observado na atividade respiratória das mitocôndrias isoladas dos frutos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que houve respostas positivas à adição da UQ, tanto para a atividade da GalLDH, como para a taxa respiratória iniciada com GalL, reforçando a hipótese de transferência de elétrons da GalLDH via UQ até a AOX. Mesmo tendo sido considerado que durante o processo de síntese de AA observa-se a conversão do FAD a FADH₂ antes de reduzir o citocromo c (Leferink et al., 2009), algumas desidrogenases transferem seus elétrons diretamente para a UQ, como o diidroorotato desidrogenase (DHODH), o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (G3-PDH) e possivelmente a prolina desidrogenase (ProDH) (Schertl et al., 2014). Além disso, pelo menos duas desidrogenases: isovaleril-coenzima- A desidrogenase (IVDH) e D-2-hidroxi-glutarato desidrogenase (D-2HGDH) transferem elétrons para a UQ através de uma "flavoproteína de transferência de elétrons" (Ishizaki et al., 2006; Araújo et al., 2010).

Os dados deste trabalho, juntamente com os resultados obtidos por Welchen et al. (2012), onde plantas de *Arabidopsis* deficientes em citocromo c mantêm sua capacidade de sintetizar AA mesmo apresentando reduzida atividade da enzima GalLDH, reforçam a hipótese de haver uma outra rota de fluxo de elétrons da GalLDH até a AOX dependente do *pool* de UQ, e independente do citocromo c.

Ao avaliar a atividade respiratória iniciada pelo substrato NADH, verificou-se maior atividade de consumo de O₂ no genótipo WT, quando comparada às linhagens transgênicas, evidenciando que essa mutação causa, de alguma forma, queda na taxa respiratória (Figura 8B). Atualmente, a GalLDH é considerada uma enzima com papel essencial durante a montagem do complexo I (Schertl et al., 2012). Millar et al. (2003) ao inibirem o complexo I com seu respectivo inibidor, a rotenona, verificaram também a inibição da GalLDH. Portanto, é visível que a GalLDH, além de seu papel na formação do

AA, apresenta influência na atividade do complexo I da CTE_m e, por consequência, no processo de respiração das plantas.

Assim, os resultados obtidos aqui podem estar relacionados ao fato de que uma vez que a enzima GalLDH atue como fator de montagem do complexo I, naqueles genótipos onde essa enzima foi silenciada, a atividade deste complexo pode ter sido influenciada negativamente, o que foi verificado pela menor taxa respiratória nessas linhagens. Esse resultado está de acordo com os trabalhos realizados em plantas de *Arabidopsis* com o gene da GalLDH silenciados, onde foram encontradas quantidades significativamente menores do complexo I, não afetando as quantidades dos outros complexos proteicos da CTE_m (Pineau et al., 2008).

Avaliou-se também a respiração sendo influenciada pela síntese de AA, utilizando então o GalL como substrato. Nessas condições, observa-se taxas aproximadamente 3 vezes menores de consumo de O₂ em comparação à respiração com o NADH, provavelmente, devido à menor disponibilidade dos elétrons provenientes apenas da oxidação do GalL a AA. Contrariamente à respiração com NADH, onde a respiração do genótipo WT foi superior, ao utilizar o GalL como substrato, prevalece a tendência de maior consumo de O₂ nas linhagens transgênicas.

Diante da adição de UQ, notou-se um aumento significativo no consumo de oxigênio nos três genótipos, quando foi utilizado o GalL como substrato respiratório. Acredita-se que a adição de UQ na presença do substrato GalL resultou em um aumento do *pool* de UQ, capaz de receber elétrons do grupo FADH₂ e estimulando assim a atividade da GalLDH responsável pela síntese de AA. Já quando foi utilizado o NADH como substrato respiratório observou-se discreto aumento da atividade respiratória, porém não significativo.

Com relação a todos os resultados aqui apresentados, talvez o resultado mais marcante seja a insensibilidade das vias AOX e COX aos seus respectivos inibidores para os três genótipos, quando as mitocôndrias foram tratadas com GalL. Silva (2016) avaliando a taxa respiratória em mitocôndrias pré-tratadas com AA, mostrou que tal insensibilidade aos inibidores se deve não à presença do produto da atividade GalLDH. Esse autor relata que mesmo na presença do AA foi verificado a inibição da respiração após a adição da

azida e do n-PG, respectivamente inibidores da COX e AOX, o que significa que a insensibilidade aos inibidores verificada esteja mesmo relacionada à atividade da GalLDH. De certa forma, a insensibilidade das vias AOX e COX pelos seus inibidores não seria esperada nas linhagens onde a enzima GalLDH encontra-se silenciada como foi verificado, no entanto tal insensibilidade pode ter ocorrido pelo fato da atividade da enzima GalLDH ter sido apenas ligeiramente menor que aquela observada no genótipo WT como mostra a Figura 6.

Duas hipóteses surgem para explicar esses dados. Primeira hipótese: a ativação da GalLDH poderia estar impedindo o bloqueio de ambas as oxidases terminais; segunda hipótese: admitindo-se que os bloqueadores da COX e da AOX estão inibindo estas vias, deve haver outro processo (até aqui desconhecido) responsável pelo consumo de O₂ quando a GalLDH está ativa após a adição de GalL às mitocôndrias. Em ambas as hipóteses está implícito a influência da GalLDH no transporte de elétrons das mitocôndrias isoladas de frutos, o que se revela um papel funcional além da sua função até então conhecida, isto é, sintetizar AA a partir do GalL usando os elétrons doados pelo citocromo c (Millar et al., 2003; Bartoli et al., 2005).

Em estudos preliminares realizados em nosso laboratório foi demonstrado uma possível relação entre o aumento da atividade GalLDH, bem como a formação de AA, com a crescente geração de H₂O₂. Isto foi verificado mesmo quando as oxidases terminais, AOX e COX, encontravam-se completamente inibidas, o que fortalece a segunda hipótese anteriormente apresentada. Para testar esta hipótese de que a GalLDH pudesse estar consumindo O₂ foi quantificada a taxa de produção de H₂O₂ em extrato suplementado com GalL e UQ oxidada para verificar o estímulo da via GalLDH. Ainda, foram utilizados os inibidores das vias oxidases terminais AOX e COX para detecção da influência destes na formação de H₂O₂ em conjunto com a GalLDH.

Os resultados obtidos nesse trabalho se mostraram de acordo com os estudos preliminares realizados pelo nosso grupo. Os resultados mostram que em mitocôndrias tratadas com GalL houve um aumento na produção de H₂O₂, para os três genótipos. Além disso, foi notável a menor produção de H₂O₂ nas linhagens transgênicas com a GalLDH silenciada, o que reforça ainda mais a

hipótese de que a atividade da enzima GalLDH está intimamente relacionada à produção de H_2O_2 .

A localização subcelular da GalLDH poderia fornecer uma justificativa pela qual esta enzima é considerada uma desidrogenase e não uma enzima oxidase (Leferink et al., 2008a). Além disso, foi demonstrado que esta enzima possui baixa afinidade pelo oxigênio, entretanto esse trabalho foi realizado com a enzima purificada (Leferink et al., 2008b). Sabendo que aqui nesse trabalho a enzima GalLDH se encontra na mitocôndria junto aos outros componentes da CTE_m e não isolada, é pertinente supor que a GalLDH poderia apresentar atividade oxidase nesse caso. Além disso, de acordo com o modelo proposto por Rodríguez-Ruiz et al. (2017), a GalLDH se encontra ancorada à membrana por um domínio curto, o que se supõe que a GalLDH poderia ter um papel fundamental que permitiria a interação dela com várias outras oxidases respiratórias próximas. Esses resultados são bastante consistentes no sentido de que há o envolvimento da GalLDH no consumo de O_2 no interior da mitocôndria.

Um dos principais mecanismos envolvidos no controle da polarização da membrana interna mitocondrial é a via AOX (Calegario et al., 2003). A AOX ao participar da oxidação do *pool* de UQH₂ impede que alguns elétrons sejam transportados via complexo III e IV. Este desvio no transporte de elétrons contribui para um menor gradiente eletroquímico, mas também evita que elétrons sejam afastados da via oxidativa preferencial e sejam usados na formação de H_2O_2 (Vanlerberghe, 2013). Esta rota alternativa converte parte da energia que seria acumulada na forma de gradiente de prótons dissipando-a na forma de calor, com conseqüente redução na produção de ATP. Tal efeito mantém o fluxo de elétrons na CTE_m e diminui a formação de H_2O_2 .

Porém, foi verificado aqui nesse e em outros trabalhos que a AOX é necessária para manter a atividade da GalLDH e a acumulação do AA. Sendo assim, nesse contexto o bloqueio total ou parcial desta via estaria levando à inibição da atividade da enzima GalLDH, provocando uma redução significativa na formação de H_2O_2 , ou seja, estaria apresentando função contraditória à já estabelecida, como verificado neste trabalho (Figura 10). Os resultados mostram inibição da taxa de aumento da produção H_2O_2 quando se utilizou o

bloqueador da via AOX, o SHAM, na presença ou não de GalL, substrato da GalLDH, nos três genótipos.

Os dados apresentados aqui revelam outra descoberta interessante em relação à atividade GalLDH em mitocôndrias isoladas de polpa de frutos. Os resultados mostram uma produção de H_2O_2 considerável maior em função da maior disponibilidade de UQ diante da adição de UQ ao meio. Esse resultado reforça a hipótese de que ao aumentar o *pool* de UQ oxidada, aumenta-se a disponibilidade para o recebimento dos elétrons do grupo $FADH_2$, responsável por promover a síntese de AA, aumentando a atividade da GalLDH e consequentemente a produção de H_2O_2 . Por outro lado, inibindo a via AOX causaria também a inibição da GalLDH, uma vez que a via AOX estimula também, a oxidação da UQ.

Muitas são as questões envolvendo a biossíntese do AA e o processo respiratório nos frutos que ainda precisam ser explicadas. Está claro que há uma influência significativa da via AOX na atividade da enzima GalLDH e na síntese do AA, e que o *pool* de UQ faz parte desse processo de transferência de fluxo de elétrons. Porém, ainda não está totalmente esclarecido qual o nível de influência da UQ na formação de AA e quais os processos estariam diretamente envolvidos. Diante de novos dados acerca da síntese de AA em mitocôndrias de polpa de frutos, é razoável que novos questionamentos acabem surgindo, como, por exemplo, os elétrons provenientes da síntese de AA que são direcionados para o grupo FAD, são transportados de alguma maneira para o *pool* de UQ e, finalmente, até a via AOX? Ainda, existe alguma outra enzima responsável por esse processo? Outra questão que também precisará ser melhor esclarecida é como que a GalLDH, responsável pela síntese de AA, pode ser capaz de produzir H_2O_2 , uma vez que o AA é um dos principais antioxidantes no processo de controle dessa ERO?

Assim sendo, trabalhos futuros serão necessários para responder as questões ainda em aberto, as quais permitirão esclarecer o processo de regulação da GalLDH pela AOX em frutos, assim como a síntese de AA e sua correlação com o controle na produção de ERO e os vários processos metabólicos que ocorrem durante o amadurecimento dos frutos. Tais estudos podem ajudar no descobrimento de uma nova rota de fluxo de elétrons ainda desconhecida na CTE, o que poderia ser usado no desenvolvimento de

métodos e procedimentos para prolongar a vida de prateleira, além de ajudar no entendimento da formação do AA, componente este indispensável para a saúde de diversos organismos, inclusive seres humanos.

7. CONCLUSÕES

O estímulo da atividade da GalLDH com o substrato GalL promove o aumento na formação de UQH₂.

A adição de UQ elevou a atividade da GalLDH nos três genótipos estudados.

A síntese de AA pelas mitocôndrias pode ser independente da atividade da GalLDH.

A atividade AOX é necessária para manter a atividade da GalLDH e a acumulação do AA.

A atividade respiratória influenciada pela síntese de AA responde positivamente à adição de UQ.

O bloqueio da via COX com seu respectivo inibidor, azida, estimula a produção de H₂O₂ na presença do substrato GalL e do estímulo da atividade da enzima GalLDH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agius, F., González-Lamothe, R., Caballero, J. L., Muñoz-Blanco, J., Botella, M. A., Valpuesta, V. (2003). Engineering increased vitamin C levels in plants by over expression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology*, 21: 177-181.
- Alhag Dow, M., Mounet, F., Gilbert, L., Nunes-Nesi, A., Garcia, V., Just, D., Baldet, P. (2007). Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiology*, 145: 1408-1422.
- Araújo W. L., Ishizaki K., Nunes-Nesi A., Larson T. R., Tohge T., Krahnert I., Witt, S., Obata, T., Schauer, N., Graham, I.A., Leaver, C.J., Fernie, A. R. (2010). Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria. *Plant Cell*, 22: 1549–1563.
- Arrigoni, O., Calabrese, G., De Gara, L., Bitonti, M. B., Liso, R. (1997). Correlation between changes in cell ascorbate and growth of *Lupinus albus* seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 150: 302-308.
- Baig, M. M., Kelly, S., Loewus, F. (1970). L-ascorbic acid biosynthesis in higher plants from L-gulono-1, 4-lactone and L-galactono-1, 4-lactone. *Plant Physiology*, 46: 277-280.
- Barata-Soares, A. D. Gomez, M. L., Mesquita, C. H. D., Lajolo, F. M. (2004). Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 16: 147-154.

- Barreiros, André L. B. S., David, Jorge M., David, Juceni P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova* [online], 29: 113-123.
- Barth, C., De Tullio, M., Conklin, P. L. (2006). The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1657-1665.
- Barth, C., Moeder, W., Klessig, D. F., Conklin, P. L. (2004). The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vitamin vtc1. *Plant Physiology*, 134: 1784–1792.
- Bartoli, C. G., Guamet, J. J., Kiddle, G. U. Y., Pastori, G. M., Di Cagno, R., Theodoulou, F. L., Foyer, C. H. (2005). Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal l-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant, Cell & Environment*, 28: 1073-1081.
- Bartoli, C. G., Pastori, G. M., Foyer, C. H. (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiology*, 123: 335–344.
- Bartoli, C. G., Senn, M. E., Grozeff, G. G. (2016). Physiological processes contributing to the synthesis of ascorbic acid in plants. In *Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses*. Springer International Publishing, pp. 71-92.
- Bartoli, C. G., Yu, J., Gómez, F., Fernández, L., McIntosh, L., Foyer, C. H. (2006). Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1621-1631.
- Beavis, A. D., Vercesi, A. E. (1992). Anion uniport in plant-mitochondria is mediated by an Mg²⁺-insensitive inner membrane anion channel. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 3079-3087.
- Becker, L. (2007). Final report on the amended safety assessment of propyl gallate. *International Journal of Toxicology*, 26: 89-118.
- Bentinger, M., Brismar, K., Dallner, G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7: S41-S50.
- Bentinger, M., Tekle, M., Dallner, G. (2010). Coenzyme Q–biosynthesis and functions. *Biochemical and biophysical research communications*, 396: 74-79.
- Blokhina, O., Fagerstedt, K. V. (2010). Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum*, 138: 447-462.
- Borecký, J., Nogueira, F.T.S., de Oliveira, K.A.P., Maia, I.G., Vercesi, A.E., Arruda, P. (2006). The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the

genomic structure and expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. *Journal of Experimental Botany*, 57: 849-864.

Bouzayen, M., Latché, A., Nath, P., Pech, J. C. (2010). Mechanism of fruit ripening. *In Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives*, 1: 319-339.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Brandt, U. (2006). Energy converting NADH: quinone oxidoreductase (complex I). *Annual Review of Biochemistry*, 75: 69-92.

Bron, I. U. (2006). Amadurecimento do mamão Golden: ponto de colheita, bloqueio da ação do etileno e armazenamento refrigerado. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo- USP, 66p.

Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A. (1993). Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radical Biology and Medicine*, 14: 49-55.

Calegario, F. F., Cosso, R. G., Fagian, M. M., Almeida, F. V., Jardim, W. F., Ježek, P., Arruda, P., Eugênio Vercesi, A. (2003). Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 35: 211-220.

Chen, Z., Gallie, D. R. (2005). Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance. *Plant Physiology*, 138: 1673-1689.

Chen, Z., Gallie, D. R. (2004). The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell*, 16: 1143-1162.

Chen, Z., Young, T. E., Ling, J., Chang, S. C., Gallie, D. R. (2003). Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 3525-3530.

Chitarra, M. I. F.; Chitarra, A. C. (2005). Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA/FAEPE, 785 p.

Clifton, R., Millar, A.H.; Whelan, J. (2006). Alternative oxidases in Arabidopsis: A comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics*, 1757: 730-741.

Conklin, P. L., Barth, C. (2004). Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell & Environment*, 27: 959-970.

- Conklin, P. L., Gatzek, S., Wheeler, G. L., Dowdle, J., Raymond, M. J., Rolinski, S., Smirnoff, N. (2006). Arabidopsis thaliana VTC4 encodes L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 15662-15670.
- Conklin, P. L., Norris, S. R., Wheeler, G. L., Williams, E. H., Smirnoff, N., Last, R. L. (1999). Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 4198-4203.
- Conklin, P. L., Williams, E. H., Last, R. L. (1996). Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 9970-9974.
- Considini, M. J., Daley, D. O., Whelan, J. (2001). The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant Physiology*, 126: 1619-1629.
- Cordenunsi, B. R., Nascimento, J. R. O., Genovese, M. I., Lajolo, F. M. (2002). Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2581-2586.
- Cordenunsi, B. R., Genovese, M. I., Nascimento, J. R. O., Hassimotto, N. M. A., Santos, R. J., Lajolo, F. M. (2005). Effect of temperature on the chemical composition and antioxidant activity on three strawberry cultivars. *Food Chemistry*, 91: 113-121.
- Cui, Y., Yue, Y., Qian, G., Chen, B. (2011). Luminescent functional metal organic frameworks. *Chemical Reviews*, 112: 1126-1162.
- Cvetkovska, M., Vanlerberghe, G. C. (2012). Alternative oxidase modulates leaf mitochondrial concentrations of superoxide and nitric oxide. *New Phytologist*, 195: 32-39.
- Dallner, G., Sindelar, P. J. (2000). Regulation of ubiquinone metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 29: 285-294.
- Davey, M. W., Gilot, C., Persiau, G., Østergaard, J., Han, Y., Bauw, G. C., Van Montagu, M. C. (1999). Ascorbate biosynthesis in Arabidopsis cell suspension culture. *Plant Physiology*, 121: 535-544.
- Davey, M. W., Montagu, M. V., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 825-860.
- De Assis, S. A., Lima, D. C., de Faria Oliveira, O. M. (2001). Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. *Food Chemistry*, 74: 133-137.

- De Gara, L., Paciolla, C., Tommasi, F., Liso, R., Arrigoni, O. (1994). In vivo inhibition of galactono-g-lactone conversion to ascorbate by lycorine. *Journal of Plant Physiology*, 144: 649–653.
- Diplock, A. T., Charuleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Vina-Ribes, J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80: 77-112.
- Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S., Smirnoff, N. (2007). Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-I-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *The Plant Journal*, 52: 673-689.
- Dumville, J. C., Fry, S. C. (2003). Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymic mechanism of fruit softening. *Planta*, 217: 951-961.
- Duque, P., Arrabaça, J. D. (1999). Respiratory metabolism during cold storage of apple fruit. II. Alternative oxidase is induced at the climacteric. *Physiology Plantarum, Malden*, 107: 24- 31.
- Dutta, A., Chan, S. H., Pauli, N. T., Raina, R. (2015). HYPERSENSITIVE RESPONSE-LIKE LESIONS 1 codes for AtPPT1 and regulates accumulation of ROS and defense against bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Antioxid. Redox Signal*, 22: 785–796.
- Eubel, H., Heinemeyer, J., Braun, H.P. (2004). Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiology*, 134: 1450–9.
- Elthon, T. E., McIntosh, L. (1986). Characterization and solubilization of the alternative oxidase of *Sauromatum guttatum* mitochondria. *Plant Physiology*, 82: 1-6.
- Fiorani, F., Umbach, A. L., Siedow, J. N. (2005). The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of *Arabidopsis AOX1a* transgenic plants. *Plant Physiology*, 139: 1795-1805.
- Fonseca, M. J. O., Leal, N. R., Ceni, S. A., Cecon, P. R., Bressan-Smith, R. E., Balbino, J. M. S. (2007). Evolução dos pigmentos durante o amadurecimento de mamão 'Sunrise Solo' e 'Golden'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29: 451-455.
- Fontes, C. M., Gilbert, H. J. (2010). Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annual review of biochemistry*, 79: 655-681.
- Fraaije, M. W., Sjollema, K. A., Veenhuis, M., Van Berkel, W. J. (1998). Subcellular localization of vanillyl-alcohol oxidase in *Penicillium simplicissimum*. *FEBS letters*, 422: 65-68.

- Gandin, A., Koteyeva, N. K., Voznesenskaya, E. V., Edwards, G. E., Cousins, A. B. (2014). The acclimation of photosynthesis and respiration to temperature in the C3–C4 intermediate *Salsola divaricata*: induction of high respiratory CO₂ release under low temperature. *Plant, cell & environment*, 37: 2601-2612.
- Gatzek, S., Wheeler, G.L., Smirnoff, N. (2002). Antisense suppression of l-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated l-galactose synthesis. *Plant Journal*, 30: 541–553.
- Gayosso-García Sancho, L. E., Yahia, E. M., Martínez-Téllez, M. A., González-Aguilar, G. A. (2010). Effect of maturity stage of papaya maradol on physiological and biochemical parameters. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5: 194-203.
- Genevois M. L. (1929). Sur la fermentation et sur la respiration chez les végétaux chlorophylliens. *Revue Génétique Botanique*, 41: 252–271.
- Giraud, E., Ho, L. H., Clifton, R., Carroll, A., Estavillo, G., Tan, Y. F., Whelan, J. (2008). The absence of alternative oxidase1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiology*, 147: 595-610.
- Gomez, M.L.P., Lajolo, F.M. (2008). Ascorbic acid metabolism in fruits: activity of enzymes involved in synthesis and degradation during ripening in mango and guava. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 756–762.
- Gonçalves, A. A. S. S. (2008). Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos). São Paulo – SP – Universidade de São Paulo, 88p.
- Grant, N., Onda, Y., Kakizaki, Y., Ito, K., Watling, J., Robinson, S. (2009). Two cys or not two cys? That is the question alternative oxidase in the thermogenic plant sacred lotus. *Plant physiology*, 150: 987-995.
- Hancock, R. D., Viola, R. (2002). Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. *TRENDS in Biotechnology*, 20: 299-305.
- Harris, R. S. (1975). Effects of agricultural practices on the composition of foods. *Nutritional evaluation of Food Processing*, 2: 33-57.
- Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual review of biochemistry*, 54: 1015-1069.
- Hausladen, A., Kunert, K. J. (1990). Effects of artificially enhanced levels of ascorbate and glutathione on the enzymes monodehydroascorbate reductase, dehydroascorbate reductase, and glutathione reductase in spinach (*Spinacia oleracea*). *Physiologia Plantarum*, 79: 384–388.

- Heazlewood, J. L., Howell, K. A., Millar, A. H. (2003). Mitochondrial complex I from Arabidopsis and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1604: 159-169.
- Helmerhorst, E. J., Murphy, M. P., Troxler, R. F., Oppenheim, F. G. (2002). Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in (*Candida albicans*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1556: 73-80.
- Hervas, M., Bashir, Q., Leferink, N., Ferreira, P., Moreno-Beltran, B., Westphal, A. H., Díaz-Moreno, I., Medina, M., De La Rosa, M. A., Ubbink, M., Navarro, J. (2013). Communication between (L)-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase and cytochrome c. *FEBS Journal*, 280: 1830-1840.
- Hirst, J. (2013). Mitochondrial complex I. *Annual review of biochemistry*, 82: 551-575.
- Huang, C., He, W., Guo, J., Chang, X., Su, P., Zhang, L. (2005). Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient Arabidopsis mutant. *Journal of Experimental Botany*, 56: 3041-3049.
- Ioannidi, E., Kalamaki, M.S., Engineer, C., Pateraki, I., Alexandrou, D., Mellidou, I., Giovannonni, J., Kanellis, A.K. (2009). Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 60: 663-678.
- Imai, T., Karita, S., Shiratori, G. I., Hattori, M., Nunome, T., Ôba, K., Hirai, M. (1998). L-galactono- γ -lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. *Plant and Cell Physiology*, 39: 1350-1358.
- Isherwood, F. A., Chen, Y. T., Mapson, L. W. (1954). Synthesis of L-ascorbic acid in plants and animals. *Biochemical Journal*, 56: 1.
- Ishikawa, T., Dowdle, J., Smirnoff, N. (2006). Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiologia Plantarum*, 126: 343-355.
- Ishizaki, K., Schauer, N., Larson, T. R., Graham, I. A., Fernie, A. R., Leaver, C. J. (2006). The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of Arabidopsis in extended darkness. *Plant Journal*, 47: 751-760.
- Jain, N., Dhawan, K., Malhotra, S., Singh, R. (2003). Biochemistry of fruit ripening of guava (*Psidium guajava* L.): Compositional and enzymatic changes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58: 309-315.
- Juszczuk, I. M., SZAL, B., Rychter, A. M. (2012). Oxidation-reduction and reactive oxygen species homeostasis in mutant plants with respiratory chain complex I dysfunction. *Plant, cell & environment*, 35: 296-307.
- Kawamukai, M. (2009). Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms. *Biotechnology and applied biochemistry*, 53: 217-226.

- Kerchev, P. I., Pellny, T. K., Vivancos, P. D., Kiddle, G., Hedden, P., Driscoll, S., Vanacker, H., Verrier, P., Hancock, R.D., Foyer, C.H. (2011). The Transcription Factor ABI4 Is Required for the Ascorbic Acid-Dependent Regulation of Growth and Regulation of Jasmonate-Dependent Defense Signaling Pathways in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23: 3319-3334.
- Kuźniak, E., Skłodowska, M. (2004). The effect of Botrytis cinerea infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. *Journal of Experimental Botany*, 55: 605-612.
- Larsson, C., Pålman, I. L., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L., Gustafsson, L. (1998). The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, 14: 347-357.
- Lee, S. K., Kader, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20: 207-220.
- Leferink, N. G., Heuts, D. P., Fraaije, M. W., Van Berkel, W. J. (2008a). The growing VAO flavoprotein family. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 474: 292-301
- Leferink, N. G., van den Berg, W. A., van Berkel, W. J. (2008b). L-Galactono- γ -lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *FEBS Journal*, 275: 713-726.
- Leferink, N. G., van Duijn, E., Barendregt, A., Heck, A. J., van Berkel, W. J. (2009). Galactono lactone dehydrogenase requires a redox-sensitive thiol for optimal production of vitamin C. *Plant physiology*, 150: 596-605.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. C., Cox, M. M. (1995). *Princípios de Bioquímica*, 2. ed.; Sarvier Ed. Ltda.: São Paulo, 264p.
- Lenaz, G., Fato, R., Formiggini, G., Genova, M. L. (2007). The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion*, 7: S8-S33.
- Lenaz, G., Genova, M. L. (2009). Mobility and function of coenzyme Q (ubiquinone) in the mitochondrial respiratory chain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787: 563-573.
- Li, Y., Schellhorn, H. E. (2007). New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *The Journal of Nutrition*, 137: 2171-2184.
- Linster, C. L., Adler, L. N., Webb, K., Christensen, K. C., Brenner, C., Clarke, S. G. (2008). A second GDP-L-galactose phosphorylase in Arabidopsis en route to vitamin C covalent intermediate and substrate requirements for the conserved reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 18483-18492.
- Linster, C. L., Clarke, S. G. (2008). L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. *Trends in Plant Science*, 13: 567-573.

- Loewus, F. A. (1999). Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry*, 52: 193-210.
- Logan, F.J., Taylor, M.C., Wilkinson, S.R., Kaur, H., Kelly, J. M. (2007). The terminal step in vitamin C biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* is mediated by a FMN-dependent galactonolactone oxidase. *Biochemical Journal*, 407: 419-426.
- Lorence, A., Chevone, B. I., Mendes, P., Nessler, C. L. (2004). Myo-Inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology*, 134: 1200-1205.
- Malegori, C., Grassi, S., Marques, E. J. N., de Freitas, S. T., Casiraghi, E. (2016). Vitamin C distribution in acerola fruit by near infrared hyperspectral imaging. *Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Mapson, L. W., Isherwood, F. A., Chen, Y. T. (1954). Biological synthesis of L-ascorbic acid: the conversion of L-galactono- γ -lactone into L-ascorbic acid by plant mitochondria. *Biochemical Journal*, 56: 21.
- Marbois, B., Gin, P., Faull, K. F., Poon, W. W., Lee, P. T., Strahan, J., Shepherd, J. N., Clarke, C. F. (2005). Coq3 and Coq4 define a polypeptide complex in yeast mitochondria for the biosynthesis of coenzyme Q. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 20231-20238.
- Martin, J.H., Benzer, S., Rudnicka, M., Miller, C.A. (1993). Calphotin: a *Drosophila* photoreceptor cell calcium-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 1531-1535.
- Mattevi, A., Fraaije, M. W., Mozzarelli, A., Olivi, L., Coda, A., van Berkel, W. J. (1997). Crystal structures and inhibitor binding in the octameric flavoenzyme vanillyl-alcohol oxidase: the shape of the active-site cavity controls substrate specificity. *Structure*, 5: 907-920.
- Maxwell, D. P., Wang, Y., McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 8271-8276.
- Mazorra, L.M., Senn, M.E., Grozeff, G.E.G., Fanello, D.D., Carrión, C.A., Núñez, M., Bishop, G.J., Bartoli, C.G. (2014). Impact of brassinosteroids and ethylene on ascorbic acid accumulation in tomato leaves. *Plant Physiology. Biochemistry*, 74: 315–322.
- McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27: 1254-1255.
- Meyer, E. H. (2012). Proteomic investigations of complex I composition: how to define a subunit ?. *Frontiers in plant science*, 3.

- Millar, A. H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J. L., Bartoli, C. G., Theodoulou, F. L., Foyer, C. H. (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology*, 133: 443-447.
- Millar, A. H., Whelan, J., Soole, K. L., Day, D. A. (2011). Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annual review of plant biology*, 62: 79-104.
- Moller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual review of plant biology*, 52: 561-591.
- Moore, A. L., Siedow, J. N. (1991). The regulation and nature of the cyanideresistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1059: 121-140.
- Morán, G.A.G., Cardona, A.G., Mejía, O.R., Grimald, D.C., Vela, H.S., Biol, S.A.B., Cobos, C. (2006). Aspectos bioclínicos y patobiológicos de la vitamina C en la especie humana. *Revista CES Medicina*, 20: 53-72.
- Motta, J. D., de Melo Queiroz, A. J., de Figueirêdo, R. M. F., de Sousa, K. D. S. M. (2015). Índice de cor e sua correlação com parâmetros físicos e físico-químicos de goiaba, manga e mamão. *Comunicata Scientiae*, 6: 74.
- Müller-Moulé, P., Conklin, P. L., Niyogi, K. K. (2002). Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiology*, 128: 970-977.
- Müller-Moulé, P., Golan, T., Niyogi, K. K. (2004). Ascorbate-deficient mutants of *Arabidopsis* grow in high light despite chronic photooxidative stress. *Plant Physiology*, 134: 1163–1172.
- Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., Yagi, K. (1994). Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 13685-13688.
- Noctor, G., Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 49: 249-279.
- Nohl, H., Kozlov, A. V., Staniek, K., Gille, L. (2001). The multiple functions of coenzyme Q. *Bioorganic chemistry*, 29: 1-13.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A. M., Loureiro, M. E., Ratcliffe, R. G., Fernie, A. R. (2005). Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiology*, 137: 611-622.
- Ôba, K., Fukui, M., Imai, Y., Iriyama, S., Nogami, K. (1994). L-Galactono- γ -lactone dehydrogenase: partial characterization, induction of activity and role in the

synthesis of ascorbic acid in wounded white potato tuber tissue. *Plant and Cell Physiology*, 35: 473-478.

- Ôba, K., Ishikawa, S., Nishikawa, M., Mizuno, H., Yamamoto, T. (1995). Purification and properties of l-galactono-g-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *Journal of Biochemistry*, 117: 120-124.
- Oliveira, M. G., Mazorra, L. M., Souza, A. F., Silva, G. M. C., Correa, S. F., Santos, W. C., Oliveira, J. G. (2015). Involvement of AOX and UCP pathways in the post-harvest ripening of papaya fruits. *Journal of Plant Physiology*, 189: 42-50.
- De Oliveira, J. G., Morales, L. M. M., Silva, G. M. C., da Cruz Saraiva, K. D., Santana, D. B., dos Santos, C. P., Oliveira, M. G., Costa, J. H. (2017). Procedures of Mitochondria Purification and Gene Expression to Study Alternative Respiratory and Uncoupling Pathways in Fruits. *In Plant Respiration and Internal Oxygen* Humana Press, New York, NY, 143-165.
- Ostergaard, J., Persiau, G., Davey, M. W., Bauw, G., Van Montagu, M. (1997). Isolation of a cDNA coding for l-galactono-g-lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 30009–30016.
- Padh, H. (1990). Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and Cell Biology*, 68: 1166-1173.
- Pastori, G.M., Kiddle, G., Antoniw, J., Bernard, S., Veljovic- Jovanovic, S., Verrier, P.J., Noctor, G., Foyer, C.H. (2003). Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell*, 15: 939–951.
- Peiffer, W. E., Ingle, R. T., Ferguson-Miller, S. (1990). Structurally unique plant cytochrome c oxidase isolated from wheat germ, a rich source of plant mitochondrial enzymes. *Biochemistry*, 29: 8696-8701.
- Peters, K., Belt, K., Braun, H. P. (2013). 3D gel map of Arabidopsis complex I. *Frontiers in plant science*, 4.
- Pierrel, F., Hamelin, O., Douki, T., Kieffer-Jaquinod, S., Mühlenhoff, U., Ozeir, M., Fontecave, M. (2010). Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis. *Chemistry & biology*, 17: 449-459.
- Pignocchi, C., Fletcher, J.M., Wilkinson, J.E., Barnes, J.D., Foyer, C.H. (2003). The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology* 132: 1631–1641.
- Pignocchi, C., Foyer, C. H. (2003). Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 379-389.

- Pineau, B., Layoune, O., Danon, A., De Paepe, R. (2008). L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase is required for the accumulation of plant respiratory complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 32500-32505.
- Pinto, L. K. A., Martins, M. L. L., Resende, E. D., Thiébaud, J. T. L., Martins, M. A. (2013). Avaliação da atividade das enzimas pectinametilesterase e β -galactosidase em mamões cv. Golden armazenados sob diferentes concentrações de oxigênio. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35: 15- 22.
- Reuhs, B. L., Glenn, J., Stephens, S. B., Kim, J. S., Christie, D. B., Glushka, J. G., O'Neill, M. A. (2004). L-Galactose replaces L-fucose in the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II synthesized by the L-fucose-deficient mur1 Arabidopsis mutant. *Planta*, 219: 147-157.
- Ribas-Carbo, M., Berry, J. A., Yakir, D., Giles, L., Robinson, S. A., Lennon, A. M., Siedow, J. N. (1995). Electron partitioning between the cytochrome and alternative pathways in plant mitochondria. *Plant Physiology*, 109: 829-837.
- Rodríguez-Roldán, V., García-Heredia, J. M., Navarro, J. A., Hervás, M., De La Cerda, B., Molina-Heredia, F. P., Miguel, A. (2006). A comparative kinetic analysis of the reactivity of plant, horse, and human respiratory cytochrome c towards cytochrome c oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346: 1108-1113.
- Rodríguez-Ruiz, M., Mateos, R. M., Codesido, V., Corpas, F. J., Palma, J. M. (2017). Characterization of the galactono-1, 4-lactone dehydrogenase from pepper fruits and its modulation in the ascorbate biosynthesis. Role of nitric oxide. *Redox Biology*, 12: 171.
- Running, J. A., Peng, S., Rosson, R. A. (2003). The biotechnology of ascorbic acid manufacture. *Vitamin C: Its Functions and Biochemistry in Animals and Plants*, 49.
- Schertl, P., Braun, H. P. (2014). Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria. *Frontiers in plant science*, 5: 163.
- Schertl, P., Sunderhaus, S., Klodmann, J., Grozeff, G. E. G., Bartoli, C. G., Braun, H. P. (2012). L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase (GLDH) forms part of three subcomplexes of mitochondrial complex I in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, 287: 14412-14419.
- Schimmeyer, J., Bock, R., Meyer, E. H. (2016). L-Galactono-1, 4-lactone dehydrogenase is an assembly factor of the membrane arm of mitochondrial complex I in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, 90: 117-126.
- Sentanin, M. A., Rodriguez-Amaya, D. B. (2007). Teores de carotenóides em mamão e pêssego determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27: 787-92.

- Siedow, J. N., Umbach, A. L. (2000). The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics*, 1459: 432-439.
- Siendones, E., González-Reyes, J. A., Santos-Ocaña, C., Navas, P., Córdoba, F. (1999). Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean. L-galactono- γ -lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. *Plant Physiology*, 120: 907-912.
- Silva, G. M. C. (2016). O papel dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons na síntese e acúmulo do ácido ascórbico em mitocôndrias de frutos. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 184p.
- Smirnoff, N. (2000). Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355: 1455-1464.
- Sweetlove, L. J., Taylor, N. L., Leaver, C. J. (2007). Isolation of intact, functional mitochondria from the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Mitochondria*, 125: 136.
- Szarka, A., Bánhegyi, G., Asard, H. (2013). The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19: 1036-1044.
- Szarka, A., Tomasskovics, B., Bánhegyi, G. (2012). The ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response. *International journal of molecular Sciences*, 13: 4458-4483.
- Tabata, K., Ôba, K., Suzuki, K., Esaka, M. (2001). Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase. *The Plant Journal*, 27: 139-148.
- Umbach, A. L., Fiorani, F., Siedow, J. N. (2005). Characterization of transformed *Arabidopsis* with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiology*, 139: 1806-1820.
- Umbach, A. L., Wiskich, J. T., Siedow, J. N. (1994). Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. *FEBS letters*, 348: 181-184.
- Upadhyaya, C. P., Akula, N., Young, K. E., Chun, S. C., Kim, D. H., Park, S. W. (2010). Enhanced ascorbic acid accumulation in transgenic potato confers tolerance to various abiotic stresses. *Biotechnology letters*, 32: 321-330.
- Vanlerberghe, G. C. (2013). Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 6805-6847.

- Van Aken, O., Giraud, E., Clifton, R., Whelan, J. (2009). Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. *Plant Physiology*, 137: 354–361.
- Vanlerberghe, G. C., Cvetkovska, M., Wang, J. (2009). Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? *Plant Physiology*, 137: 392–406.
- Vanlerberghe, G. C., Day, D. A., Wiskich, J. T., Vanlerberghe, A. E., McIntosh, L. (1995). Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria (dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation). *Plant Physiology*, 109: 353-361.
- Vanlerberghe, G. C., Vanlerberghe, A. E., McIntosh, L. (1997). Molecular genetic evidence of the ability of alternative oxidase to support respiratory carbon metabolism. *Plant physiology*, 113: 657-661.
- Welchen, E., Hildebrandt, T. M., Lewejohann, D., Gonzalez, D. H., Braun, H. P. (2012). Lack of cytochrome c in Arabidopsis decreases stability of Complex IV and modifies redox metabolism without affecting Complexes I and III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817: 990-1001.
- Wheeler, G. L., Jones, M. A., Smirnov, N. (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393: 365-369.
- Wolucka, B. A., Van Montagu, M. (2003). GDP-mannose 3', 5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 47483-47490.
- Wolucka, B. A., Goossens, A., e Inzé, D. (2005). Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, 56: 2527-2538.
- Xu Y, Zhu X, Chen Y, Gong Y, Liu L (2013) Expression profiling of genes involved in ascorbate biosynthesis recycling during fleshy root development in radish. *Plant Physiology Biochemistry*, 70: 269–277.
- Yabuta, Y., Yoshimura, K., Takeda, T., Shigeoka, S. (2000). Molecular characterization of tobacco mitochondrial L-galactono- γ -lactone dehydrogenase and its expression in Escherichia coli. *Plant and Cell Physiology*, 41: 666-675.
- Yoshida, K., Shibata, M., Terashima, I., Noguchi, K. (2010). Simultaneous determination of in vivo plastoquinone and ubiquinone redox states by HPLC-based analysis. *Plant and cell physiology*, 51: 836-841.
- Zhang, L., Wang, Z., Xia, Y., Kai, G., Chen, W., Tang, K. (2007). Metabolic engineering of plant L-ascorbic acid biosynthesis: Recent trends and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27: 173-182.

Zhang, Z., Wang, J., Zhang, R., Huang, R. (2012). The ethylene response factor AtERF98 enhances tolerance to salt through the transcriptional activation of ascorbic acid synthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 71: 273-287.