

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**Análise comparativa dos parâmetros redox em diferentes cultivares de
Phaseolus vulgaris L. que apresentam susceptibilidade diferenciada à
exposição ao ozônio**

FERNANDA FREITAS CAREGNATO

Orientador

DR. JOSÉ CLÁUDIO FONSECA MOREIRA

Porto Alegre

- 2013-

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**Análise comparativa dos parâmetros redox em diferentes cultivares de
Phaseolus vulgaris L. que apresentam susceptibilidade diferenciada à
exposição ao ozônio**

FERNANDA FREITAS CAREGNATO

Orientador

DR. JOSÉ CLÁUDIO FONSECA MOREIRA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

Porto Alegre

- 2013 -

raul seixas

“...prefiro ser essa metamorfose ambulante,
do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo.”

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, especialmente meus pais pelo constante incentivo e carinho, dedicados a mim ao longo de todos meus anos de estudo.

A todos os colegas do Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (Laboratório 32 – Departamento de Bioquímica) e aos colegas do Centro de Ecotoxicologia da UFRGS, em especial ao colega Armando M. Divan Jr., por ter cedido o espaço e a ajuda necessária para a elaboração desse trabalho, e ao Rafael Bortolin o ‘Uruguaiana’ pela amizade e pelo incansável auxílio prestado ao longo dos anos de trabalho.

Aos professores e funcionários do PPG da Bioquímica da UFRGS.

À CAPES, pela bolsa de Doutorado e ao apoio financeiro para a realização desse projeto.

Ao Professor José Cláudio, pela orientação privilegiada, pela confiança em mim depositada, mas mais ainda pela amizade cultivada durante toda minha vida acadêmica.

SUMÁRIO

SIGLAS E ABREVIACÕES.....	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O OZÔNIO COMO POLUENTE	3
1.1.1. Zonas de ocorrência e formação	3
1.1.2. Padrões, critérios e legislação	5
1.1.3. Impactos e perdas econômicas	8
1.2. OS MECANISMOS DA FITOXICIDADE DO OZÔNIO.....	11
1.2.1. O ozônio e a formação de espécies ativas de oxigênio	11
1.2.2. Defesas antioxidantes: enzimáticas e não-enzimáticas	12
1.2.3. Modificações na homeostase redox intracelular	17
1.3. ASPECTOS GERAIS DO FEIJOEIRO COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	19
1.3.1. Importância econômica para o Brasil.....	20
1.3.2. Cultivares do sul do Brasil	21
2. HIPÓTESE	23
3. OBJETIVOS.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Artigo I: Ozone exposure differentially affects oxidative stress parameters in distinct <i>Phaseolus vulgaris</i> L. varieties.	25
4.2. Artigo II: Exposure to elevated ozone levels differentially affects the antioxidant capacity and the redox homeostasis of two subtropical <i>Phaseolus vulgaris</i> L. varieties	32
5. DISCUSSÃO.....	78
6. CONCLUSÕES	88
7. PERSPECTIVAS	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

SIGLAS E ABREVIÇÕES

AOT₄₀ – concentração acumulada de ozônio acima de 40 ppb

AsA – ascorbato

APX – ascorbato peroxidase

CH₄ – metano

CAT – catalase

CO₂ – dióxido de carbono

COV – compostos orgânicos voláteis

DHAR – dehydroascorbato redutase

EAO – espécies ativas de oxigênio

Fepagro – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul

Fepam – Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler do Estado do Rio Grande do Sul

GR – glutathione redutase

GPX – glutathione peroxidase

GSH – glutathione reduzida

GSSG – glutathione oxidada

HNO₃ – ácido nítrico

HO[•] – radical hidroxil

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

MDHAR – monodehydroascorbate redutase

NO – monóxido de nitrogênio

NO₂ – dióxido de nitrogênio

NO_x – óxidos de nitrogênio

O₂ – oxigênio

O₂^{•-} – ânion superóxido

O₃ – ozônio

Rubisco – Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase

SOD – superóxido dismutase

SO_x – óxidos de enxofre

UV – radiação ultravioleta

Wm⁻² – Watts por metro quadrado

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diagrama de classificação da estrutura vertical das camadas atmosféricas segundo critérios de pressão e temperatura. _____ 3
- Figura 2. Distribuição global da concentração média máxima crescente de ozônio para o ano de 2030. _____ 8
- Figura 3. Principias vias de eliminação das espécies ativas de oxigênio (EAO) em plantas. _____ 14
- Figura 4. Mecanismo proposto para a regeneração do ascorbato (AsA) na membrana plasmática das plantas (MP). _____ 15
- Figura 5. Diagrama esquemático de um sistema para cultivo de plantas em atmosferas enriquecidas com O₃. _____ 78

RESUMO

O ozônio (O_3) troposférico pode ser considerado um dos poluentes atmosféricos mais tóxicos da atualidade. Nas espécies vegetais o O_3 penetra através dos estômatos, interferindo nos processos fisiológicos, metabólicos e celulares das plantas. Os efeitos negativos do O_3 são desencadeados devido ao fato deste ser um potente agente oxidante capaz de gerar espécies ativas de oxigênio (EAO) no meio intracelular. No entanto, as investigações sobre os impactos da exposição ao O_3 na fisiologia e produtividade das principais culturas agrícolas da América do Sul ainda são escassos. Para a maioria das espécies vegetais cultivadas no Brasil, uma análise integrada dos aspectos fisiológicos e bioquímicos relacionados à toxicidade deste ainda é limitada. O objetivo deste trabalho de doutorado foi avaliar as modificações nos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo e do balanço redox celular em resposta à exposição controlada a elevadas concentrações de O_3 no tecido foliar de diferentes cultivares subtropicais de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). As alterações desencadeadas pelo O_3 no sistema antioxidante enzimático e não-enzimático foram determinadas através de diferentes abordagens, como a avaliação da extensão do dano oxidativo a lipídios; a quantificação da atividade e dos níveis proteicos da enzima antioxidante catalase; a avaliação dos níveis teciduais dos antioxidantes ácido ascórbico e grupamentos tióis totais; e a produção de espécies ativas de oxigênio. Os resultados indicam que níveis constitutivos mais elevados de espécies ativas de oxigênio (EAO) e de antioxidantes não-enzimáticos (ascorbato), acompanhados da modulação do sistema antioxidante enzimático (aumento na quantidade e atividade da catalase), conferem proteção ao tecido foliar contra insultos oxidativos, como a oxidação de lipídios de membrana e a diminuição dos níveis de pigmentos fotossintetizantes, desencadeados pelo O_3 . Ao contrário, quando a exposição ao O_3 aumenta a geração de EAO, e este aumento está aliado à falta da modulação eficaz tanto do sistema antioxidante enzimático como do não enzimático, a indução de alterações oxidativas severas (aumento de lipoperoxidação e diminuição nos níveis de clorofila a e b) ocasiona perda no conteúdo proteico das folhas, o que compromete a estrutura celular e o processo fotossintético. Sendo assim, pode-se concluir que, nas cultivares estudadas, a capacidade de resistir aos efeitos negativos do O_3 está relacionada com as diferenças bioquímicas constitutivas capazes de manter homeostase do estado redox celular no tecido foliar.

ABSTRACT

Tropospheric ozone (O₃) can be considered one of the most toxic air pollutants today. In plant species O₃ penetrates through leaf stomata, interfering with physiological, metabolic and cellular processes in plants. The negative effects of O₃ are triggered due to the fact that this is a potent oxidizing agent capable of generating reactive oxygen species (ROS) in the intracellular environment. However, research on the impacts of exposure to O₃ in physiology and productivity of major crops in South America are still scarce. For most plant species grown in Brazil an integrated analysis of the physiological and biochemical aspects related to toxicity of this contaminant is still limited. The aim of this study was to evaluate the changes in oxidative stress parameters and cellular redox balance in response to controlled exposure to high O₃ concentrations in the leaf tissue of different subtropical cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Changes triggered by O₃ in enzymatic and non-enzymatic antioxidant system were determined by different approaches, such as the extent of oxidative damage to lipids, the quantification of protein levels and activity of the antioxidant enzyme catalase; evaluation of tissue levels of the antioxidants ascorbic acid and total thiol groups, and the production of reactive oxygen species. The results indicate that constitutive higher levels of ROS and non-enzymatic antioxidants (ascorbate) accompanied by modulation of enzymatic antioxidant system (enhanced catalase activity and content) confer protection against oxidative insults triggered by O₃ in leaf tissue, such as the oxidation of membrane lipids and decreased levels of photosynthetic pigments. In contrast, when the O₃ exposure increases ROS generation, and this increase is coupled with the lack of an effective modulation of the antioxidant (both enzymatic and non-enzymatic), the induction of severe oxidative changes (increase in lipoperoxidation levels and decrease in the levels of chlorophyll a and b) leads to protein content loss on leaves, which compromises the cellular structure and the photosynthetic process. Thus, it can be concluded that in the studied cultivars the ability to resist the negative effects of O₃ relies on the constitutive biochemical differences that are capable of maintaining the cellular redox homeostasis of leaf tissue.

1. INTRODUÇÃO

A presença de diferentes poluentes ambientais vem representando uma séria ameaça para os mais diversos ecossistemas mundiais, e atualmente uma ampla gama de poluentes encontra-se distribuídos ao redor do planeta. Na maioria das vezes, estes poluentes têm sua origem em distintas atividades humanas, e a concentração dos mesmos, cresce a cada dia mais em virtude do aumento populacional o que, aliado ao aumento da demanda por recursos, impulsiona a industrialização da sociedade. Como resultado dessa cadeia de eventos, temos observado, quase que passivamente, a elevação da exposição de animais e plantas aos mais diversos compostos tóxicos, fato esse que tem norteado as buscas por respostas sobre como os poluentes ambientais afetam, tanto a homeostase dos seres vivos, como dos ecossistemas (Fuhrer, 2009; Vingarzan, 2004).

Em diversos países do mundo a poluição do ar tem se tornado uma grave ameaça para a qualidade e estrutura do ambiente no qual vivemos. Atualmente, o ozônio (O_3) troposférico pode ser considerado um dos poluentes que mais agrava o problema da poluição global do ar. As concentrações atmosféricas de O_3 vêm aumentando significativamente desde o período pré-industrial, e hoje é um dos poluentes do ar com maior difusão global, sendo responsável por impactos negativos sobre a saúde humana, a produção de alimentos e o ambiente (Booker et al., 2009; Iriti & Faoro, 2008). Em escala global, a poluição por O_3 é considerada maior na Europa Central, no leste da China, no leste dos Estados Unidos da América (EUA). Na Europa, os níveis mais elevados de O_3 ocorrem na área central e sul da Europa. Altas concentrações de O_3 também ocorrem nos trópicos e são frequentemente associados com a queima de biomassa (The Royal Society, 2008).

O monitoramento das modificações fisiológicas e químicas desencadeadas pela ação de diferentes contaminantes se faz assim bastante necessário ainda, especialmente nas áreas metropolitanas e polos industriais, uma vez que são os locais que mais contribuem para ampliar a magnitude da presença desses poluentes (Tuzet et al., 2011). Nesse contexto, os organismos vegetais têm sido bastante utilizados como modelo de estudo, e assim diversos resultados sobre as respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares desencadeadas pela ação tóxica dos poluentes vêm sendo descritos nos últimos anos (Ashmore, 2005; Burkey et al., 2005; Calatayud et al., 2007).

Por serem organismos sedentários, as espécies vegetais são mais vulneráveis à variação dos poluentes presentes no meio (Feder, 1978). Em virtude dessa característica, as plantas necessitam constantemente se adaptar às variações impostas para sua sobrevivência, o que resulta no aparecimento de uma ampla variedade de mecanismos bioquímicos de defesa e tolerância aos diferentes contaminantes ambientais (Iriti & Faoro, 2008; Krupa et al., 2001).

Nos últimos 50 anos as concentrações de O₃ troposférico mais que dobraram, e por isso o O₃ é atualmente considerado o poluente atmosférico que mais causa danos às principais plantas utilizadas para na agricultura (Ashmore, 2005; Vingarzan, 2004). Sabe-se que o O₃ pode causar reduções na produção agrícola, no crescimento das árvores e na taxa de remoção de carbono, modificando com isso a composição de espécies vegetais encontradas nos ecossistemas (Van Dingenen et al., 2009). Os sinais visíveis dos efeitos negativos da ação tóxica do O₃, sob o rendimento de diferentes cultivares, são a redução geral na biomassa da planta, crescimento e floração. Porém, entre os efeitos do O₃ menos visíveis estão incluídos a redução na quantidade de grãos produzidos e na qualidade dos frutos. Assim, em culturas de campo, tais como algumas variedades de trigo, arroz, milho, feijão, soja e sorgo, o O₃ reduz o tamanho, o peso e a qualidade nutricional dos grãos (Biswas & Jiang, 2011; Mulholland et al., 1998). Ainda, evidências mostram que o estresse fisiológico causado pelo O₃ pode alterar a composição química das culturas e, assim, a qualidade da produção agrícola (Wang & Frei, 2011).

1.1. O OZÔNIO COMO POLUENTE

1.1.1. Zonas de ocorrência e formação

A atmosfera é constituída por cinco camadas distintas que são definidas com base na variação de temperatura, pressão e na sua extensão vertical desde a superfície terrestre. A estratosfera e a troposfera (Figura 1) são as camadas mais próximas da crosta terrestre, sendo que os compostos encontrados nessas camadas exercem uma grande influência sobre as formas de vida do planeta.

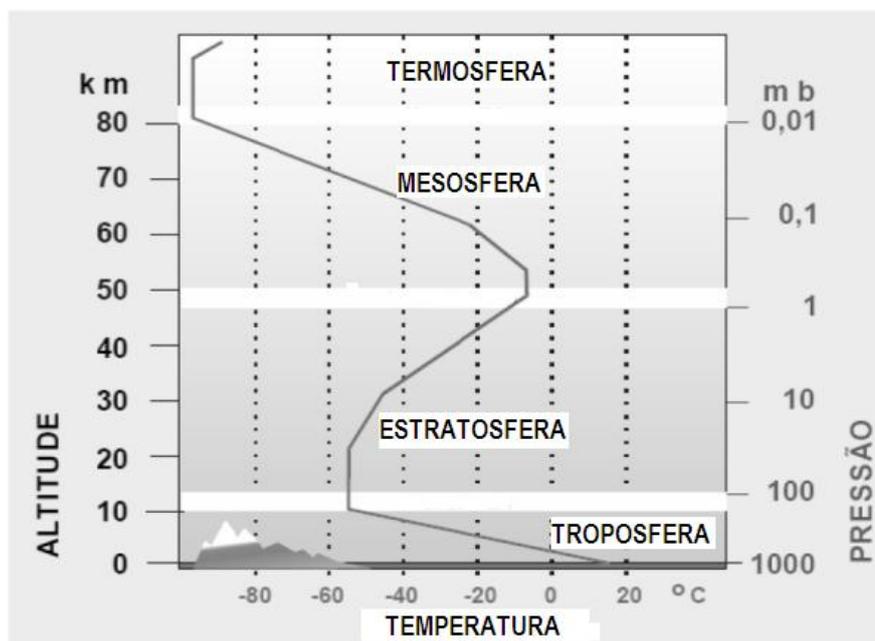


Figura 1. Diagrama de classificação da estrutura vertical das camadas atmosféricas segundo critérios de pressão e temperatura (Silva, 2006).

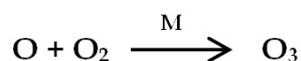
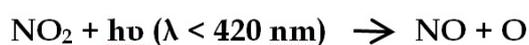
O O_3 está presente de forma natural, em proporções variadas, nessas duas camadas da atmosfera, sendo que na estratosfera (localizada entre 12 – 50 km de altitude) esse gás é responsável por formar a Camada de Ozônio, onde atua como um filtro protetor capaz de absorver a radiação ultravioleta (UV) e auxiliar na remoção dos gases responsáveis pelo Efeito Estufa (Crutzen & Oppenheimer, 2008; The Royal Society, 2008). A troposfera é a camada onde vivemos e está localizada entre o nível do mar e 12 km de altitude. Por ser a mais baixa de todas é a mais quente e a mais densa, e contém 90% de todo o ar da atmosfera. Devido a suas características, a troposfera é o local onde os processos químicos atmosféricos são intensificados, assim como é

também o local onde ocorre o acúmulo de poluentes emitidos pelas diversas atividades antrópicas (Crutzen et al., 1999; Lelieveld & Crutzen, 1994).

Os compostos que são diretamente emitidos por fontes poluidoras, como os óxidos de nitrogênio (NO_x), os óxidos de enxofre (SO_x), materiais particulados, além de inúmeros outros, são referidos como poluentes primários. Já os compostos formados na troposfera a partir de reações entre poluentes primários e constituintes naturais da atmosfera, como por exemplo, o O₃ e o ácido nítrico (HNO₃), são denominados poluentes secundários (CETESB, 2012; The Royal Society, 2008). Assim, ao contrário de muitos outros poluentes do ar, o O₃ não é diretamente emitido por fontes poluidoras e sim derivado das reações químicas catalisadas pela energia solar, envolvendo o monóxido de carbono (CO) e os compostos orgânicos voláteis (COV), incluindo o metano (CH₄) e os NO_x.

Os precursores do O₃ surgem tanto de fontes naturais biogênicas, como da ampla gama de atividades humanas. A amplitude de fontes precursoras de O₃, o papel dos processos naturais e físicos na produção do O₃, distribuição e destruição, e a complexidade das reações químicas, significa que o controle de O₃ não é algo simples (Bender & Weigel, 2011). Sendo assim, o controle dos níveis de O₃ é apenas atingido através de estratégias de gestões práticas de controle de emissões oriundas de atividades humanas que levam à formação dos gases precursores (Van Dingenen et al., 2009).

A geração do O₃ troposférico tem sua origem a partir da união do oxigênio molecular com o oxigênio atômico, que por sua vez tem origem da dissociação fotoquímica dos óxidos de nitrogênio (onde NO_x = NO + NO₂) que ocorre sob um comprimento de onda de 420 nm, ou da dissociação do oxigênio molecular a um comprimento de onda de 200 nm, de acordo com as equações:



onde M é qualquer molécula capaz de estabilizar a molécula de O₃ antes que a mesma sofra dissociação (Finlayson-Pitts & Pitts Jr, 1997).

Em atmosfera não poluída, o O₃ formado é consumido de acordo com a equação:



Já em condições atmosféricas poluídas, o monóxido de nitrogênio (NO) pode ser consumido por radicais orgânicos provenientes de reações químicas atmosféricas ou mesmo por hidrocarbonetos emitidos pela vegetação local, de modo que o O₃ não é consumido, e conseqüentemente acumula-se na troposfera. Além das reações químicas, os fatores meteorológicos e topográficos fazem com que os gases precursores do O₃ emitidos sejam transportados a vários locais, migrando assim de áreas industriais e urbanas até as áreas rurais e florestas, onde são convertidos a grandes quantidades de O₃ (Bender & Weigel, 2011; Godzik, 1997). Assim, três fatores influenciam os níveis de poluição atmosférica, e conseqüentemente os níveis de O₃ na atmosfera: i) a concentração de poluentes adicionados ao ar; ii) o volume de ar no qual os poluentes estão dispersos; e iii) os mecanismos de remoção dos poluentes do ar (Finlayson-Pitts & Pitts Jr, 1997).

Naturalmente, as concentrações troposféricas de O₃ seriam mínimas, mas essas vêm aumentando significativamente desde o início da revolução industrial (Krupa et al., 2001; The Royal Society, 2008). Considerando a influência que a concentração do O₃ exerce sob a alteração do equilíbrio de energia que entra e sai do sistema Terra-atmosfera, observa-se que o valor médio global devido ao aumento na concentração do O₃ desde a era pré-industrial é estimado em + 0,35 Wm⁻², valor esse que é positivo e por isso tende a aquecer a superfície terrestre. Isto torna o O₃ o terceiro gás mais influente para a formação do Efeito Estufa, ficando somente atrás do dióxido de carbono (CO₂) e CH₄ (The Royal Society, 2008).

1.1.2. Padrões, critérios e legislação

Os impactos da poluição por O₃ foram relatados pela primeira vez na Califórnia, no início da década de 1950, quando pesquisadores identificaram e descreveram as reações químicas de formação, bem como os efeitos da exposição ao O₃ (Haagen-Smit et al., 1953). Inicialmente, as medidas de controle foram criadas visando à diminuição das

emissões dos gases precursores do O₃, concentrando-se no controle dos picos de concentração destes, uma vez que foram considerados como sendo bastante prejudiciais para a saúde humana e dos ecossistemas (Chameides et al., 1997). Na América do Norte, na Europa e no Japão os níveis de O₃ considerados prejudiciais foram gradualmente reconhecidos como nocivos no decorrer da década de 1970, quando políticas nacionais e regionais de controle de emissão dos precursores do O₃ foram estabelecidas (The Royal Society, 2008).

Os efeitos nocivos do O₃ para a saúde humana e ambiental levaram uma série de países a desenvolver políticas e medidas de controle nos níveis de O₃ durante a segunda metade do século 20 (The Royal Society, 2008). Países da Ásia, África e América Latina iniciaram nos últimos anos abordagens regionais direcionadas para a gestão da qualidade do ar, mas, segundo o relatório apresentado pela *The Royal Society* em 2008, nenhuma política especificamente direcionada para a redução dos poluentes que dão origem ao O₃ foi criada ainda nesses locais.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda, como valor máximo para um período de 8 horas a concentração de 120 µg/m³ (ou 60 ppb) de O₃, para a proteção da qualidade da saúde humana, recomendação esta que é seguida pelos países da Europa (WHO, 2005). Porém, a concentração máxima recomendada pode variar de acordo com o país, já que na Polônia, por exemplo, considera-se que em 30 minutos a concentração de O₃ atmosférico não deve exceder 100 µg/m³, ou 50 ppb (Godzik, 1997).

No Brasil, onde o aumento nas concentrações de O₃ nos grandes centros urbanos também tem sido observado nos últimos anos, fez-se necessário estabelecer limites legais com o objetivo principal de proteger a saúde humana. Os padrões de qualidade do ar definem legalmente o limite máximo para a concentração de um poluente na atmosfera, que garanta a proteção da saúde e do meio ambiente, e são baseados em estudos científicos dos efeitos produzidos por poluentes específicos e fixados em níveis que possam propiciar uma margem de segurança adequada. Os padrões nacionais foram estabelecidos pelo IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente) e aprovados pelo CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) segundo a resolução nº 03 de 28/06/1990. Os Índices de Qualidade do Ar são obtidos através de uma função linear segmentada, na qual os pontos de inflexão representam os Padrões Nacionais de Qualidade do Ar (CETESB, 2012). Desta função, que relaciona a concentração do

poluente com o valor do índice, resulta um número adimensional referido a uma escala com base nos padrões de qualidade do ar (CETESB, 2012). De acordo com a classificação da qualidade do ar, concentrações de O₃ entre 0-80 µg/m³ são consideradas “boas”, entre 80-160 µg/m³ são consideradas “regulares”, e entre 160-200 µg/m³ são “inadequadas”. Ainda, a resolução do CONAMA (nº 03/90) estabelece que para haver a proteção do bem estar da população, incluindo proteção contra a redução da visibilidade, danos a animais, colheita, vegetação e edificações, a concentração máxima de O₃ não deve exceder a concentração de 160 µg/m³ (ou 80 ppb) pelo período de 1 hora.

No Estado de São Paulo, o O₃ é o poluente que mais ultrapassa os padrões de qualidade do ar. No ano de 2011, o monitoramento de 34 estações automáticas distribuídas em 11 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos revelou que a região metropolitana de São Paulo apresentou o maior número de ultrapassagens do padrão “regular” de qualidade do ar, e também o maior número de dias de ocorrência dos eventos de ultrapassagens do padrão (96 dias). Resumindo, a região metropolitana de São Paulo apresenta um alto potencial de formação de O₃, uma vez que a emissão de precursores é grande, principalmente os de origem veicular (CETESB, 2012).

Informações sobre a qualidade do ar disponibilizadas pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler do Estado do Rio Grande do Sul (Fepam - RS) indicaram que, no ano de 2002, o percentual relativo de contribuição O₃ para os episódios de qualidade do ar considerada “regular” foram até 40% (FEPAM, 2003). A estação de Montenegro/Polo Petroquímico, localizada a aproximadamente 70 Km da capital Porto Alegre, foi o local que mais apresentou episódios de qualidade de ar consideradas regulares (FEPAM, 2013). Ainda, durante o período 2002 – 2010 a estação localizada no município de Canoas/V COMAR registrou mais de 300 episódios com índices de qualidade de ar “regular” para as concentrações de O₃, sendo que em 2008, três episódios com índice de qualidade de ar “inadequado” foram registrados na mesma estação de amostragem (FEPAM, 2013).

1.1.3. Impactos e perdas econômicas

Ao longo de várias décadas, diversas pesquisas que abordam os efeitos dos níveis elevados de O₃ troposférico em culturas agrícolas têm sido realizadas. Dados relativos aos impactos negativos sobre a produtividade de diferentes culturas atraíram a atenção do público em primeiro lugar nos Estados Unidos, e mais tarde na Europa (revisão em Betzelberger et al., 2012 e Booker et al., 2009). Mais recentemente, a questão tem preocupado outras partes do mundo, particularmente o Sudeste Asiático (Feng & Kobayashi, 2009; Feng et al., 2003; Sarkar & Agrawal, 2012; Sarkar et al., 2010). Em um trabalho de modelagem recente realizado pelo Instituto de Meteorologia do Reino Unido, usando o cenário de previsão de emissões propostos pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC), indica que haverá a expansão da área sujeita a concentrações elevadas de O₃ durante o verão nas próximas décadas, com *hotspots* na América do Sul e do Norte, Europa e Ásia (Collins et al., 2000) (Figura2).

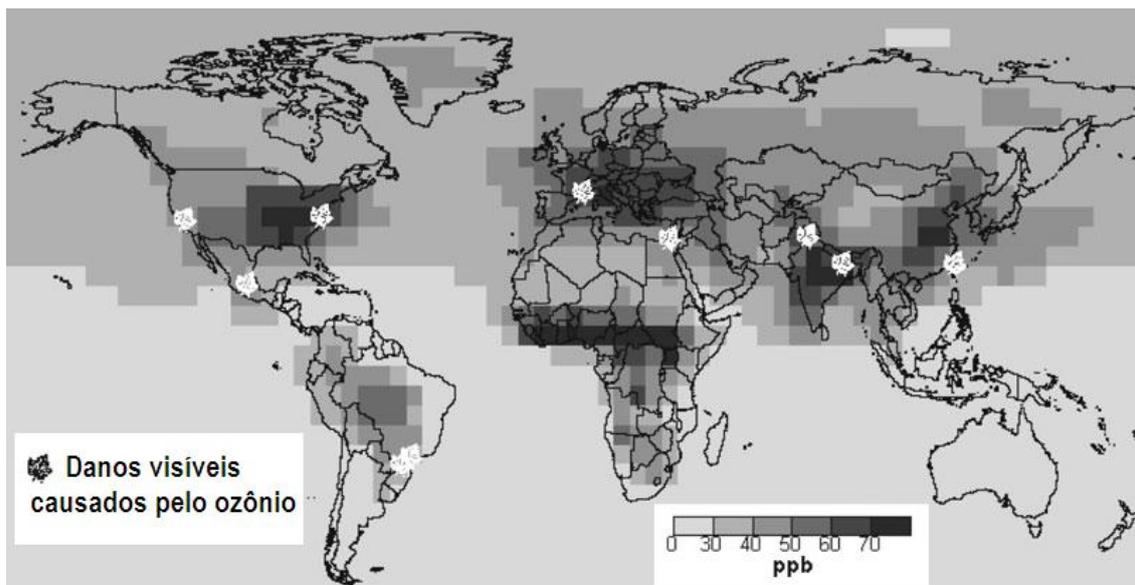


Figura 2. Distribuição global da concentração média máxima crescente de ozônio para o ano de 2030. Dados produzidos a partir do modelo transporte intercontinental de ozônio (STOCHEM) proposto por Collins et al. (2000) e adaptado de Fuhrer e Booker (2003). Os símbolos em forma de **folha** indicam as regiões do globo onde há registro de danos ou reduções visíveis no rendimento de espécies vegetais causados pelo ozônio. Modificado de Ashmore (2005).

Segundo Vingarzan (2004), as concentrações anuais globais de O₃ poderão alcançar em 2050 o valor de 70 ppb, fato que ocorrerá devido especialmente ao aumento das emissões de NO_x e ao transporte intercontinental, que excederá os limites aceitos internacionalmente para a proteção da saúde humana e do meio ambiente.

As perdas na produtividade agrícola associadas aos danos causados pelo O₃ nos Estados Unidos durante o ano de 2000 foram estimadas entre 1.8 e 3.9 bilhões de dólares, e na Europa, no mesmo ano, cerca de 6,7 bilhões de Euros foram perdidos devido aos impactos causados pelo O₃ às lavouras (Van Dingenen et al., 2009; The Royal Society, 2008). Em regiões de rápido desenvolvimento, como o Sul da Ásia, o impacto do O₃ na produção de alguns alimentos básicos como trigo e arroz representa hoje uma séria ameaça para a segurança alimentar regional. De acordo com Van Dingenen et al. (2009), se assumirmos que a legislação atual de qualidade do ar (concentração acumulada acima de um limiar de 40 ppb = AOT₄₀) seja totalmente implementada em escala global, regional e nacional, as projeções para o ano de 2030 indicam que a situação global deverá deteriorar-se afetando principalmente a produção de trigo e arroz. Em uma escala regional, reduções significativas nas safras dos países da Europa (soja), da China (arroz) e da Índia (arroz e trigo) são esperadas para o ano 2030 (Booker et al., 2009). Traduzindo essas perdas em rendimento econômico global total, e utilizando-se os preços do mercado mundial do ano de 2000, estima-se uma perda econômica na faixa de 14 - 26 bilhões de dólares, e cerca de 40% dessa perda ocorrerá em países economicamente emergentes, como a China e a Índia (Emberson, 2011).

Além de afetar a quantidade da produção agrícola, o O₃ também exerce impactos negativos sobre a qualidade das plantas cultivadas (Ashmore, 2005; Emberson, 2011). Entretanto, estudos sobre as variações na qualidade ou no valor nutritivo dos produtos de agricultura e horticultura devido à exposição O₃ são ainda descritos para um número limitado de plantas. Por exemplo, no trigo, a exposição ao O₃ reduz o rendimento, mas aumenta a concentração de proteína no grão (Feng et al., 2008; Piikki et al., 2008). Além disso, o O₃ parece ter efeitos positivos sobre a qualidade dos tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L cv. Bintje), uma vez que a exposição diminui os níveis de açúcares redutores e de amido, mas aumenta a concentração de vitamina C (Vorne et al., 2002). Em contraste, Ollerenshaw e colaboradores (1999) observaram que elevadas concentrações de O₃ reduzem tanto a produtividade, como o conteúdo de óleo e

proteínas em sementes de canola (*Brassica napus* ssp.). O estudo de meta-análise realizado por Feng e Kobayashi (2009) para avaliar, quantitativamente, os efeitos do aumento das concentrações de O₃ na produtividade e componentes da produção das principais culturas de batata, cevada, trigo, arroz, feijão e soja, revelou que os níveis atuais de O₃ (31-50 ppb) reduzem em 5,3% a produtividade da batata, em 8,9% a produção de cevada, em 9,7% a produção do trigo e em 17,5% o arroz. Para as culturas de feijão e soja, as perdas de produtividade foram de 19,0% e 7,7%, respectivamente. Comparado à perda de rendimento decorrente dos níveis atuais de O₃, no futuro, quando se prevê que as concentrações atingirão entre 51-75 ppb, os autores estimam que haverá uma perda adicional de 10% na produção de soja, trigo e arroz, e 20% para o feijão. Ainda, afirmam que, sob as condições atuais e futuras de concentração O₃, a causa da perda de rendimento é, e será, devida à redução no tamanho individual do grão, da semente ou do tubérculo.

Embora alguns estudos individuais tenham abordado os impactos negativos do O₃ em regiões da África, América Latina e Ásia (Emberson et al., 2003), as informações sobre os efeitos do O₃ na produtividade e qualidade das principais culturas produzidas nos países fora da Europa e América do Norte, ainda são escassas.

1.2. OS MECANISMOS DA FITOTOXICIDADE DO OZÔNIO

Nos ecossistemas terrestres, talvez os efeitos diretos mais importantes do O₃ sejam relacionados com a fisiologia das folhas e crescimento das plantas, sendo que a partir desses efeitos diretos primários, muitos outros efeitos indiretos, que afetam a dinâmica dos ecossistemas acabam surgindo. Dentre as características envolvidas na capacidade de suportar ou reverter os impactos diretos oriundos da ação tóxica do O₃ sob as espécies vegetais dois mecanismos de defesa podem ser considerados os mais importantes, i) o controle do fluxo de O₃ nas folhas e ii) a capacidade dos processos de desintoxicação e reparação no interior do tecido foliar (Iriti & Faoro, 2008; Matyssek et al., 2008; Sharma et al., 2012).

Em plantas, a exposição ao O₃ causa redução na produção de biomassa, o que afeta o crescimento e metabolismo de órgãos como as raízes e caules (Black et al., 2007; Cano et al., 2007). Danifica, ainda, a estrutura foliar, provocando o aparecimento de sinais evidentes da toxicidade do gás, como o amarelamento das folhas em ambas as faces e o curvamento das mesmas, o que dificulta a fotossíntese e contribui para a senescência foliar (Calatayud et al., 2011; Iglesias et al., 2006). A origem da toxicidade do O₃ reside principalmente no fato deste poder penetrar nas plantas através dos estômatos que estão localizados na superfície foliar (Castagna & Ranieri, 2009). Uma vez dentro das folhas, o O₃ pode interferir direta ou indiretamente nos mais diversos processos fisiológicos, metabólicos e celulares das plantas (Baier et al., 2005; Schraudner et al., 1997).

1.2.1. O ozônio e a formação de espécies ativas de oxigênio

Desde o início dos estudos sobre os efeitos do O₃ sobre as espécies vegetais, observou-se que a fitotoxicidade deste poluente estava relacionada com o fato deste ser por natureza um potente agente oxidante capaz de ser rapidamente convertido no espaço intracelular a diferentes EAO. A degradação do O₃ no tecido foliar pode gerar grandes quantidades de EAO como o ânion superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxil (HO[•]) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Castagna & Ranieri, 2009; Iriti & Faoro, 2008; Sharma & Davis, 1997; Wohlgemuth et al., 2002). Em meio aquoso, a reação espontânea de

conversão do O_3 a HO^\bullet é acelerada pela presença de Fe^{2+} e favorecida por pH alcalino (Pell et al., 1997). Pryor e colaboradores (1991) demonstram ainda que, uma vez dentro das células vegetais, o O_3 reage com ácidos graxos insaturados produzindo H_2O_2 , o que contribui para a reação em cadeia da oxidação dos lipídios de membrana.

Em plantas, a geração de EAO ocorre, preferencialmente, nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Foyer & Noctor, 2008; Navrot et al., 2007; Sharma et al., 2012). As evidências de que a geração das EAO desempenhava um papel fundamental na toxicidade do O_3 foram, principalmente, obtidas a partir de estudos que avaliavam os diferentes parâmetros de estresse oxidativo em plantas expostas, mostrando que tais alterações eram muitas vezes irreversíveis e letais (Gratão et al., 2005; Sharma & Davis, 1997).

Apesar de nocivas, as EAO têm um papel fundamental na sinalização e regulação do desenvolvimento celular, e assim, níveis basais de EAO são necessários para a manutenção da viabilidade das células (Apel & Hirt, 2004; Baier et al., 2005; Sharma et al., 2012). Entretanto, concentrações elevadas de EAO no meio intracelular desregulam o estado redox da célula, o que pode resultar na inibição do crescimento celular, indução de apoptose e necrose (Foyer & Noctor, 2008; Navrot et al., 2007). O desbalanço entre a produção e a degradação das EAO tem sido apontado como um dos efeitos primários da exposição de plantas a estressores abióticos como o O_3 . Uma das consequências diretas desse desbalanço são os danos oxidativos a biomoléculas, sendo que os mais frequentemente relatados são o aumento da peroxidação lipídica, observado tanto em células das folhas como das raízes em diferentes espécies vegetais, e o dano oxidativo a proteínas e ao DNA (Calatayud & Barreno, 2004; Galant et al., 2012; Sharma et al., 2012; Tai et al., 2010).

1.2.2. Defesas antioxidantes: enzimáticas e não-enzimáticas

Uma vez que, durante o metabolismo celular as EAO são fisiologicamente geradas, as plantas desenvolveram sistemas antioxidantes de defesa enzimática e não-enzimática bastante eficientes e capazes de detoxificar quantidades substanciais de EAO (Castagna & Ranieri, 2009). Os sistemas de defesa antioxidantes desempenham um papel fundamental na determinação das repostas celulares diante de um insulto oxidativo, não

só porque as defesas mantêm o controle dos níveis de EAO, mas porque também atuam como componentes centrais do equilíbrio redox da célula e na modulação das cascatas de sinalização (Dutilleul et al., 2003; Halliwell, 2006; Sharma et al., 2012). A exposição ao O₃ ativa os mecanismos de defesa antioxidantes, o que pode ocorrer tanto através da modulação da atividade e/ou expressão das enzimas de antioxidantes ou do aumento dos níveis de moléculas *scavengers* de EAO (Castagna & Ranieri, 2009).

Fazem parte dos componentes enzimáticos da defesa antioxidativa várias enzimas antioxidantes, cujas principais são, a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), as enzimas do ciclo ascorbato-glutathione (AsA-GSH) como a ascorbato peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR) e a glutathione reductase (GR). Estas enzimas localizam-se em diferentes compartimentos subcelulares, mas atuam em conjunto quando as células são expostas a um insulto oxidativo. A Figura 3 mostra as várias enzimas antioxidantes que desempenham um papel importante na manutenção dos níveis adequados de EAO nas plantas (Halliwell, 2006; Sharma et al., 2012).

Dentre as enzimas antioxidantes a CAT foi a primeira a ser descoberta e caracterizada. É uma enzima ubíqua, que contém um grupamento heme, sendo a principal enzima responsável por catalisar a dismutação de duas moléculas de H₂O₂ em água e oxigênio (Willekens et al., 1995). A enzima tem alta especificidade para o H₂O₂, mas com fraca atividade contra os peróxidos orgânicos. As plantas contêm diversos tipos de enzimas que degradam a molécula de H₂O₂, no entanto, a CAT é a única enzima que atua sem a necessidade da presença de um equivalente redutor (Vandenabeele et al., 2004). Mesmo com uma menor afinidade para H₂O₂ do que a APX, a enzima apresenta uma taxa de *turnover* mais elevada. Ainda, diferença de afinidade pelo H₂O₂ que existe entre a APX (na faixa de µM) e a CAT (na faixa de mM) sugerem que essas pertencem a duas classes distintas de enzimas responsáveis por eliminar o H₂O₂, sendo a APX responsável pela modulação dos níveis basais de EAO necessários para a manutenção dos processos de sinalização celular, enquanto a CAT é responsável por eliminar o excesso de H₂O₂ gerado durante as situações de estresse (Mittler, 2002). Os peroxissomos são os principais locais de produção de H₂O₂, sendo a organela onde a CAT tem maior atividade. Embora existam relatos frequentes da presença de CAT no citosol, cloroplastos, e na mitocôndria, a presença de atividades significativas da CAT nestas organelas é ainda pouca estabelecida (Mhamdi et al.,

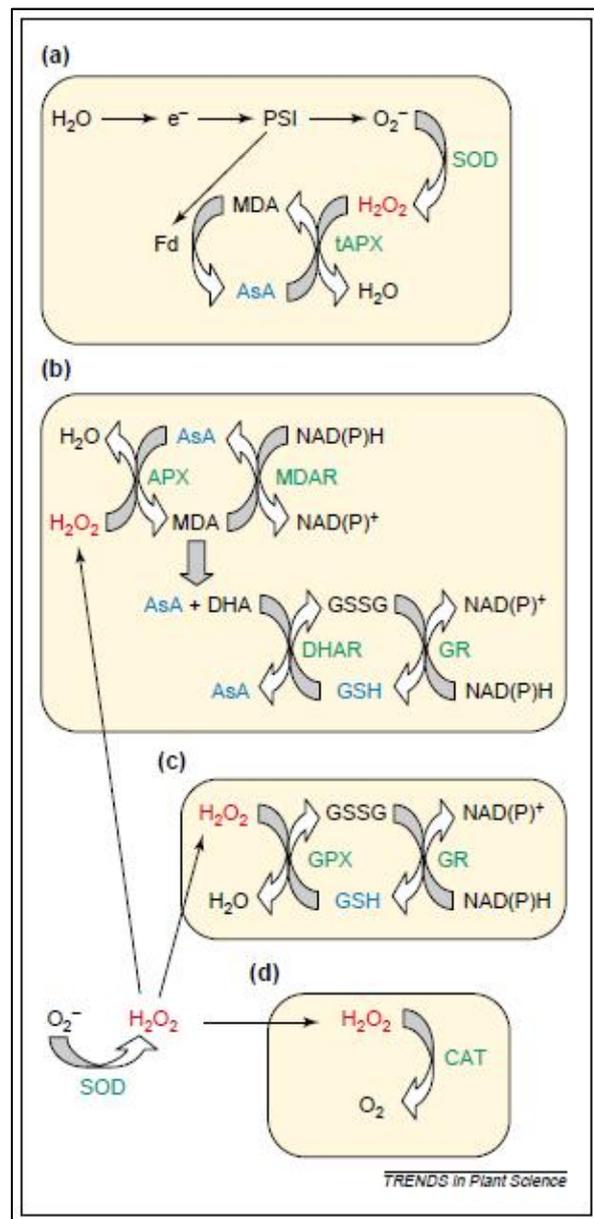
2010). Até o presente momento, para todas as espécies de angiospermas estudadas observaram-se três genes para CAT, sendo que Willekens et al. (1995) propôs uma classificação com base no perfil de expressão dos genes do tabaco: CAT da classe I, genes expressos em tecidos fotossintéticos e regulados pela luz; CAT de classe II, genes expressos em níveis elevados nos tecidos vasculares; CAT da classe III, genes muito abundantes em sementes e plantas jovens.

Figura 3. Principais vias de eliminação das espécies ativas de oxigênio (EAO) em plantas.

(a) Produção de EAO durante a fotossíntese nos cloroplastos. (b) Ciclo do ascorbato-glutationa (AsA-GSH) no cloroplasto, citosol, mitocôndria, apoplasto e peroxissomos. (c) Ciclo da glutaciona peroxidase (GPX). (d) Catalase (CAT) nos peroxissomos.

A SOD atua como a primeira linha de defesa convertendo O_2^- em H_2O_2 . A APX, GPX e CAT, logo em seguida detoxificam o H_2O_2 . Ao contrário da CAT (d), a APX e a GPX requerem um agente redutor, seja uma molécula de ascorbato (AsA) e/ou de glutaciona (GSH) para regenerarem o ciclo (a-c). Este ciclo pode utilizar diretamente os elétrons oriundos da fotossíntese (a) ou $NAD(P)H$ (b,c), de acordo com o potencial de redução. As EAO são indicadas em vermelho, as moléculas antioxidantes em azul, e enzimas antioxidantes em verde.

Abreviações: DHA, dehydroascorbate; DHAR, DHA reductase; Fd, ferredoxina; GR, glutaciona reductase; GSSG, glutaciona oxidada; MDA, monodehydroascorbate; MDAR, MDA reductase; PSI, fotossistema I; tAPX, APX ligada ao tilacoide (retirado de Mittle, 2002).



Dentre as vias de defesas antioxidantes presentes nas plantas, o ciclo do AsA-GSH é descrito por diversos autores como a principal rota de detoxificação das EAO (Dizengremel et al., 2008; Horemans et al., 2000b; Noctor & Foyer, 1998a). A ampla distribuição dos componentes do ciclo nas diferentes organelas das células vegetais (cloroplastos, citosol, mitocôndria, apoplasto e peroxissomos) e o fato da APX apresentar alta afinidade pelo H_2O_2 , sugerem que esse ciclo desempenha um papel crucial no controle da concentração de EAO nos compartimentos onde se encontra presente (Halliwell & Gutteridge, 2007; Mittler, 2002). Como demonstrado na figura abaixo (Figura 4), esse ciclo é o principal responsável pela manutenção das concentrações basais entre as formas oxidadas e reduzidas, tanto da GSH como do AsA (Apel & Hirt, 2004; Mittler, 2002).

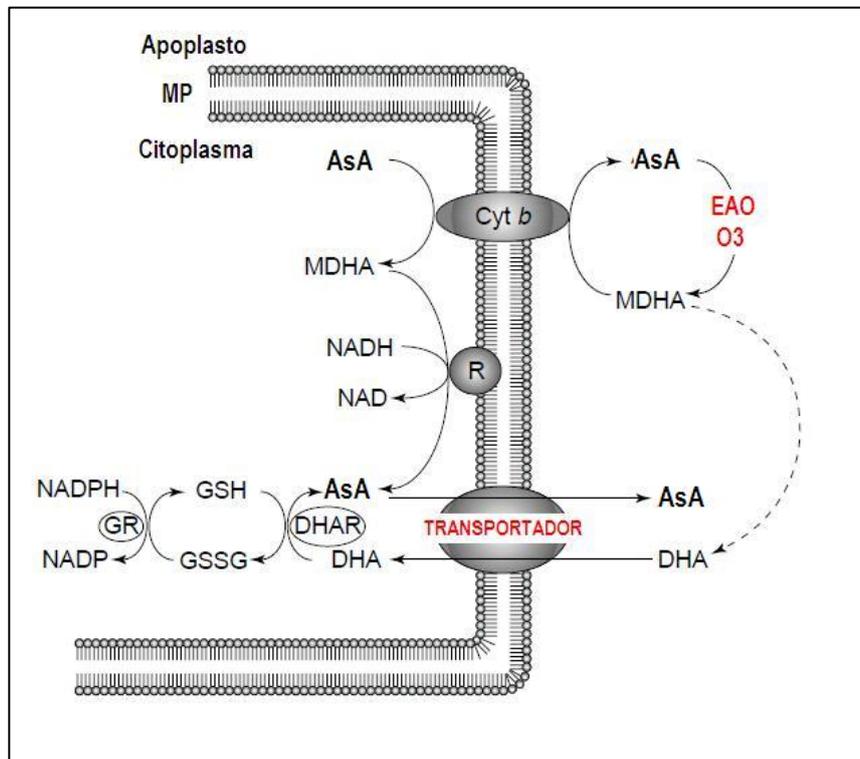


Figura 4. Mecanismo proposto para a regeneração do ascorbato (AsA) na membrana plasmática das plantas (MP). A reação do AsA com as EAO (através da APX) gera a forma semi-reduzida da molécula (o MDHA), que pode então ser diretamente reduzido pelo citocromo b a AsA novamente, mediante a transferência de elétrons (citocromo b) ou pela ação da NADH-MDHA oxidoreductase (R). O MDHA pode também ser oxidado à DHA (forma totalmente oxidada do AsA). O DHA extracelular é transportado para o citoplasma onde é reduzido (pela ação da DHAR), que utiliza GSH como doador de elétrons. A GSSG é por sua vez reduzida pela glutatona redutase (GR) que utiliza NADPH como doador de elétrons. O transportador de AsA-DHA na membrana plasmática é uma hipótese de como sistema de troca entre AsA e DHA atuaria na manutenção dos os níveis extracelulares de AsA (Modificado de N Horemans et al., 2000).

No caso do O₃, a variação nos níveis de GSH e de AsA podem surgir como resultado do aumento na geração de EAO, fazendo com que a modulação da atividade das enzimas antioxidantes como APX e GPX altere as proporções das concentrações destes antioxidantes não-enzimáticos (Mahalingam et al., 2006). Alguns trabalhos têm sugerido que a susceptibilidade diferencial que existe entre plantas tolerantes e sensíveis ao O₃ é dependente das concentrações relativas de AsA e GSH, indicando a existência de correlação entre o aumento nos níveis das defesas antioxidantes e a adaptação a fatores abióticos que induzem aumento na produção de EAO (Sharma & Davis, 1997). O aumento na tolerância ao O₃ foi também atribuída, por alguns autores, ao aumento exclusivo nas concentrações de AsA, uma vez que plantas com níveis mais elevados de AsA total no tecido foliar apresentavam maior capacidade de inativar o O₃ que penetrava nas folhas já no nível da parede celular, diminuindo assim a quantidade de O₃ disponível para ser degradado a EAO e de reagir com a membrana celular (Kanofsky et al., 1995).

Além de afetar a atividade e expressão das principais enzimas antioxidantes e de poder alterar severamente os níveis dos principais metabólitos antioxidantes não-enzimáticos, como a GSH e o AsA, a exposição ao O₃ pode também influenciar a biossíntese de metabólitos secundários em plantas. Através de alterações na transcrição e/ou na atividade das enzimas-chave das vias metabólicas secundárias, o O₃ pode afetar a síntese de compostos que resultam das três principais vias biossintéticas, a dos fenilpropanóides, a dos isoprenóides, e a dos alcalóides (Booker & Miller, 1998; Castagna & Ranieri, 2009; Torres et al., 2007). Muitos dos compostos sintetizados por essas vias são moléculas capazes de melhorar a tolerância da planta a poluentes ambientais como o O₃ (Di Baccio et al., 2008; Puckette et al., 2008). Os compostos fenólicos, por exemplo, têm muitas funções, dentre as quais são os precursores para a síntese de lignina, mas também podem ser *scavengers* de EAO já que apresentam propriedades antioxidantes devido as suas características moleculares (Korkina, 2007). Como os precursores das vias metabólicas secundárias são produtos do metabolismo primário, fatores de estresse como a exposição ao O₃, podem induzir uma mudança severa entre o metabolismo primário e secundário, uma vez que o desvio de recursos disponíveis para necessidades essenciais de crescimento são alocados para a síntese de compostos de defesa, aumentando a capacidade das plantas de tolerar o estresse (Booker et al., 2009; Iriti et al., 2009).

1.2.3. Modificações na homeostase redox intracelular

Os efeitos negativos do O₃ sobre o metabolismo de plantas dependem tanto da concentração e da duração da exposição, quanto das características genéticas e da fase de desenvolvimento na qual o vegetal se encontra (Baier et al., 2005).

A principal barreira responsável por impedir o fluxo de O₃ para o interior do tecido foliar é a resistência conferida pela atividade dos estômatos (Tuzet et al., 2011). Porém, a reação direta do gás com a molécula de AsA, localizada na parede celular, também controla do fluxo de O₃ para o interior das folhas, e dessa maneira, níveis constitutivos mais elevados de AsA no apoplasto foram propostos como um bom indicador de tolerância ao O₃, uma vez que aumentariam a capacidade antioxidante total da parede celular e o diminuindo o grau de sensibilidade das espécies vegetais (Eltayeb et al., 2006; Smirnoff, 1996). Alguns estudos relatam que plantas com a síntese de AsA aumentada apresentam maior tolerância ao O₃ atmosférico, assim como plantas transgênicas que superexpressam componentes das vias de síntese da GSH (Noctor & Foyer, 1998a).

Como visto até aqui, o *pool* de AsA não é o único componente das defesas antioxidantes não-enzimáticas presentes no apoplasto, e elementos e rotas antioxidantes adicionais encontrados no compartimento apoplástico complementam a ação de detoxificação necessária para combater o O₃ (Smirnoff, 1996). O metabolismo das plantas necessita ser altamente regulado, e a integração eficaz de um espectro diversificado de vias de biossíntese que, são na sua maioria de natureza redutiva, atuam nesse processo de detoxificação (D'Haese et al., 2005; Ranieri et al., 1999). Conceitos emergentes sobre como a percepção e detoxificação do O₃ ocorre nas plantas sugerem que, ao invés de envolver apenas mecanismos simples de sinalização, a relação entre o metabolismo celular e a manutenção do balanço redox é complexa e bastante sutil, onde numerosos componentes são detectados pela célula a fim de efetuar alterações de aclimação (Castagna & Ranieri, 2009; Dizengremel et al., 2008, 2009).

Níveis basais de EAO são devem ser mantidos pelas células vegetais, em especial o anion superóxido e o H₂O₂, pois esses atuam como segundos mensageiros em processos associados com o crescimento e o desenvolvimento da planta (Halliwell, 2006; Iriti & Faoro, 2008; Mittler, 2002). Além disso, uma das principais formas das plantas transmitirem informações a respeito das alterações ambientais é através do

aumento da concentração intracelular de EAO, especialmente no nível na membrana plasmática (Apel & Hirt, 2004; Foyer & Noctor, 2008). Assim, alterações no equilíbrio redox do meio intracelular, desencadeadas pelo desbalanço nos níveis de EAO, podem modificar a estrutura e a função de proteínas/enzimas, fator esse que exercer forte influencia sobre os mais diversos processos fisiológicos das plantas (Galant et al., 2012; Yi et al., 2010). Estudos têm demonstrado, por exemplo, que vários aspectos da síntese e da atividade da Rubisco (Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase) são regulados de acordo com o equilíbrio redox intracelular. Moreno e colaboradores (2008) mostraram que existe uma modulação redox da enzima, e essa ocorre através da oxidação dos resíduos de cisteínas, os quais parecem agir em conjunto como uma rede de sensores redox que modulam o catabolismo e a atividade da Rubisco. Ainda, a atividade enzimática da Rubisco também pode ser afetada pelo equilíbrio redox em algumas espécies devido a modulação da atividade da isoforma da Rubisco ativase-dependente de tioredoxina, enzima auxiliar responsável por liberar o sítio catalítico da Rubisco (Pelloux et al., 2001; Zhang et al., 2002).

A alteração do estado redox dos grupamentos tióis de várias proteínas envolvidas em diferentes rotas de sinalização celular, aliadas à oxidação de proteínas e dos lipídios de membrana, resultam na diminuição na taxa de fotossíntese e no aumento da senescência foliar o que termina por desencadear efeitos prejudiciais sobre os processos metabólicos primários (Fuhrer & Booker, 2003; Matyssek et al., 2008). Essas alterações no metabolismo das plantas acabam então por diminuir a assimilação de carbono, a produção de biomassa, o crescimento e que ao final comprometem severamente a produtividade e a qualidade dos frutos gerados por essas plantas (Booker et al., 2009; Fuhrer & Booker, 2003; Fuhrer, 2009). No caso das culturas de feijão, por exemplo, os resultados negativos da exposição ao O₃ podem ser observados no tamanho reduzido das vagens, ou na diminuição do número das mesmas (Booker et al., 2009). Com relação à qualidade do grão, por exemplo, nota-se que o teor de proteína e/ou de óleo das vagens ou grãos, assim como a síntese de compostos secundários, também podem sofrer alterações quando expostos ao O₃ (Fuhrer, 2009; Torres et al., 2007).

1.3.ASPECTOS GERAIS DO FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)

Considerando os diversos gêneros e espécies, o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a espécie mais cultivada do gênero *Phaseolus*. O feijão constitui-se em uma das mais importantes fontes proteicas na dieta humana em diversos países em desenvolvimento localizados nas regiões tropicais e subtropicais. Seu cultivo ocorre em 121 países em todo o mundo, tendo uma produção de aproximadamente 20,7 milhões de toneladas, o que ocorre em uma área de 25,6 milhões de hectares (Barbosa and Gonzaga, 2012). Em 2007, o maior consumo desse produto foi observado nas Américas (40,8%), seguindo da Ásia (37,8%), África (17,8%), Europa (3,3%) e Oceania (0,1%) (Barbosa & Gonzaga, 2012). Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, 2003) os países em desenvolvimento são atualmente responsáveis por 87,1% do consumo mundial e por 89,8% da produção de feijão.

O Brasil é considerado um dos maiores produtores de feijão do mundo, seguido do México. Em 2006, 67,3% (12,7 milhões de toneladas) da produção mundial do gênero *Phaseolus* foram originadas de apenas seis países, sendo o Brasil o país que mais contribuiu com a produção (18,2% da produção mundial) (Barbosa & Gonzaga, 2012; Hrapsky et al., 2010). Entretanto, o cultivo em solo brasileiro de feijão tem se tornado insuficiente para abastecer o mercado interno devido à redução na área plantada, o que ocorreu na ordem de 35%, nos últimos 17 anos. Mesmo com um aumento de 48% na produtividade, verificado durante esses mesmos 17 anos, ainda se observou uma diminuição de 4% na produção, o que não foi suficiente nem para atender à demanda nacional (Embrapa, 2003).

A Região Central-Brasileira, que engloba a Região Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais), a Região Centro-Oeste (Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) e alguns Estados das Regiões Norte (Tocantins, Acre e Rondônia) e Nordeste (Região Oeste da Bahia) são responsáveis por 53% da produção nacional de feijão, e ocupam apenas 38% da área cultivada. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013) o Estado do Rio Grande Sul apresenta uma produtividade média de 1253 kg/ ha.

Dentro do Brasil existem grandes variações regionais quanto à preferência pelos tipos de grãos de feijão cultivados e consumidos, sendo que as regiões brasileiras são

bem definidas com relação a essa preferência. As variações regionais observadas orientam assim as pesquisas de tecnologia, e direcionam a produção e comercialização do produto, o que norteia a seleção e obtenção de novas cultivares, exigindo destas não apenas boas características agrônômicas, mas também valor comercial agregado (Embrapa, 2003).

O feijão preto é mais popular no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, sul e leste do Paraná, Rio de Janeiro, sudeste de Minas Gerais e sul do Espírito Santo. No restante do país este tipo de grão tem pouco ou quase nenhum valor comercial ou aceitação. Os feijões de grão tipo carioca são aceitos em praticamente todo o Brasil, e assim 53% da área cultivada no país é semeada com este tipo grão. O feijão mulatinho é mais aceito na Região Nordeste, e os tipos roxo e rosinha, são mais populares nos Estados de Minas Gerais e Goiás (Embrapa, 2003).

1.3.1. Importância econômica para o Brasil

No Brasil, o cultivo do feijão é feito por pequenos e grandes produtores em todas as regiões do país, sendo que os estados que mais produzem esse grão são o Paraná (colheu 298 mil toneladas na safra 2009/2010) e Minas Gerais (produção de 214 mil toneladas no mesmo período) (MAPA, 2013).

Mesmo com o aumento da produção, o país não produz o suficiente para atender ao mercado interno, cujo consumo aumentou em 10,94%, somente entre os anos de 2004 a 2010 (Barbosa & Gonzaga, 2012). Projeções indicam uma taxa anual de aumento na produção de 1,77%, de acordo com estudo da Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura. Os dados também apontaram um aumento de cerca de 1,22% ao ano no consumo do produto para o período de 2009/2010, e estimativas apontam que a produção poderá passar de 3,7 milhões de toneladas para 4,31 milhões de toneladas no período de 2019/2020 (MAPA, 2013).

Apesar dos atuais 3,8 milhões de toneladas de feijão produzidos no país, o Brasil importou entre os anos de 2005 a 2011, aproximadamente, 121 mil toneladas/ano. Os picos de importação ocorrem entre os meses de junho e setembro, sendo determinados, entre outros fatores, pelo resultado das safras nacionais e pelo custo. No ano de 2011, os

principais países que exportam para o Brasil foram a China, Argentina, Bolívia, Estados Unidos e Bélgica (Barbosa & Gonzaga, 2012).

A relevância econômica e social da produção agrícola do feijão está também associada à mão-de-obra que o cultivo deste emprega durante o ciclo da cultura. Sendo bastante difundido em todo o território nacional, é reconhecida como cultura de subsistência em pequenas propriedades, muito embora tenha ocorrido, nos últimos 20 anos, um crescente interesse dos produtores em adotarem tecnologias avançadas, incluindo sistemas de irrigação e a colheita mecanizada. O fato é que, existe ainda no Brasil, a falta de informação sobre a real comercialização do produto, sendo esse um dos pontos de estrangulamento da cadeia produtiva desta cultura (Embrapa, 2003).

1.3.2. Cultivares do sul do Brasil

Uma vez que a diversidade de condições ambientais ocasiona alterações no desempenho relativo das cultivares criou-se a necessidade de identificar cultivares de feijão com adaptabilidade e estabilidade fenotípica para cada clima e região. Programas públicos de melhoramento do feijão no Rio Grande do Sul vêm sendo conduzidos nos últimos anos pela Embrapa Clima Temperado em parceria com a Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (Fepagro). Esses programas visam avaliar de maneira conjunta as cultivares de feijão inscritas no Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura (RNC-MAPA) e aquelas tradicionalmente utilizadas por pequenos produtores rurais, com a finalidade de gerar informações sobre a adaptação das cultivares às condições de cultivo encontradas no estado (Ribeiro et al., 2009).

Análises de adaptabilidade e de estabilidade realizadas para as principais cultivares utilizadas para plantio no sul do país foram descritas em trabalhos com os de Ribeiro e colaboradores em 2004 e 2007, indicando que as condições ambientais influenciam significativamente na capacidade de produção das diferentes cultivares de feijão. Das 10 cultivares estudadas por Ribeiro et al. (2004) durante os anos agrícolas de 2000/01, 2001/02 e 2002/03, as cultivares Guapo Brilhante, Iraí e Macotaço apresentaram baixa previsibilidade de comportamento quanto a suas respostas às variações ambientais, no entanto, os autores indicam que o grau de imprevisibilidade não deve comprometer a indicação de uso das cultivares. A cultivar Iraí apresenta adaptabilidade específica aos

ambientes desfavoráveis (durante o período da safrinha), e mesmo que apresente média de rendimento de grãos superior à média geral, ainda é imprevisível. Entretanto, os autores apontam que era de se esperar que a Iraí apresentasse comportamento mais instável do que as demais cultivares avaliadas, haja vista que a cultivar apresenta hábito de crescimento determinado e ciclo biológico curto, o que contribui para uma maior suscetibilidade ao estresse ambiental (Piana et al., 1999). A cultivar da Embrapa, Guapo Brilhante, já é recomendada há muitos anos para o cultivo no Estado, pois é considerada de grande preferência para o consumo, tem maior volume de comercialização no Rio Grande do Sul e apresenta alta produtividade média de grãos, com adaptação e estabilidade de produção (Ribeiro et al., 2009).

Durante os anos de 1999 e 2004 foram realizados testes com uma nova opção de feijão preto para o Rio Grande do Sul. Em 2006 a Fepagro em ato oficial lançou uma nova cultivar batizada de Fepagro 26, a qual apresentou rendimento de grãos 11,8% superior à média de duas outras cultivares usadas para a comparação (TPS Nobre e o BR IPAGRO 35 Macotaço). A cultivar foi indicada para as condições de solo e clima do Rio Grande do Sul, sendo ainda resistente à doença do mosaico comum e possuindo um ciclo médio de desenvolvimento das sementes até a colheita de 87 a 91 dias.

2. HIPÓTESE

Estudos recentes indicam que o feijão pode ser considerado como uma das mais sensíveis culturas agrícolas de acordo com os níveis críticos de O₃ (AOT40 para a redução da produção de 5%) (Mills et al., 2007). Ainda, dados relativos à produtividade demonstram que perdas de até 19% no rendimento ocorrem quando culturas de feijão são expostas ao O₃ (Feng & Kobayashi, 2009). O Brasil é um país em desenvolvimento, onde a poluição por O₃ tem aumentado nos últimos, mas que ainda sofre com a falta de informações sobre os impactos negativos que a exposição a esse poluente causa nas principais culturas agrícolas do país. Sabendo que, dentro da mesma espécie, diferentes cultivares podem apresentar variações nas respostas bioquímicas e que estas respostas podem estar associadas ao grau dos insultos desencadeados pela presença do O₃, a presente tese visa testar a hipótese de que, dentro das cultivares desenvolvidas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (Fepagro-RS) para o plantio no Rio Grande do Sul, existem diferenças bioquímicas no metabolismo antioxidante, e que estas diferenças podem estar associadas à capacidade de determinadas cultivares resistir ou não aos danos provocados pela exposição ao O₃.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal desta tese foi avaliar os efeitos da exposição controlada ao ozônio sobre as respostas antioxidantes e o balanço do estado redox do tecido foliar de diferentes cultivares de *Phaseolus vulgaris* desenvolvidas para o cultivo no sul do Brasil.

Objetivos específicos

- Avaliar os danos oxidativos e as alterações da capacidade antioxidante de 4 cultivares diferentes de *Phaseolus vulgaris* desenvolvidas pela Fepagro: Irai, Macotaço, Guapo Brilhante e Fepagro 26.
- Comparar os níveis de produção de espécies ativas de oxigênio, utilizando a técnica de marcação *in situ*, em duas cultivares com perfis distintos de resposta antioxidante (Iraí e Fepagro 26).
- Avaliar a atividade e o imunoconteúdo da enzima antioxidante catalase.
- Avaliar como o ozônio modifica o balanço redox no tecido foliar através da análise dos conteúdos de ascorbato e grupamentos tióis totais.
- Avaliar como a exposição ao ozônio afeta o conteúdo dos pigmentos fotossintetizantes, clorofila a e b das cultivares.
- Correlacionar o conteúdo de clorofila com a concentração de proteínas.

4. RESULTADOS

4.1. Artigo I.

Ozone exposure differentially affects oxidative stress parameters in distinct *Phaseolus vulgaris* L. varieties

Fernanda F. Caregnato, Cláudia C. Clebsch, Ricardo F. Rocha, Lucas B. H. Feistauer,
Paulo L. Oliveira, Armando M. Divan Junior, José C. F. Moreira

Periódico: Journal of Plant Interactions 5 (2) : 111-115 (2010)

Publicado

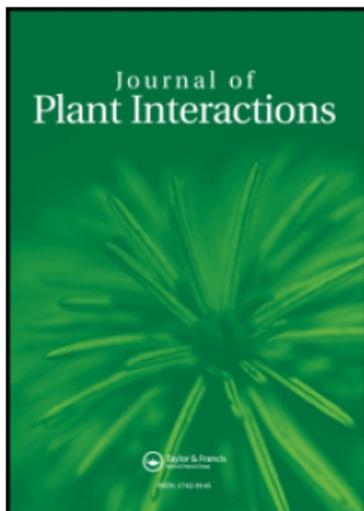
This article was downloaded by: [Caregnato, Fernanda F.]

On: 15 April 2010

Access details: Access Details: [subscription number 921341772]

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Journal of Plant Interactions

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t716100758>

Ozone exposure differentially affects oxidative stress parameters in distinct *Phaseolus vulgaris* L. varieties

Fernanda F. Caregnato ^a; Cláudia C. Clebsch ^{bc}; Ricardo F. Rocha ^a; Lucas B. H. Feistauer ^a; Paulo L. Oliveira ^c; Armando D. Divan Junior ^b; José C. F. Moreira ^a

^a Centro de Estudos em Estresse Oxidativo Departamento de Bioquímica, ^b Centro de Ecologia Instituto de Biociências, ^c Pós-graduação em Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

First published on: 25 March 2010

To cite this Article Caregnato, Fernanda F. , Clebsch, Cláudia C. , Rocha, Ricardo F. , Feistauer, Lucas B. H. , Oliveira, Paulo L. , Divan Junior, Armando D. and Moreira, José C. F. (2010) 'Ozone exposure differentially affects oxidative stress parameters in distinct *Phaseolus vulgaris* L. varieties', Journal of Plant Interactions, 5: 2, 111 – 115, First published on: 25 March 2010 (iFirst)

To link to this Article: DOI: 10.1080/17429140903518455

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/17429140903518455>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

RESEARCH ARTICLE

Ozone exposure differentially affects oxidative stress parameters in distinct *Phaseolus vulgaris* L. varieties

Fernanda F. Caregnato^{a*}, Cláudia C. Clebsch^{b,c}, Ricardo F. Rocha^a, Lucas B.H. Feistauer^a,
Paulo L. Oliveira^c, Armando D. Divan Junior^b and José C.F. Moreira^a

^aCentro de Estudos em Estresse Oxidativo Departamento de Bioquímica; ^bCentro de Ecologia Instituto de Biociências; ^cPós-graduação em Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

(Received 18 September 2009; final version received 30 November 2009)

Different oxidative stress parameters of four Brazilian varieties of *Phaseolus vulgaris* exposed to toxic O₃ concentrations were compared with the well-established bioindicator variety *Pinto 111*. Analysis of catalase (CAT) activity, lipoperoxidation and non-enzymatic antioxidant levels demonstrated that the varieties presented different susceptibilities to O₃ toxicity. Results indicated that *Fepagro 26* and *Guapo Brilhante* increased the levels of lipoperoxidation in response to O₃ while catalase activity was not changed. On the opposite *Iraí*, *Macotaço* and *Pinto 111* presented different pattern of lipoperoxidation and CAT activation indicating a relationship between CAT activation and resistance to lipoperoxidation. Analysis of the total non-enzymatic antioxidant defense levels demonstrated that although O₃ exposure decreased the non-enzymatic antioxidant defense in *Iraí*, lipoperoxidation levels was not enhanced in this variety as observed with *Fepagro 26*. Our results suggest that analysis of the oxidative stress parameters of varieties with known variations of susceptibility to O₃ may provide more precise protocols for early detection of O₃ toxicity.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*; catalase; lipoperoxidation; TRAP assay; bioindication

Introduction

Interest in the pollutant ozone (O₃) and in its toxic effects on living organisms has increased in the last decades as a result of the increase in its ground-level concentration (Altshuler 1987). The damaging effects of O₃ are observed in both animal and plant tissues, representing a potential threat to urban populations and also to crop production and the survival of native species in fragile natural ecosystems (Blomberg et al. 1999; Biswas et al. 2008). Previous studies on plants revealed that both physiological and biological parameters are negatively affected by O₃ exposure (Schraudner et al. 1997; Iriti and Faoro 2008). O₃-treated plants usually present severe biomass reduction and foliar injury (Iglesias et al. 2006; Black et al. 2007). Besides, laboratory experiments showed that chlorophyll and carotenoid leaf content decrease as the O₃ concentration increases. Also, reductions in stomatal conductance, net photosynthetic CO₂ assimilation, and carboxylation efficiency have all been associated with O₃ exposure, compromising the photosynthesis process (Iglesias et al. 2006; Leitao et al. 2008).

Because of its strong oxidizing potential, O₃ is capable of reacting with several biomolecules, including lipids, proteins, and nucleic acids (Halliwell and Gutteridge 2007). Exposure to O₃ may perturb the equilibrium between production and scavenging of reactive oxygen species (ROS) within plant tissues,

and its toxicity is greatly enhanced by the spontaneous hydroxyl radical (-OH) generation in aqueous solution, strongly accelerated by Fe²⁺ and favored at alkaline pH (Pryor 1992; Halliwell and Gutteridge 2007). In cell membranes, polyunsaturated fatty acids represent the primary target for ozone, stimulating lipid peroxidation and impairing membrane fluidity (Pryor et al. 1991). For instance, acute O₃ fumigation of different *Medicago truncatula* accessions resulted in increased lipid peroxidation levels, and highly significant interactions between O₃-induced oxidative damages and lipid peroxidation levels could be observed (Puckette et al. 2007).

Either physiological or biochemical parameters can be employed to address which species are resistant or sensitive to O₃ toxicity, and both can be useful to outline which species are most suitable to be applied as indicators of O₃ exposure (Cano et al. 2007; Torres et al. 2007). Growth reductions and visible symptoms resulting from O₃ toxicity in plants can be both regarded as consequence of physiological and biochemical responses to the stress imposed by this pollutant (Calatayud et al. 2007). Attempts have been made to investigate how early the effects of O₃ exposure on physiological parameters are related to biochemical modifications, which could provide a fast and reliable protocol for detection of O₃-related stress before the appearance of visible symptoms of injury (Ernst and Peterson 1994). In this regard, the

*Corresponding author. Email: ffcaregnato@gmail.com

use of common bean (*Phaseolus vulgaris*) as a bioindicator organism has been suggested as a promising strategy to assess O₃ toxicity in closed and open environments, due to many practical reasons related to management and costs (Feder 1978; Burkey et al. 2005).

In the present work we evaluated different oxidative parameters of four Brazilian varieties of *P. vulgaris* (*Fepagro 26*, *Guapo Brillhante*, *Iraí* and *Macotaço*) exposed to toxic O₃ concentrations, and compared them with the well-known O₃-sensitive common bean variety *Pinto 111* (Arndt et al. 1987). The aim of this study was to compare the sensitivity of these five *P. vulgaris* varieties on the basis of their oxidative responses to acute-ozone exposure. Our results demonstrate that different varieties of *P. vulgaris* present different susceptibilities to O₃ toxicity, and that this probably results from the differential responses of the antioxidant defense system to the exposure to O₃ of each variety. As the search for sensitive plant species for bioindication purposes is imperative, since the signs of biochemical and physiological damage in these plants manifest earlier in time period, our data may be helpful in the further development of bioindication protocols for O₃ toxicity using different varieties of *P. vulgaris*.

Material and methods

Plant material and growing conditions

Seeds of five different varieties of *Phaseolus vulgaris* L. (*Fepagro 26*, *Guapo Brillhante*, *Iraí*, *Macotaço* and *Pinto 111*) were germinated in 2-l pots containing 2:1:1 of coarse vermiculite, washed coarse sand and peat. The plants were grown under controlled conditions in a glasshouse, at an average temperature of 17.9°C, and relative humidity of 67.4%. The plants were irrigated once a day with 100 ml of water. One day before ozone treatment the plants were irrigated with 100 ml of Vitaplan Nutriverde 13-13-15 fertilizer (Nutriplan Products Company, Paraná, Brazil). Eight days after the seeds were planted, 10 *P. vulgaris* seedlings from each variety were selected for the experiment. Five seedlings from each variety were subjected to ozone exposure ($n = 5$), and five seedlings were used as control ($n = 5$).

Ozone exposure

Open top chambers were used to expose *P. vulgaris* seedlings to O₃ according to Heagle et al. (1973). Ozone concentrations at the chambers were calculated as the accumulated hourly ozone exposure over 40 nl l⁻¹ (AOT₄₀) during daylight hours. In this work plants were exposed to an AOT₄₀ of 212 ppb h between 10:00 and 16:00 h during one week. Ozone was generated using an electric discharge ozonizer (ozone generator GHR150B, OZ Engenharia, Porto Alegre, Brazil), and added to ambient air. Control plants were maintained in identical chambers in

which normal air and not ozone was introduced. During the exposition period, all seedlings were irrigated with 5 l of tap water.

At the end of the exposure period, control and treated seedlings were harvested, and the second leaf pair from each plant was sampled. Leaf samples were weighed and immediately stored at -80°C for biochemical analysis.

Lipid peroxidation levels assessment

Lipid peroxidation levels were measured as the amount of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) reaction, as described by Draper and Hadley (1990). Leaf tissue (0.5 g) was homogenized in 2 ml of 15% trichloroacetic acid (v/v). The homogenate was centrifuged at 10,000 g for 10 min. The supernatant was collected and incubated with 0.67% TBA (w/v) for 30 min at 100°C. After cooling, the absorbance was read at 535 nm. An absorption coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was used to calculate the amount of TBARS.

Catalase activity

Extracts for determination of catalase (CAT, EC 1.11.1.6) activity were prepared from 0.5 g of leaf tissue, were homogenized in 2 ml of ice-cold buffer, containing 50 mM phosphate (sodium) buffer (pH 7.0). Homogenates were centrifuged at 5,000 g for 10 min, and the supernatant fraction was used for the assay. Catalase activity was determined by monitoring the rate of decrease in H₂O₂ absorbance at 240 nm, according to the method of Aebi (1984). The specificity of this method is based on a peculiar property of this enzyme: catalase presents a much higher V_{max} value for H₂O₂ than glutathione peroxidase or any other H₂O₂-metabolizing enzyme in mammalian cells. Thus, at the concentration of H₂O₂ used in the assay buffer (10 mM), catalase presents a high rate of H₂O₂ removal, while any other H₂O₂-metabolizing enzyme, including glutathione peroxidase, is completely saturated.

Total radical-trapping antioxidant potential

The non-enzymatic antioxidant cellular defenses were analyzed by the total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) assay, which determines the non-enzymatic antioxidant capacity of the sample, as previously described (Wayner et al. 1985). Briefly, the reaction was initiated by injecting luminol and AAPH (2,2-azobis[2-methylpropionamide]dihydrochloride) – a free radical source that produces peroxy radical at a constant rate – in glycine buffer (0.1 M, pH 8.6), resulting in a steady luminescent emission; 0.5 g of frozen leaf was homogenized in 2 ml of PBS buffer in a potter. The samples were centrifuged, and the supernatant was used to TRAP analysis. 10 µl of diluted (10 ×) homogenized leaf samples were mixed to glycine buffer in the reaction

vial. The decrease in luminescence was monitored in a liquid scintillation counter for 60 min after the addition of the sample homogenates. The area under the curve obtained of the chemiluminescence values were transformed to percentage values and compared to the control.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Differences between control and exposed plants, within each variety, were analyzed using the Student's *t*-test, considering $p < 0.05$ as significant.

Results

According to our results, O₃ exposure led to a 2-fold increase in the lipoperoxidation of *Fepagro 26* seedlings leaves, while in exposed *Guapo Brillhante* seedlings leaf lipoperoxidation was increased by approximately 30% (Figure 1a). The three other varieties (*Iraí*, *Macotaço* and *Pinto 111*) did not present any differences in TBARS levels, indicating these varieties were resistant to lipoperoxidation in response to O₃ treatment.

Catalase (CAT) activity was found to be significantly increased in leaves from three different *P. vulgaris* varieties (*Iraí*, *Macotaço* and *Pinto 111*) when compared to control leaves (Figure 1b). The levels of CAT activity on exposed seedlings were increased, 2.6-fold in *Macotaço*, 2.5-fold in *Iraí*, and 1.9-fold in *Pinto 111* leaves. Interestingly, *Fepagro 26* and *Guapo Brillhante* seedlings did not present sig-

nificant changes on CAT activity in relation to their respective controls when exposed to O₃.

According to our results, leaves from *Fepagro 26*- and *Iraí*-exposed seedlings increased the emission of TRAP chemiluminescence, indicating a decrease in the total non-enzymatic antioxidant defense content induced by O₃ exposure (Figure 1c). Moreover, no significant differences between control and exposed *Macotaço*, *Guapo Brillhante* and *Pinto 111* seedlings on the levels of non-enzymatic antioxidant defenses were observed, indicating that O₃ exposure did not affect the non-enzymatic antioxidant defenses on these three varieties.

Discussion

It is widely known that O₃ is a potent oxidizing agent. Ozone is rapidly degraded into various ROS at the cellular level (Kanofsky and Sima 1995), which may act either as key signaling molecules (at low-physiological concentrations) or as cytotoxic agents, at higher concentrations (Apel and Hirt 2004). The data obtained in this work indicate that the five *P. vulgaris* varieties exposed to an AOT₄₀ of 212 ppb h of O₃ during one week exhibited different strategies to cope with O₃ toxicity. The analysis of the results showed that all five varieties presented altered leaf

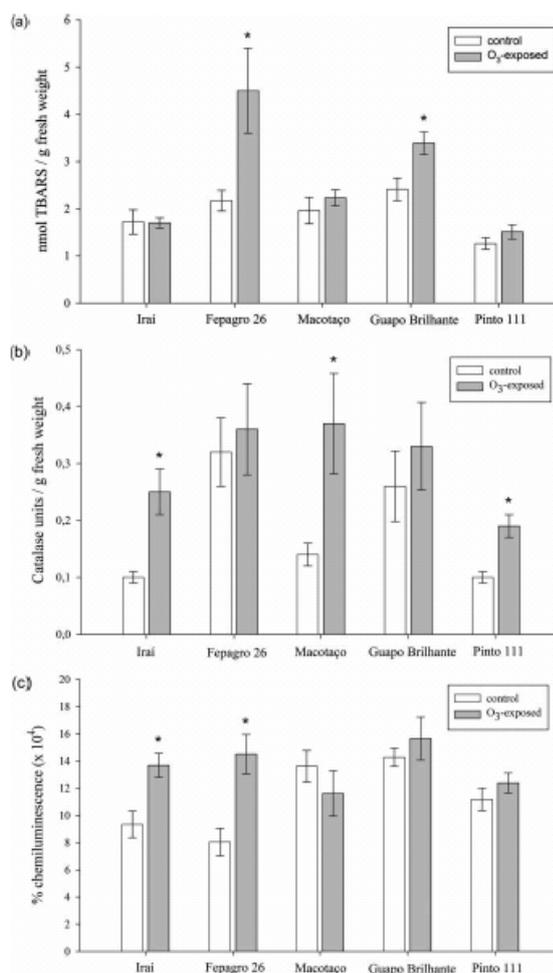


Figure 1. (a) Lipid peroxidation levels (TBARS) on O₃-exposed and control leaves from the five different varieties of *Phaseolus vulgaris*. (b) Catalase activity on O₃-exposed and control leaves from the five different varieties of *P. vulgaris*. (c) Non-enzymatic antioxidant cellular defenses levels on O₃-exposed and control leaves from the five different varieties of *P. vulgaris*. *indicates statistical significant differences at $p < 0.05$ between control and O₃-exposed plants as analyzed by *t*-test. Values represent mean \pm SEM ($n = 5$).

biochemistry as a result of O₃ presence, indicating that it is likely that ROS production in these plants increased in response to O₃ treatment.

Among the several antioxidant enzymes, CAT, together with superoxide dismutase, represents the primary enzymatic defense against ROS. CAT is an intracellular enzyme responsible for the dismutation of H₂O₂ to water and oxygen (Halliwell and Gutteridge 2007). In plant leaves, the major sites of CAT activity are the peroxisomes, where CAT detoxifies the H₂O₂ produced by photorespiration (Willekens et al. 1997). Although it is well known that O₃ exposure to plants leads to ROS production, there are no reports up to date showing that CAT activity is affected by O₃ in these *P. vulgaris* varieties. Here, we observed that *Fepagro 26* and *Guapo Brillhante*

seedlings presented increased levels of leaf lipid peroxidation, indicating that O₃ exposure was harmful to these two plant varieties; besides, CAT activity was not changed in these two varieties. Concomitantly, the other three varieties (*Iraí*, *Macotaço* and *Pinto 111*) presented an opposed pattern of lipoperoxidation and CAT activation by O₃, indicating a relationship between CAT activation and resistance to lipoperoxidation in the response to O₃ exposure. Besides, these results suggest that the differences in the susceptibility to O₃-induced lipoperoxidation observed in different varieties of *P. vulgaris* are probably due to the absence of CAT activation when some varieties are exposed to specific O₃ levels. In cell membranes, polyunsaturated fatty acids represent the primary target of O₃, which stimulate lipid peroxidation and impair the membrane fluidity (Iriti and Faoro 2008). Together with these reports, our data suggest that CAT is also essential for protection against ROS generated by O₃ exposure in plant cells.

TRAP analysis revealed that *Fepagro 26* and *Iraí* O₃-exposed plants decreased the levels of total non-enzymatic antioxidant defenses in leaves, suggesting that O₃ exposition does not only alter the enzymatic antioxidant system (CAT), but it also influences the levels of non-enzymatic antioxidants, such as glutathione (GSH) and ascorbate (AsA). Both AsA and GSH are important non-enzymatic antioxidants

and are ubiquitously distributed in plant cells (Iriti and Faoro 2008). Previous studies revealed that O₃-stressed plants present both increased levels of ROS and decreased concentrations of GSH and AsA, indicating a correlation between O₃-induced ROS production and consumption of non-enzymatic antioxidants in plant cells (Mahalingam et al. 2006). On the other hand, although O₃ exposure decreased the non-enzymatic antioxidant defense in *Iraí* seedlings, O₃ was not able to induce lipoperoxidation in the leaves of this variety, as observed with the *Fepagro 26* variety. It is possible that the resistance to O₃-induced oxidative damage in *Iraí* leaves is due to the enhancement on CAT activity observed in this variety, which reinforces our suggestion that this enzyme plays a major role in the resistance to O₃ toxicity in these bean varieties.

Efforts to identify ozone-sensitive plant species for bioindication purposes have increased in the last years in attempt to quickly assess the presence of hazardous concentrations of this air pollutant. *Pinto 111* is considered to be an O₃-sensitive *P. vulgaris* variety and it is a well-known air pollution bioindicator species (Feder 1978; Arndt et al. 1987). However, the single use of this non-native variety may become expensive when large scale bioindication surveys are planned. Besides, the current assessment of O₃ toxicity is mostly based on large-time exposure and detection of later parameters of toxicity, such as evaluation of plant biomass, foliar injury and

reproductive parameters (Feder 1978; Burkey et al. 2005). Our results suggest that *Fepagro 26* was the most O₃-sensitive variety, based on oxidative parameters. This idea is corroborated by data from Clebsch et al. (in press) who found that *Fepagro 26* instantaneous net assimilation and carboxylation efficiency of photosynthesis was equally reduced by O₃ exposure (unpublished data). The evaluation of biochemical parameters in plants for toxicity assessment is advantageous over other parameters (such as morphological and biomass evaluation), as biochemical modifications take place very early in time scale compared to other important physiological modifications. In this regard, oxidative stress parameters are probably the most rapidly to be affected by most pollutants and xenobiotics, and are also very accessible for laboratory detection. Taking all that into account, we conclude that the use of oxidative parameters of different *P. vulgaris* varieties which present variations in their resistance to O₃ may be a helpful tool for the development of more precise protocols for early detection of O₃ toxicity.

Acknowledgments

Funding support for this project was generously provided by the Brazilian agencies CNPq, CAPES, FAPERGS and PROPESQ-UFRGS.

References

- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Method Enzymol.* 105: 121–126.
- Altshuller AP. 1987. Estimation of the natural background of ozone present at surface rural locations. *JAPCA.* 37:1409–1417.
- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 55:373–399.
- Arndt U, Nobel W, Schweizer B. 1987. *Bioindikatoren: Möglichkeiten Grenzen und neue Erkenntnisse* 3rd ed. Eugen Ulmer Stuttgart.
- Biswas DK, Xu H, Li YG., Liu MZ, Chen YH, Sun JZ. 2008. Assessing the genetic relatedness of higher ozone sensitivity of modern wheat to its wild and cultivated progenitors/relatives. *J Exp Bot.* 59:951–963.
- Black VJ, Stewart CA, Roberts JA, Black CR. 2007. Ozone affects gas exchange growth and reproductive development in *Brassica campestris* (Wisconsin Fast Plants). *New Phytol.* 176:150–163.
- Blomberg A, Mudway IS, Nordenhall C, Hedenstrom H, Kelly FJ, Frew AJ. 1999. Ozone-induced lung function decrements do not correlate with early airway inflammatory or antioxidant responses. *Eur Respir J.* 13:1418–1428.
- Burkey KO, Miller JE, Fiscus EL. 2005. Assessment of ambient ozone effects on vegetation using snap bean as a bioindicator species. *J Environ Qual.* 34:1081–1086.
- Calatayud V, Cervero J, Sanz M J. 2007. Foliar physiological and growth responses of four maple species exposed to ozone. *Water Air Soil Poll.* 185:239–254.

- Cano I, Calatayud V, Cervero J, Sanz MJ. 2007. Ozone effects on three *Sambucus* species. *Environ Monit Assess.* 128:83–91.
- Clebsch CC, Divan Jr. AM, de Oliveira PL, Nicolau M. In press. Physiological effects of ozone exposure on five cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in open top chambers. *Brazilian J. Plant Physiol.*
- Draper HH, Hadley M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Method Enzymol.* 186:421–431.
- Ernst WHO, Peterson PJ. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment. 4. Terrestrial plants. *Ecotoxicology.* 3:180–192.
- Feder WA. 1978. Plants as bioassay systems for monitoring atmospheric pollutants. *Environ Health Persp.* 27:139–147.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. *Free radicals in biology and medicine.* 4th ed. Oxford: Oxford University Press.
- Heagle AS, Body DE, Heck WW. 1973. An open-top chamber to assess the impact of air pollution on plants. *J Environ Qual.* 2:365–368.
- Iglesias DJ, Calatayud A, Barreno E, Primo-Millo E, Talon M. 2006. Responses of citrus plants to ozone: Leaf biochemistry antioxidant mechanisms and lipid peroxidation. *Plant Physiol Bioch.* 44:125–131.
- Iriti M, Faoro F. 2008. Oxidative stress the paradigm of ozone toxicity in plants and animals. *Water Air Soil Poll.* 187:285–301.
- Kanofsky JR, Sima PD. 1995. Singlet oxygen generation from the reaction of ozone with plant leaves. *J Biol Chem.* 270:7850–7852.
- Leitao L, Dizengremel P, Biolley JP. 2008. Foliar CO₂ fixation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) submitted to elevated ozone: Distinct changes in Rubisco and PEPC activities in relation to pigment content. *Ecotox Environ Safe.* 69:531–540.
- Mahalingam R, Jambunathan N, Gunjan SK, Faustin E, Weng H, Ayoubi P. 2006. Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 29:1357–1371.
- Pryor WA. 1992. how far does ozone penetrate into the pulmonary air tissue boundary before it reacts. *Free Radical Biol Med.* 12:83–88.
- Pryor WA, Church DF, Das B. 1991. Aldehydes and hydrogen-peroxide as mediators of ozone toxicity. *Faseb J.* 5:A1156–1156.
- Puckette MC, Weng H, Mahalingam R. 2007. Physiological and biochemical responses to acute ozone-induced oxidative stress in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol Bioch.* 45:70–79.
- Schraudner M, Langebartels C, Sandermann H. 1997. Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environmental pollutant ozone. *Physiol Plantarum.* 100:274–280.
- Torres NL, Cho K, Shibato J, Hirano M, Kubo A, Masuo Y. 2007. Gel-based proteomics reveals potential novel protein markers of ozone stress in leaves of cultivated bean and maize species of Panama. *Electrophoresis.* 28:4369–4381.
- Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Locke S. 1985. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Lett.* 187:33–37.
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Montagu MV. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO J.* 16:4806–4816.

4.2. Artigo II.

Exposure to elevated ozone levels differentially affects the antioxidant capacity and the redox homeostasis of two subtropical *Phaseolus vulgaris* L. varieties

Fernanda F. Caregnato, Rafael C. Bortolin, Armando M. Divan Junior, Paulo L. de Oliveira, José C. F Moreira

Periódico: Chemosphere

Aceito para publicação

Carta de aceite do Editor da Chemosphere

CHEMOSPHERE [Contact us](#) [Help ?](#)  **ELSEVIER**

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#) Username: [ffcaregnato@gmail.com](#) Role: [Author](#) Version: [EES](#)

Submissions with an Editorial Office Decision for Author Fernanda F Caregnato, Ph.D.

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions)

Display 10 results per page.

Action ▲	Manuscript Number ▲▼	Title ▲▼	Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼	Date Final Disposition Set ▲▼	Final Disposition ▲▼
View Submission R.1 Author Response View Decision Letter Send E-mail	CHEM27129	Exposure to elevated ozone levels differentially affects the antioxidant capacity and the redox homeostasis of two subtropical Phaseolus vulgaris L. varieties	18 Sep 2012	30 Apr 2013	Accepted	30 Apr 2013	Accept

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

You should use the free Adobe Acrobat Reader 6 or later for best PDF Viewing results.



View Letter

Close

Date: 29 Apr 2013
To: "Fernanda F Caregnato" ffcaregnato@gmail.com, nandabio@gmail.com
From: "Chemosphere" chem-ee@elsevier.com
Subject: CHEM27129R1 - Editor decision - accepted

Dear Dr. Caregnato,

I am pleased to inform you that the manuscript "Exposure to elevated ozone levels differentially affects the antioxidant capacity and the redox homeostasis of two subtropical Phaseolus vulgaris L. varieties" (Dr. Fernanda F Caregnato) has now been accepted by the editor for publication.

Your manuscript will soon be passed to the production department for further handling. Then you will receive further notice.

Thank you for considering our journal for the publication of your research.

Kind regards,
For the Editor,

Karuna Narasimhan
Journal Manager
Chemosphere

Close

Cover letter

In this study, an attempt was made to investigate the differences on the oxidative-mediated responses of two subtropical *Phaseolus vulgaris* varieties subjected to ozone treatment. Important insights on a range of redox-related modifications on leaf cells and their association with a higher ozone tolerance were achieved by different assays. The present study is a result of an ongoing project, and these findings provide a better understanding of the biochemical mechanisms involved ozone toxicity on two bean varieties that were specially developed for southern Brazil agriculture. The information brought by the results is also significant to better characterize the biochemical traits that are behind the tolerance/sensitivity to ozone, and indicate that the differences on ozone-mediated responses can be assessed to identify different degrees of susceptibility to ozone, allowing us to select varieties and species that better suits each environment.

Highlights

1. Higher endogenous levels of ROS protect leaves from the elevated ozone exposure.
2. Insufficient leaf antioxidant capacity is related to increased ozone sensitivity.
3. Early ozone-mediated ROS accumulation diminishes chlorophyll and protein content.
4. Ozone sensitivity depends on the variety potential to keep the redox homeostasis.

Exposure to elevated ozone levels differentially affects the antioxidant capacity and the redox homeostasis of two subtropical *Phaseolus vulgaris* L. varieties

Fernanda Freitas Caregnato ^a, Rafael Calixto Bortolin ^a,

Armando Molina Divan Junior ^b, José Cláudio Fonseca Moreira ^a

^a Centro de Estudos em Estresse Oxidativo – Departamento de Bioquímica - Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Address: Av. Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, CEP 90035-003,
Porto Alegre, RS, Brasil

^b Laboratório de Bioindicação Vegetal - Centro de Ecologia – Instituto de Biociências
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Address: Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43411, CEP 91501-970,
Porto Alegre, RS, Brasil

Corresponding author:

Fernanda Freitas Caregnato

e-mail: ffcaregnato@gmail.com

phone: +55 51 33085578

fax: +55 51 33085540

Abstract: Ozone (O₃) has become one of the most toxic air pollutants to plants worldwide. However, investigations on O₃ impacts on crops health and productivity in South America countries are still scarce. The present study analyzed the differences on the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system in foliar tissue of two subtropical *Phaseolus vulgaris* varieties exposed to high O₃ concentration. Both varieties were negatively impacted by the pollutant, but the responses between each variety were quite distinct. Results revealed that Irai has higher constitutive levels of reactive oxygen species (ROS) and ascorbate (AsA) concentration, but lower total thiol levels and catalase immunocontent. In this variety catalase protein concentration was increased after O₃ exposure, indicating a better cellular capacity to reduce hydrogen peroxide. On the opposite, Fepagro 26-exposed plants increased ROS generation and AsA concentration, but had the levels of total thiol content and catalase protein unchanged. Furthermore, O₃ treatment reduced the levels of chlorophyll *a* and *b*, and the relationship analysis between the chlorophyll ratio (*a/b*) and protein concentration were positively correlated indicating that photosynthetic apparatus is compromised, and thus probably is the biomass acquisition on Fepagro 26. Differently, O₃ treatment of Irai did not affect chlorophyll *a* and *b* content, and loss on the protein content was lower. Altogether, these data suggest that early accumulation of ROS on Fepagro 26 are associated with an insufficient leaf antioxidant capacity, which leads to cell structure disruption and impairs the photosynthesis. Irai seems to be more tolerant to O₃ toxic effects than Fepagro 26, and the observed differences on O₃ sensitivity between the two varieties are apparently based on constitutive differences involved in the maintenance of intracellular redox homeostasis.

Keywords: antioxidant capacity; ozone; *Phaseolus vulgaris*; reactive oxygen species; redox balance

1. Introduction

Tropospheric ozone (O₃) is a widespread secondary air pollutant which is produced through the reactions between primary pollutants (nitric oxides, sulphur oxides, carbon oxides and hydrocarbons), and sunlight (Finlayson et al., 1997). Although O₃ is produced on areas with intense primary pollution, meteorological and topographic conditions can move its precursors from these areas towards less polluted ones, such as rural zones, with detrimental effects on natural and cultivated plant species (Crutzen and Lelieveld, 2001). Over the past few years, the ground-level O₃ concentrations has become a major threat to vegetation at a global scale, and experimental studies have confirmed that exposure to elevated O₃ levels results in plant damage specially because it can suppress photosynthesis, accelerate senescence, decrease growth and reduce crop yields (Agrawal et al., 2003; Booker et al., 2009).

The threat imposed by O₃ has brought important implications for agriculture across many parts of the world and a large amount of data indicate that substantial yield losses of important crops, such as wheat, rice and soybean, arise under current O₃ concentrations (Feng et al., 2003; Fishman et al., 2010; Sarkar and Agrawal, 2010). Predictive models indicate that global surface O₃ levels are expected to rise significantly throughout the 21st century. According to Vingarzan (2004), modeling studies using the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 2001) emission scenarios predict that the average global surface O₃ concentration is expect to be in the range of 35–48 ppb by 2040, 38–71 ppb by 2060, 41–87 by 2080 and 42–84 ppb by 2100. Such increases exceed the internationally accepted environmental criteria and can have severe implications on human health, crops and vegetation.

Numerous studies report that elevated O₃ concentrations often results in reduced photosynthesis and whole-plant growth, decreased stomatal conductance, altered antioxidant system, and accelerated senescence (Ashmore, 2005; Calatayud et al., 2007; Calatayud and Barreno, 2004; Black et al., 2007; Feng et al., 2008; Kobayashi, 1995). The effects of O₃ depend on a number of events, starting with the gas uptake through leaf stomata. In the sub-stomatal chamber, O₃ can directly react with plasma membrane through “ozonolysis” stimulating lipid peroxidation and impairing membrane fluidity, or it can be spontaneously converted into reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radical (O₂^{·-}), hydroxyl radical (OH[·]) and hydrogen peroxide (H₂O₂) (Halliwell and Gutteridge, 2007; Kanofsky and Sima, 1995). Increased ROS levels may create a pro-oxidant environment inside the cell, resulting in proteins modification, both in their structure and activity (Iriti and Faoro, 2008). In particular, O₃ and the derived ROS can react with the exposed proteins sulphhydryl groups presented on the amino acids residues, mainly cysteine, tryptophan, tyrosine, methionine and histidine, which might contribute directly to lower the overall plant vigor (Foyer and Noctor, 2008; Mudd et al., 1969). Furthermore, photosynthetic capacity and photosynthetic efficiency are decreased under high O₃ levels, which has greatly contribute to yield loss in U.S. soybean (*Glycine max*) cultivars that are particularly sensitive to O₃ (Betzberger et al., 2012). Some studies report that O₃-mediated decline in photosynthetic pigments, chlorophylls *a* and *b*, arises as a consequence of the oxidative destruction of these molecules (Leitao et al., 2008). Changes on the levels of photosynthetic pigments modify the chlorophyll fluorescence parameters, specifically affecting the photosystem II (PSII) activity (Flowers et al., 2007).

Plant cells possess an array of antioxidants (both enzymatic and non-enzymatic) to reduce the stress elicited by the ROS. Enzymatic scavenging mechanisms in plants

include important antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), and catalase (CAT). Among these enzymes, catalase plays an important role in keeping the levels of H₂O₂ under control, and some authors suggest that catalase functions as a cellular sink for H₂O₂ (Willekens et al., 1997). In contrast to superoxide and hydroxyl radical, H₂O₂ is relatively stable, and thus is capable to function as a molecular signal for cell-to-cell communication (Desikan, 2001; Vandenabeele et al., 2004). Thus, sustained increases in H₂O₂ may provoke transcriptional responses that include expression of hypersensitive response and programmed cell death genes (Vandenabeele et al., 2003). In guard cells, for example, H₂O₂ participates in the activation of membrane-localized anion channels that lead to stomatal closure (Schroeder et al., 2001; Zhang and Klessig, 2001). The importance of catalase has long been discussed and experiments performed with catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) showed that transgenic plants present severe leaf bleaching, specifically under conditions that H₂O₂ production is favored through photorespiration (Kendall et al., 1983).

Non-enzymatic ROS scavengers include a number of compounds with high reducing power, such as the ascorbic acid and glutathione. According to several authors, the apoplastic AsA is the first line of defense against O₃-derived ROS, and O₃ sensitivity can be generally correlated to the AsA redox status of the leaf tissue (Castagna and Ranieri, 2009; Kanofsky and Sima, 1995; Ranieri et al., 1999). It has been reported that AsA levels are increased in plants challenged with O₃, suggesting that AsA plays an important role in providing resistance to oxidative stress imposed by O₃ (Menser, 1964; Sharma et al., 1997). However, some authors have recently reported that elevated apoplastic AsA levels are apparently not sufficient to explain O₃ tolerance (D'Haese et al., 2005; Dizengremel et al., 2008). Although the resulting increment on

AsA levels may be a predictor of resistance to O₃ exposure (Eltayeb et al., 2006), other antioxidant molecules, and an improved cellular ability to regenerate these antioxidants could be more relevant to protect the cells against O₃ toxic effects. In plants, the physiological significance of AsA is strictly dependent on total thiol groups redox state, especially the glutathione (GSH) molecule which is the predominant non-protein thiol. Thus, the AsA-GSH system (also known as Halliwell – Asada cycle) is responsible for the maintenance of the cellular the redox homeostasis (Horemans et al., 2000; Smirnov, 1996). In addition to GSH, thiol-redox proteins also play a important role as antioxidants and, together with GSH, are responsible for keeping the cellular redox balance (Foyer and Noctor, 2008). Analysis of total thiol content may thus be important for understanding how O₃-derived ROS changes the thiol-redox state of cellular components, such as enzymes activity modulation trough redox modifications of active site residues required for catalysis and/or ligand binding, oligomerization (Paget and Buttner, 2003).

Most studies and evidences that assess the harmful effects of O₃ on crop plants health and productivity are currently performed in countries which are experiencing a rapid increase in population and industrialization levels, such as China and India (Sarkar et al., 2010; Wang et al., 2012). Besides that, extensive studies have been conducted on the United States that helped to improve the scientists' knowledge about the biochemical, genetics and molecular aspects ruling O₃ toxicity in native and agronomic plants (Betzelberger et al., 2010; Booker et al., 2009; Krupa et al., 2000).

However, O₃ trend data for the Southern Hemisphere is sparse, and regional characterization is still necessary to determine the levels of O₃ observed on the industrialized southern countries (Vingarzan, 2004). Furthermore, investigations and evidences with respect to vegetation damage and human health effects of O₃ in South

America countries are scarce. In Brazil, relative little information concerning the levels and the impacts of O₃ pollution on plants health and crop productivity are available and, therefore, it should be some of the urgent research priorities for the future of the country. Over the past few decades, Brazilian commodities production has expanded and the country has observed a rapid rise in exports of crops, like soybean and wheat. Crop area has expanded rapidly and is expected to continue to do so, shifting the crop cultivation to new regions of the country. This scenario has brought an increment on the production of the major cultivated crops.

According to the US DA (2010), Brazil is currently the largest world bean producer and consumer. The National Food Supply Agency (CONAB) had forecasted Brazilian dry bean production for 2010/11 at 3.45 million metric tons, up 5% when compared to 2009, with a cultivated area estimated at 3.6 million hectares, up 1% percent from 2009. Yield was forecasted at 0.965 tons/hectare, 6% greater than 2009 and well above the five-year average of 0.857 tons/hectare. Dry beans are cultivated in nearly every Brazilian state, but most of the production is concentrated in 8 states, which are responsible for approximately 80% of Brazil's production. Family farmers produce about 70% of total bean production.

Feng and Kobayashi (2009) conducted a quantitative meta-analysis study to assess the effects of rising O₃ concentrations on yield and yield components of major food crops (potato, barley, wheat, rice, bean and soybean) and observed that bean was the crop with the largest yield loss (19%). The authors indicate that bean is very sensitive to O₃, which is in agreement with the study of Mills and colleagues (2007), who ranked bean as the most sensitive among agricultural crops according to O₃ critical levels (AOT40 for 5% yield reduction).

Keeping in view that O₃ levels are increasing worldwide and Brazil is a developing country that still suffer from a general lack of information concerning the negative impacts of O₃ over the major agricultural crops, the aim of the present work was to analyze the effects of O₃ exposure on the redox homeostasis balance on leaf tissue of two Brazilian bean varieties (Fepagro 26 and Irai). These varieties were developed by the Founding State of Agricultural Research of Rio Grande do Sul (FEPAGRO-RS) and are exclusively cultivated in the southern states of Brazil. In spite of that, no information describing the physiology or the chemical profile of these varieties was done before. Thus, our laboratory decided to start the investigation on how O₃ affects the physiological and the biochemical aspects of these varieties (information on physiological aspects see Clebsch et al., 2009). In a previous analysis we observed that Fepagro 26 and Irai have very different oxidative responses to O₃, suggesting that these varieties might present biochemical constitutive differences regarding their redox status and these differences could be associated with a higher tolerance or susceptibility to O₃ stress (see Caregnato et al., 2010). To further test whether the constitutive antioxidant biochemical differences between the varieties could account for their distinct responses to O₃ stress we decided to assess the following biochemical traits on the foliar tissue: (1) changes in the levels of ROS, (2) modifications on the imunocontent of the antioxidant enzyme catalase, (3) concentrations of non-enzymatic antioxidant (ascorbate and total thiol groups), (4) and changes on the levels of the photosynthetic pigments chlorophyll *a* and *b*. In addition, *in situ* histochemical techniques were used to determine the type of ROS that was prevalently being produced during O₃ exposure.

2. Material and Methods

2.1. Plant material and growing conditions

Seeds from two different varieties of *Phaseolus vulgaris* L. (Fepagro 26 and Irai) developed by FEPAGRO-RS were germinated in 2 L pots containing 2:1:1 of coarse vermiculite, washed coarse sand and peat. The plants were grown under controlled conditions in a glasshouse, at an average temperature of 17.7°C, and relative humidity of 88.6%. The plants were irrigated once a day with 100 ml of water. One day before O₃ treatment each plant was irrigated with 100 ml of Vitaplan Nutriverde 13-13-15 fertilizer (Nutriplan Products Company, Parana, Brazil). Eight days after the seeds were planted, 12 *P. vulgaris* seedlings from each variety were selected for the experiment. Six seedlings from each variety were subjected to O₃ exposure (n = 6), and six seedlings were used as control (n = 6).

2.2. Ozone exposure

Open top chambers were used for O₃ exposure experiments as previously reported by Caregnato et al. (2010) and Clebsch et al. (2009). Ozone fumigation was done using an ozonizer (ozone generator GHR150B, OZ Engenharia, Porto Alegre, Brazil) equipped with three O₃ production cells (corona effect) with a nominal production of 85 mg.h⁻¹ each. Fumigation was performed daily from 10:00 to 16:00 h during one week. Control plants were maintained in identical chambers in which normal air was introduced. Ozone monitoring was done on a 6 h day⁻¹ basis (10:00–16:00 h) because this period is considered to be the peak of O₃ production found under ambient conditions. Ozone concentration inside the chambers was monitored by the iodometric method (APHA, 1992). Gases were sampled in a fresh washer of the impinger type, containing 75 mL of

absorbent solution of KI 2% with the help of a gas sampler (LaMotte, model BD, Chestertown, USA) at a flow of 1.5 L min⁻¹. The sampling point was located in the central position of the chambers in relation to their diameters, and at the height of the unifoliated primary leaves. The O₃ doses fumigated in each chamber (control and O₃) were calculated as the accumulated hourly O₃ exposure over a threshold concentration of 40 ppb (AOT₄₀) during daylight hours (10:00–16:00 h). Exposure index for O₃, i.e. AOT₄₀, was calculated and the mean value of O₃ concentration obtained on our experiments was 122.6 ppb h. During the experiment period each seedling was irrigated with 200 mL of tap water every day. At the end of the fumigation period, control and treated seedlings were harvested and the second leaf pair from each plant was sampled. Leaf samples were weighed and immediately stored at – 80°C for biochemical analysis. The O₃ exposure experiments were performed on three independent sets, and the results presented are representative from one of the three biological replications. Results are presented as the average values from 6 seedlings for each treatment (control and O₃).

2.3. Determination of reactive oxygen species levels

About 50 mg of frozen tissue was used for the ROS level measurement assay. The assay was performed as described by Myhre et al. (2003). Leaf tissue was homogenized in 1 mL of Tris HCl 10 mM buffer (pH 7.2), and centrifuged at 14 000 g at 4°C for 5 minutes. About 100 µL of this homogenate was mixed with 100 µL of 20 µM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA) and incubated in the dark for 10 minutes at room temperature. An aliquot from these homogenate was used to measure the sample fluorescence in fluorometer

equipment (SpectraMax M5 model; Molecular Device, CA, USA). The results are expressed as relative fluorescence units (RFU) per milligram of protein.

2.4. Histochemical staining

In situ histochemical assays were conducted for determining the nature of ROS as described by Thordal-Christensen et al. (1997) and Fryer et al. (2002) followed by minor modifications.

Superoxide radical detection: For detection of superoxide radical, 5 discs (diameter of 6.7 mm each) from all seedlings (O_3 and control) and from different leaves were incubated with 10 mM phosphate-buffered saline (pH 6.4) containing 0.01% nitroblue tetrazolium (NBT) during 60 minutes in the dark. Disc samples were illuminated for 2 h, when the reaction of NBT with superoxide anion stabilizes and the result appears as dark blue spots, which is a characteristic of blue formazan precipitates generation.

Hydrogen peroxide detection: To detect the H_2O_2 molecule, 5 leaf discs (diameter of 6.7 mm each) from all seedlings (O_3 and control) were immersed in diaminobenzidine (DAB) solution of 1 mg/mL (pH 3.8) during 8 hours. As negative control, DAB solution was supplemented with 10 mM ascorbic acid, an antioxidant that prevents H_2O_2 generation.

Before visualization, disc samples from both NBT and DAB staining assays were bleached by immersing the samples in boiling solution of ethanol (96%) – glycerin (9:1 v/v) for 5 minutes to remove the chlorophyll. The destained discs were placed on a microscope slide and observed under a microscope (Nikon Eclipse TE300, Nikon,

Melville, NU, USA), with a digital camera (Nikon Digital Camera DMX1200, Nikon, Melville, NU, USA) attached to it that was used to capture the images.

2.5. Determination of ascorbate concentration

Ascorbate concentration was assessed according to Keller and Schwager (1977). About 50 mg of frozen leaf tissue was homogenized in 1 mL of aqueous solution of EDTA- Na_2 (0.07%) and oxalic acid (0.5%). Samples were centrifuged at 14 000 g during 30 minutes at 4°C. An aliquot of supernatant was add 0.02% of 2,6-Dichloroindophenol Sodium Salt Dihydrate (DCPiP) (1:1v/v). Samples were divided in two groups; to one of the groups were added 20 μL of ascorbic acid (1%). This group was considered the positive control. The absorbance of each sample was measured at $\lambda = 520 \text{ nm}$ in a micro-plate reader and the difference in the absorbance between the two groups (group without ascorbic acid – group with ascorbic acid) were used to quantify the total amount of ascorbate. Values are expressed as mg of ascorbate per milligram of protein.

2.6. Total reduced thiol content

Leaf samples were analyzed for their content of total reduced thiol, which is considered an estimation of intracellular redox balance alterations. As previously described by Ellman (1959) , an aliquot of the sample (30 – 80 μg protein) was diluted in 10 mM phosphate-buffered saline (pH 7.4) Then, 0.01 M 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) dissolved in ethanol, was added. After 60 minutes an intense yellow color was developed and samples were read in a spectrophotometer at 412 nm. Values are expressed as nmol of thiol groups (SH) per milligram of protein.

2.7. Catalase immunoblotting

To perform immunoblot experiments leaf samples were homogenized in Laemmli-sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol) and equal amounts of protein (60 µg/lane) were fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electroblotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Protein loading and electroblotting efficiency were verified through Ponceau S staining, and the membrane was blocked in Tween-Tris buffered saline (TTBS:100mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.9% NaCl and 0.1% Tween-20) containing 0.5% albumin and incubated overnight with the primary antibody to be tested. The membrane was washed and incubated with Horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit IgG antibodies, and the immunoreactivity was detected by enhanced chemiluminescence using the West Pico detection Kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Densitometric analysis of the X-ray films exposed to the chemiluminescence was performed with the IMAGE J® software. Blots were developed to be linear in the range used for densitometry. All results are expressed as relative CAT units, and Comassie-blue staining was used as the gel internal loading control.

2.8. Chlorophyll content

Chlorophyll *a* and *b* content was measured by UV-VIS Spectroscopy. Ten foliar discs of 6.7 mm in diameter were incubated in 10 mL of ethanol 96% during 1 week in darkness. The absorbance of leaf pigment extracted in the ethanol was measured at 649 and 665 nm. Levels of chlorophyll *a* and *b*, total chlorophylls (*a+b*) and chlorophyll ratio (*a/b*) were calculated according to extinction coefficients and equations reported by Lichtenthaler (1987). Data from the absorbance were averaged and chlorophyll

content was expressed on basis of final volume of ethanol and the dry weight of leaf discs after the period of incubation. Results are expressed as mg of chlorophyll per gram of dry weight.

2.9. Protein content

Protein content was measured spectrophotometrically at 595 nm by the protein–dye binding method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

2.10. Statistical analysis

Data shown in figures and tables are means \pm SEM for each variety. Differences between the varieties were analyzed employing two-way analysis of variance (ANOVA) and the Student t-test. Statistically significant differences found between controls and ozone exposed on the ANOVA test were assessed via Bonferroni post-hoc test, with a significant level set at $p < 0.05$. The relationship between chlorophyll *a/b* ratio and protein concentration in leaf tissue were assessed using linear bivariate regression analysis within GraphPad software version 5.01 (Graphpad Software Inc 2007).

3. Results

3.1. Reactive oxygen species generation and histochemical staining

The two *P. vulgaris* varieties showed different patterns of ROS production in leaf tissue when growing under the presence of O₃. Fepagro 26 exposed seedlings presented lower constitutive levels of ROS content, but significantly increased the foliar

ROS concentration in response to O₃ treatment. After the exposure period of 1 week, ROS levels on Fepagro 26 leaves were 1.8-fold higher than control plants. Conversely, no significant changes on Irai leaf ROS levels could be observed after the same exposure time period (Fig. 1). However, the endogenous levels of ROS on Irai leaves were 1.2-times higher than Fepagro 26 ($p < 0.0001$).

To assess the type of ROS that was prevalently being produced during the O₃ exposition we used two *in situ* histochemical techniques. Diaminobenzidine (DAB) reacts with H₂O₂ to form reddish-brown deposits that can be examined with a light microscope. Image analyses showed that Fepagro 26 fumigated leaves present more intense spots for DAB staining than control leaves (Fig. 2, arrows). On the other hand, when analyzing Irai leaves no substantial changes in the amount of DAB precipitates formed during the same time period could be noticed. When comparing Irai control and exposed leaves the same pattern of brown spots intensity could be observed. To ensure that the results we were seeing were really from the reaction between H₂O₂ and DAB, we tested the samples with a positive control. Ascorbate (10 mM) was added to the DAB staining solution and the incubation of leaf discs was performed. Almost all DAB deposits were completely reduced on these samples, indicating that DAB staining was actually due to local differences in H₂O₂ generation (data not shown).

The production of superoxide radical was imaged in leaves infiltrated with NBT, which specifically reacts with superoxide anions resulting in purple formazan deposits, which can easily be visualized in the microscopy. Within 1 week of treatment visible heavier staining spots were observed on Fepagro 26 exposed leaves, indicating that superoxide radical production was higher on these leaves than control (Fig. 2, arrows). When comparing exposed and non-exposed Irai leaves, we observed that generation of purple formazan precipitates occurred on both groups, and when comparing exposed

Irai and Fepagro 26 leaves we could notice that a lighter staining was found on Irai leaves.

3.2. *Non-enzymatic antioxidant defense system*

3.2.1. *Ascorbate levels*

Ozone sensitivity is generally correlated with the oxidative status of AsA on leaf tissue, and the antioxidant role played by AsA molecule is considered to be strictly dependent on the cell ability to maintain it in a reduced state (Castagna and Ranieri, 2009; Conklin and Barth, 2004). Comparing the AsA levels of Irai and Fepagro 26 leaves it was evident that the endogenous levels of AsA on Fepagro 26 are significantly lower than Irai ($p < 0.0001$), in fact AsA concentration of Fepagro 26 are 1.26 times lower than Irai (Fig. 3a). After 1 week of O₃ treatment the AsA pool in Fepagro 26 leaves was changed, and a significant increase of nearly 50% on the AsA concentration was recorded on exposed Fepagro 26 plants. On the opposite, AsA levels on Irai leaves were not changed in response to O₃ exposure (Fig. 3a).

3.2.2. *Total reduced thiol content*

The physiological significance of thiol metabolism in plants is specially related to sulfur assimilation and antioxidant defense. Here we could notice that significant differences on the physiological levels of total reduced thiol content when comparing the two *P. vulgaris* varieties. Leaves from Fepagro 26 had a baseline level of total reduced thiol content 4.2-fold higher than Irai ($p = 0.0007$). After 1 week of O₃

fumigation no significant changes on the levels of total thiol concentration were observed neither for Fepagro 26 nor Irai leaves (Fig. 3b).

3.3. Catalase immunoblotting analysis

To better understand how O₃ exposure was affecting the leaves enzymatic antioxidant apparatus at the level of enzyme amount, we decided to perform a quantitative analysis of the catalase enzyme. As previously reported, the two varieties have a very different response of CAT activation when exposed to O₃ (Caregnato et al., 2010). Here we demonstrated that the differences observed on CAT activity are based on the amount of CAT protein. Irai leaves showed a significant lower trend on the baseline CAT immunocontent than Fepagro 26 ($p = 0.02$). Catalase immunocontent on Fepagro 26 leaf tissue was 1.66 times higher than Irai leaves. But differently from Fepagro 26, Irai seedlings challenged with O₃ were capable of increasing the amount of CAT protein. Catalase immunocontent on treated Irai plants were found to be 2 times higher when compared to control Irai plants ($p = 0.01$) (Fig. 4).

3.4. Photosynthetic pigments content

The levels of photosynthetic pigments were differently affected by O₃ exposure on each *P. vulgaris* variety (table 1). As suggested by the loss of leaves green color, a significant declining trend under O₃ exposure was observed in both chlorophyll *a* and *b* (53% and 40%, respectively) on O₃ fumigated Fepagro 26 leaves. Total chlorophyll (Chl *a*+Chl *b*) content was also affected by O₃, and a significant reduction of approximately 50% of total Chl was recorded in the O₃-exposed Fepagro 26. Furthermore, a significant

decrease was also observed on the Chl *a/b* ratio, which indicates that Chl *a* levels was probably more affected by the O₃ treatment than Chl *b*. On the opposite, no modifications in the levels of the foliar pigmentation of O₃-treated Irai leaves could be observed, indicating that chlorophyll pigments levels were not affected when this cultivar is growing under the presence of elevated O₃ concentration. In this variety neither Chl *a* nor Chl *b* amounts were found to be modified by O₃ treatment, and thus no differences could be assessed either on total Chl content or on the Chl *a/b* ratio.

3.5. Relationship between chlorophyll and protein concentration

Levels of total protein content were significantly decreased in response to O₃ treatment in both varieties. However, the reduction on protein content was significantly higher in Fepagro 26 (approximately 50%), when compared to total protein content loss found on Irai plants (5.6%) ($p < 0.05$) (Table 1). In order to assess if there was a significant relationship between the chlorophyll content and total protein concentration we performed a linear regression analysis. To the test this relationship we choose to use the ratio of photosynthetic pigments, chlorophyll *a* and *b*, once their concentration are tightly regulated in the plant photosynthesis apparatus and their proportional changes may affect the entire photosynthesis process. We found a significant positive linear relationship between the protein content and Chl *a/b* ratio only for Fepagro 26 seedlings (Fig.5a). Regression analysis results indicate thus that a decrease in the Chl *a/b* ratio is significantly associated with a decrease in total protein concentration when Fepagro 26 plants grown under the presence of toxic O₃ concentrations ($r^2 = 0.87$; $p < 0.0005$; $F = 49.63$). Since no differences on chlorophyll *a* and *b* content could be found on

fumigated Irai leaves, no association between this parameter and protein content were observed ($r^2 = 0.48$; $p = 0.11$; $F = 3.07$) (Fig. 5b).

4. Discussion

The present study reveals that the antioxidant capacity on leaf tissue of two Brazilian *P. vulgaris* varieties exposed to high O₃ concentration during the period of 1 week was significantly affected. Our results showed that integrated biochemical mechanisms related to a better capacity to counterbalance the O₃-mediated oxidative process are behind the differences on the O₃-susceptibility observed between the two studied bean varieties. Not differently from the most up-to-date studies we demonstrated here that the detrimental effects of O₃ on plant metabolism occur due to its high oxidative power and ability to be converted into different ROS in the leaf internal space. However, as plant species possess a wide range of responses to cope with O₃-induced oxidative stress and, as suggested by other experiments with different crops worldwide, variation on these responses can be attributed to innate and inducible antioxidant biochemical features that are distinct among plant species and varieties (Burkey et al., 2005; Matyssek et al., 2008; Scebba et al., 2006; Tosti et al., 2006). Differential sensitivity to O₃ exhibited by different varieties within a plant species has been proven to be especially dependent on the efficiency of ROS scavenging system to maintain the cellular redox steady-state of leaf tissue (Castagna and Ranieri, 2009; Giacomo et al., 2010; Puckette et al., 2007).

The evaluation of ROS levels through DCF analysis revealed that Irai variety present higher constitutive levels of ROS than Fepagro 26 (Fig. 1). Ozone exposure did not alter the ROS generation on Irai leaves, but significantly increased the ROS

production in Fepagro 26 plants. Using histochemical *in situ* localization techniques we could detect and visualize the two major ROS, superoxide radical and H₂O₂, on leaf tissue from both varieties (Fig. 2). On Fepagro 26 leaf samples we observed that both superoxide radical and H₂O₂ accounted for the significant enhancement on ROS levels after O₃ treatment. The strong staining pattern observed after the reaction of superoxide radical with NBT on O₃-exposed Fepagro 26 leaves suggest that the levels of this ROS was pronouncedly increased on this bean variety. With the *in situ* localization techniques we were also able to notice that Irai control leaves showed stronger stained spots for DAB reaction suggesting that endogenous levels of H₂O₂ on this variety are constitutively higher than those levels found on Fepagro 26 control leaves (Fig. 2). Previous studies have demonstrated that distinct patterns of ROS accumulation occurs in differentially O₃-sensitive plants as shown for tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Bel W3) and clover plants (*Trifolium repens* L.) (Pasqualini et al., 2003; Scebba et al., 2006). In sensitive varieties both superoxide radical and H₂O₂ accumulate in leaf margins following O₃ exposure, and the sites of ROS generation (particularly H₂O₂) has been correlated with the appearance of leaf injury signals, such as necrotic lesions (Di Baccio et al., 2008; for review see Castagna and Ranieri, 2009). Furthermore, Guidi and colleagues (2010) when comparing the responses of two *P. vulgaris* cultivars to acute O₃ treatment (165 nL L⁻¹) showed that after 3 h of exposure the levels of H₂O₂ accumulated to a markedly greater extent in the leaves of the sensitive cultivar Cannellino than in tolerant Top Crop, whereas the H₂O₂ deposits were only become detectable for Top Crop after 24 h from the beginning of the fumigation treatment. In the O₃-sensitive cultivar Cannellino this early accumulation of H₂O₂ was found to be correlated to the almost complete disruption of cell structure, and irreversible damages to the photosynthetic apparatus. In addition, interesting inverse correlation between the

levels of ROS in control and O₃ sensitivity plants were reported for 38 different accessions of *Medicago truncatula* fumigated with 300 nmol mol⁻¹ of O₃ for 6 hours. Accessions with higher levels of endogenous ROS were more tolerant compared to accessions with lower ROS levels, suggesting that plants with elevated ROS levels may be ‘intrinsically primed’ to tolerate extreme oxidative stress, a fact that strengthens the role of ROS as important signaling molecules during normal growth and stress conditions (Puckette et al., 2007).

Nevertheless, the degree of sensitivity of a plant to O₃ not only depends on the quantity of gaseous molecules entering the leaf and that are subsequently converted to ROS. Over the past years, several studies have pointed out that the main level of O₃ defense relies both on the existing content of cellular antioxidants (e.g. ascorbate and glutathione) and the intensity of the detoxifying pathways that are responsible for regenerating these metabolites (Calatayud et al., 2001; Dizengremel et al., 2008a, 2009b; Luwe et al., 1993). The protective role of AsA as ROS-scavenger was first supported by the enhanced O₃-sensitivity shown by *Arabidopsis thaliana* mutants deficient in AsA synthesis (Conklin et al., 1996). Even so, the relationship between O₃ sensitivity and apoplastic AsA concentration remains controversial and some studies have postulated that elevated apoplastic AsA levels cannot always be sufficient to render a plant tolerant to O₃ (Di Baccio et al., 2008; D’Haese et al., 2005; Ranieri et al., 1999). Here we found that Irai plants have higher constitutive AsA levels than Fepagro 26, and O₃ exposure does not modify the levels of this antioxidant molecule on Irai leaf tissue (Fig. 3a). Although it is well-known that apoplastic AsA is quickly oxidized when in presence of O₃ and ROS, our results may indicate that Irai plants are capable to maintain a higher AsA-mediated antioxidant capacity, a feature that is probably related to the ability of the foliar cells to keep both extra and intracellular supply of reduced

AsA at levels that are effective enough to detoxify ROS generated under the presence of O₃. Conversely, Fepagro 26 baseline levels of AsA were significantly lower, and when this variety was fumigated with O₃ the levels of foliar AsA were significantly enhanced. These findings suggest that O₃ exposure of Fepagro 26 plants might stimulate AsA production and/or its movement from the intracellular to apoplastic space in attempt to increase the amount of ROS that can be scavenged by the cells. The rate of AsA regeneration controls the O₃ influx to leaf interior, which means that non-detoxified O₃ molecules are subsequently free to promote its oxidative action, especially through its conversion to ROS in the leaf apoplast (Di Baccio et al., 2008; van Hove et al., 2001; Smirnov, 1996). In spite of the fact that O₃-treated Fepagro 26 increases the concentration of AsA, its antioxidant capacity to respond O₃ influx is probably less effective than that of Irai. Together with the results from foliar ROS accumulation we can infer that the AsA antioxidant capacity per unit of O₃ flux is decreased in Fepagro 26, and thus more O₃ molecules are free to be decomposed into ROS (H₂O₂ and superoxide radical) inside the foliar tissue.

The antioxidant role played by AsA is, however, strictly dependent on the cell ability to maintain it in a reduced state which occurs through the action of AsA – GSH cycle (Di Baccio et al., 2008; Noctor and Foyer, 1998; Smirnov, 1996). Using high O₃ concentrations (300 ppb) Luwe et al. (1993) observed a time-dependent relationship between oxidation of both extracellular AsA and intracellular GSH pool, while the cellular AsA redox state was unaltered during fumigation. As reported by numerous other studies, AsA regeneration is tightly coupled to GSH within the cell and transport activity was responsible for replenish the reduced apoplastic AsA pool (for review see Horemans et al., 2000b and Smirnov, 1996). Thus, through a GSH-dependent regeneration mechanism, the extracellular AsA oxidation is supposed to affect the

intracellular thiol signature. Analysis on the levels of total reduced thiol indicated that in both varieties the antioxidant thiol pool was unaffected by O₃ exposure (Fig. 3b); nonetheless, there was a significant difference in the endogenous pool size between Irai and Fepagro 26, being the values for total reduced thiol content on Fepagro 26 leaves 4.2 times higher than Irai. Unlike the apoplasm, the cytoplasm is a cellular compartment where innumerable molecules involved in different metabolic pathways are localized. Modifications on the intracellular redox balance can directly modify proteins structures, and changes in thiol-redox state can modulate enzymes activity by altering active site residues required for catalysis and / or ligand binding, oligomerization, and cellular localization (Paget and Buttner, 2003; Yi et al., 2010). Thus, besides GSH other reducing co-factors for several enzymes involved in ROS detoxification are also conjugate to proteins to avoid their oxidation, and this process is catalyzed by enzymes such as glutaredoxins, thioredoxins and peroxiredoxins (Foyer et al., 1997; Halliwell, 2006). Here we analyzed leaf total reduced thiol content, not only the GSH levels, and maybe this why we have not observed a positive relationship between the levels of total reduced thiol and AsA during O₃ detoxification process on Fepagro 26 plants. Based on recently proteomic studies that support that thiol-based regulation play a critical role in plant responses to O₃ exposure (Galant et al., 2012; Gillespie et al., 2011), we can suggest that in an effort to avoid deleterious oxidative changes on proteins, Fepagro 26 leaf cells try to maintain the levels of total reduced thiol as a mechanism of redox-protection of enzymes involved in major metabolic processes.

In addition to the non-enzymatic antioxidant components, the balance of antioxidant enzymes activities is crucial for suppressing the toxic effects of elevated ROS levels (Apel and Hirt, 2004). Modulation of the major antioxidant enzymes activities (SOD, CAT, APX, GR) have been observed in different O₃ exposure

experiments (Calatayud et al., 2003; Heath, 2007; Pell et al., 1999). The changes on enzymes activities are often linked to parallel changes in gene expression in the intracellular compartment (Pasqualini et al., 2007; Pellinen et al., 2002; Sharma and Davis, 1994; Torres et al., 2007; Willekens et al., 1994). On a previous work, when comparing the results for CAT activity, we observed that the two varieties had a very different pattern of CAT stimulation in response to O₃ fumigation. Irai seedlings significantly increased CAT activity after O₃ exposure, whereas Fepagro 26 did not change the enzyme activity when challenged with the same O₃ concentrations (AOT₄₀ = 212 ppb h, during one week) (Caregnato et al., 2010). Through western blot analysis we demonstrated that, even though Irai leaves have lower endogenous levels of CAT (Fig. 4), when this variety is subjected to O₃ treatment the concentration of the antioxidant enzyme is significantly increased. Altogether, our results indicate that in Irai leaves the increment on CAT activity elicited by the presence of O₃ is probably a consequence of the increased concentration of the enzyme found on the intracellular space, a fact that might improve the antioxidant capacity of Irai foliar cells. Catalase is one of the most important enzymes needed for H₂O₂ detoxification (Willekens et al., 1995). Plants contain several types of H₂O₂-degrading enzymes (peroxidases), however CAT are unique as they do not require cellular reducing equivalents to convert H₂O₂ to water (Sharma et al., 2012). The most important reducing substrate used for peroxidases is AsA (Mehlhorn et al., 1996), an antioxidant molecule that is easily oxidized under stressful conditions such as O₃ exposure. Stress analysis on transgenic CAT-deficient *Arabidopsis thaliana* revealed that reduced peroxisomal CAT activity increased sensitivity towards O₃ and triggers cell death by photorespiratory H₂O₂ (Vandenabeele et al., 2004). Transgenic tobacco plants with approximately 10% of wild-type CAT activity showed accumulation of oxidized GSH (GSSG) and a 4-fold decrease in AsA;

moreover, CAT deficiency renders tobacco transgenic plants markedly more vulnerable to O₃ stress (Willekens et al., 1997). In sum, in a pro-oxidant environment an effective CAT action is critical for maintaining the redox balance to avoid further oxidative stress.

It is known that one of the main detrimental effects of O₃ that occur at leaf subcellular level is the impairment of the photosynthesis process (Pell et al., 1994). Ozone reduction in net photosynthesis is attributed to be a consequence of degradation of both structural and functional components of the chloroplasts (Pääkkönen et al., 1996). Through the oxidation of membrane lipids, O₃ and its derived ROS can cause the disruption of biological membranes, leading to irreversible modifications of chloroplast components, such as the thylakoids (Anderson et al., 2003; Calatayud et al., 2001a, 2003b). Thylakoids disintegration results in the loss of membrane attached chlorophyll molecules, which in free solution are prone to be oxidatively damaged by ROS present in the intracellular environment (Ranieri et al., 2001; Sakaki et al., 1983). Moreover, recent analyses of transcriptome changes in O₃-sensitive and resistant *Medicago truncatula* accessions identified that genes involved in chlorophyll biosynthesis were down regulated after 6 hours post-fumigation on sensitive accession Jemalong (Puckette et al., 2008). When analyzing leaf chlorophyll content we found that chlorophyll *a* and *b*, total chlorophyll and the ratio of Chl *a/b* levels on O₃-exposed Fepagro 26 plants were significantly reduced, a change that was not observed on Irai leaves (Table 1). Considering that Fepagro 26 leaves are unable to properly detoxify the ROS, we can suggest that chlorophyll loss can be either associated to increased chlorophyll oxidation or to an altered regulation of pigments biosynthesis. A comparative study with 12 bean varieties demonstrated that, after 75-135 minutes of O₃ exposure, a high stomatal conductance was accompanied by chlorophyll loss and/or inhibition of photosynthesis

was a common feature of sensitive varieties (Guzy and Heath, 1993). Furthermore, Leitao and colleagues (2008) observed that *P. vulgaris* plants exposed to non-filtered ambient air supplied with 80 nL L^{-1} of O_3 had a loss of 43% on total chlorophyll content. Similarly to our results, reductions in both Chl *a* and *b* were evident, and as underlined by the authors, a similar trend of Chl *a/b* ratio reduction indicate that Chl *a* tended to be decreased a little more by O_3 than Chl *b*.

Using correlation analysis we could show that when chlorophyll *a/b* ratio is decreased on Fepagro 26 exposed plants, the amount of total protein is also reduced. Such significant relationship was not observed for Irai. This result may indicate that ROS accumulation is leading to chlorophyll loss, which affects the photosynthetic process and the biomass acquisition of Fepagro 26 exposed plants. Clebsch and colleagues (2009) studying different subtropical bean varieties, including Fepagro 26 and Irai, observed that O_3 treatment decrease the carbon net assimilation on all studied varieties, but Irai. Carboxylation efficiency, which is considered to be the main factor involved in photosynthesis performance (Pell et al., 1994), was found to be significantly reduced in Fepagro 26 seedlings. Disruption of photosynthetic apparatus might be responsible for reduced caboxylation efficiency by the Calvin cycle enzymes, which finally result in growth impairment on this variety. Experimental studies have recently described that high O_3 -mediated impairment on growth and yield of two important Indian rice cultivars (*Oryza sativa* L. cvs Malviya dhan 36 and Shivani) are associated to reductions of plant height, leaf area, total chlorophyll content, photosynthetic rate, stomatal conductance, and chlorophyll fluorescence (Sarkar and Agrawal, 2012). In addition, studies done with a particular O_3 -sensitive crop, soybean (*Glycine max*), demonstrated that O_3 exposure negatively impacts the plants efficiency to convert solar

energy into biomass energy by reducing photosynthetic efficiency and by increasing respiratory costs, which would contribute to yield loss (Betzberger et al., 2012).

In fact, numerous studies throughout the world that performed similar experiments with a wide range of crops exposed to O₃ have showed that, on sensitive plants, the changes on redox-related biochemical parameters are related with yield losses and, recently, with altered grain quality and nutritional traits (Feng and Kobayashi, 2009; Flowers et al., 2007; Iriti et al., 2009; Sarkar and Agrawal, 2010; Wang et al., 2012). Considering that the risk of the negative effects of O₃ on crop productivity has been creating the need for new crop varieties that are better adapted to O₃ stress, it is of particular importance to further study how the O₃-induced changes on the redox status on the sensitive Fepagro 26 can be associated to modifications on grain quality and yield on this variety. In addition, *P. vulgaris* L. is considered by some authors to be one of the most sensitive agricultural crops to O₃ toxic effects, and experiments to better predict the impacts of increasing O₃ levels are urgently needed. Thus, it must be noted that improved understanding of the exposure-response mechanisms underlying O₃ sensitivity/tolerance are still necessary for major Brazilian bean varieties.

5. Conclusions

Based on our results we can suggest that Fepagro 26 is more likely to suffer the negative impacts of high O₃ levels than Irai, which seems to be a more robust variety. The greater sensitivity of Fepagro 26 variety to O₃ stress seems to be associated with an increased ROS production (superoxide radical and H₂O₂) which creates a pro-oxidative environment inside the cells. Apparently, both enzymatic (CAT) and non-enzymatic

(AsA) leaf antioxidants are unable to maintain the intracellular redox homeostasis, which leads to oxidative damages to structural molecules such as the membrane lipids (see Caregnato et al., 2010). Disruption of membrane integrity can cause photosynthetic pigments loss (chlorophyll *a* and *b*), which reduces the photosynthesis rate and affects the biomass acquisition of Fepagro 26 plants (protein levels reduction). On the opposite, Irai presents higher endogenous levels of ROS, and under the presence of O₃ its antioxidant apparatus is stimulated to avoid oxidative stress. Similarly to the conclusions achieved by Guidi et al. (2010), the O₃-tolerance in bean depends more on the specific potential ability of each cultivar than the stress-induced physiological and biochemical adjustments to avoid and counter stress-induced oxidative damage. Although the parameters assessed in this study could arise as a consequence of other environmental stresses, our data provide reliable results concerning some of the major biochemical differences that are behind the responses of the two subtropical *P. vulgaris* varieties to the O₃ exposure. To better characterize these bean varieties according to their O₃ susceptibility an assessment of dose dependent sensitivity with respect to growth, plant yield parameters and grain quality should be further conducted.

Acknowledgments

Funding support for this project was generously provided by the Brazilian agencies CNPq, CAPES, FAPERGS and PROPESQ-UFRGS.

References

- Agrawal, M., Singh, B., Rajput, M., Marshall, F., Bell, J.N., 2003. Effect of air pollution on periurban agriculture: a case study. *Environ Pollut.* 126,323–329.
- Anderson, P.D., Palmer, B., Houppis, J.L.J., Smith, M.K., Pushnik, J.C., 2003. Chloroplastic responses of ponderosa pine (*Pinus ponderosa*) seedlings to ozone exposure. *Environ. Int.* 29,407–413.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55,373–399.
- Ashmore, M.R., 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant Cell Environ.* 28,949–964.
- Betzlberger, A.M., Gillespie, K.M., McGrath, J.M., Koester, R.P., Nelson, R.L., Ainsworth, E.A., 2010. Effects of chronic elevated ozone concentration on antioxidant capacity, photosynthesis and seed yield of 10 soybean cultivars. *Plant Cell Environ.* 33,1569–81.
- Betzlberger, A.M., Yendrek, C.R., Sun, J., Leisner, C.P., Nelson, R.L., Ort, D.R., Ainsworth, E. a, 2012. Ozone exposure response for U.S. soybean cultivars: linear reductions in photosynthetic potential, biomass, and yield. *Plant Physiol.* 160,1827–39.
- Black, V.J., Stewart, C.A., Roberts, J.A., Black, C.R., 2007. Ozone affects gas exchange, growth and reproductive development in *Brassica campestris* (Wisconsin Fast Plants). *New Phytol.* 176,150–163.
- Booker, F., Muntifering, R., McGrath, M., Burkey, K., Decoteau, D., Fiscus, E., Manning, W., Krupa, S., Chappelka, A., Grantz, D., 2009. The Ozone Component of Global Change: Potential Effects on Agricultural and Horticultural Plant Yield, Product Quality and Interactions with Invasive Species. *J. Integr. Plant Biol.* 51,337–351.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Bioch.* 72,248–254.
- Burkey, K.O., Miller, J.E., Fiscus, E.L., 2005. Assessment of ambient ozone effects on vegetation using snap bean as a bioindicator species. *J. Environ. Qual.* 34,1081–1086.
- Calatayud, A., Alvarado, J.W., Barreno, E., 2001a. Changes in chlorophyll a fluorescence, lipid peroxidation, and detoxificant system in potato plants grown under filtered and non-filtered air in open-top chambers. *Photosynthetica.* 39,507–513.

- Calatayud, A., Iglesias, D.J., Talon, M., Barreno, E., 2003b. Effects of 2-month ozone exposure in spinach leaves on photosynthesis, antioxidant systems and lipid peroxidation. *Plant Physiol. Bioch.* 41,839–845.
- Calatayud, A., Barreno, E., 2004. Response to ozone in two lettuce varieties on chlorophyll a fluorescence, photosynthetic pigments and lipid peroxidation. *Plant Physiol. Bioch.* 42,549–55.
- Calatayud, V., Cerveró, J., Sanz, M.J., 2007. Foliar, Physiological and Growth Responses of Four Maple Species Exposed to Ozone. *Water Air Soil Poll.* 185,239–254.
- Caregnato, F.F., Clebsch, C.C., Rocha, R.F., Feistauer, L.B.H., Oliveira, P.L., Divan, A.D., Moreira, J.C.F., 2010. Ozone exposure differentially affects oxidative stress parameters in distinct *Phaseolus vulgaris* L. varieties. *J. Plant Interact.* 5,111–115.
- Castagna, A., Ranieri, A., 2009. Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake to gene expression adjustment. *Environ. Pollut.* 157,1461–1469.
- Clebsch, C.C., Divan Junior, A.M., Oliveira, P.L., Nicolau, M., 2009. Physiological disturbances promoted by ozone in five cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Braz. J. Plant Physiol.* 21,319–329.
- Conklin, P.L., Williams, E.H., Last, R.L., 1996. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93,9970–9974.
- Crutzen, P.J., Lelieveld, J., 2001. Human impacts on atmospheric chemistry. *Ann. Rev. Earth Pl. Sci.* 29,17–45.
- Desikan, R., 2001. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127,159–172.
- D’Haese, D., Vandermeiren, K., Asard, H., Horemans, N., 2005. Other factors than apoplastic ascorbate contribute to the differential ozone tolerance of two clones of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Environ.* 28,623–632.
- Di Baccio, D., Castagna, A., Paoletti, E., Sebastiani, L., Ranier, A., Ranieri, A., 2008. Could the differences in O₃ sensitivity between two poplar clones be related to a difference in antioxidant defense and secondary metabolic response to O₃ influx? *Tree Physiol.* 28,1761–1772.
- Dizengremel, P., Le Thiec, D., Bagard, M., Jolivet, Y., 2008. Ozone risk assessment for plants: Central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environ. Pollut.* 156,11–15.
- Dizengremel, P., Le Thiec, D., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Vaultier, M.-N., Bagard, M., Jolivet, Y., 2009. Metabolic-dependent changes in plant cell redox power after ozone exposure. *Plant Biol (Stuttgart).* 1,35–42.

- Ellman, G.L., 1959. Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Bioch. Biophys.* 82,70–77.
- Eltayeb, A.E., Kawano, N., Badawi, G.H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Morishima, I., Shibahara, T., Inanaga, S., Tanaka, K., 2006. Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. *Physiol. Plant.* 127,57–65.
- Feng, Z.-W., Jin, M.-H., Zhang, F.-Z., Huang, Y.-Z., 2003. Effects of ground-level ozone (O₃) pollution on the yields of rice and winter wheat in the Yangtze River Delta. *J. Environ. Sci. (China)*. 15,360–2.
- Feng, Z., Kobayashi, K., Ainsworth, E.A., 2008. Impact of elevated ozone concentration on growth, physiology, and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.): a meta-analysis. *Glob. Change Biol.* 14,2696–2708.
- Feng, Z., Kobayashi, K., 2009. Assessing the impacts of current and future concentrations of surface ozone on crop yield with meta-analysis. *Atmos. Environ.* 43,1510–1519.
- Finlayson, Pitts, B.J., Pitts, J.N., Finlayson-Pitts, B.J., Pitts Jr., J.N., 1997. Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science*. 276,1045–1052.
- Fishman, J., Creilson, J.K., Parker, P.A., Ainsworth, E.A., Vining, G.G., Szarka, J., Booker, F.L., Xu, X., 2010. An investigation of widespread ozone damage to the soybean crop in the upper Midwest determined from ground-based and satellite measurements. *Atmos. Environ.* 44,2248–2256.
- Flowers, M.D., Fiscus, E.L., Burkey, K.O., Booker, F.L., Dubois, J.J.B., 2007. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and yield of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes differing in sensitivity to ozone. *Environ. Exp. Bot.* 61,190–198.
- Fontaine, V., Pelloux, J., Podor, M., Afif, D., Ge, D., Poincare, H., Nancy, F.-V., 1999. Carbon fixation in *Pinus halepensis* submitted to ozone. Opposite response of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase and phosphoenolpyruvate carboxylase. *Physiol. Plant.* 105,187–192.
- Foyer, C.H., LopezDelgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M., 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100,241–254.
- Foyer, C.H., Noctor, G.D., 2008. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 861–905.
- Fryer, M.J., Oxborough, K., Mullineaux, P.M., Baker, N.R., 2002. Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *J. Exp. Bot.* 53,1249–1254.

- Galant, A., Koester, R.P., Ainsworth, E. a, Hicks, L.M., Jez, J.M., 2012. From climate change to molecular response: redox proteomics of ozone-induced responses in soybean. *New Phytol.* 194,220–9.
- Giacomo, B., Forino, L.M.C., Tagliasacchi, A.M., Bernardi, R., Durante, M., 2010. Ozone damage and tolerance in leaves of two poplar genotypes. *Caryologia.* 63,422–434.
- Gillespie, K.M., Rogers, A., Ainsworth, E.A., 2011. Growth at elevated ozone or elevated carbon dioxide concentration alters antioxidant capacity and response to acute oxidative stress in soybean (*Glycine max*). *J. Exp. Bot.* 62,2667–78.
- Guidi, L., Degl’Innocenti, E., Giordano, C., Biricolti, S., Tattini, M., 2010. Ozone tolerance in *Phaseolus vulgaris* depends on more than one mechanism. *Environ. Pollut.* 158,3164–3171.
- Guzy, M., Heath, R., 1993. Responses to ozone of varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *New Phytol.* 124,617–625.
- Halliwell, B., 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* 141,312–322.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. Free radicals in biology and medicine, 4th ed. Oxford University Press, Oxford.
- Heath, R.L., 2007. Alterations of the biochemical pathways of plants by the air pollutant ozone: Which are the true gauges of injury? *TheScientificWorldJournal.* 7,110–118.
- Horemans, N., Foyer, C.H., Asard, H., 2000. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends Plant Sci.* 5,263–267.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), 2001. Climate change 2001: the scientific basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 881pp (ISBN 0521 807670).
- Iriti, M., Faoro, F., 2008. Oxidative stress, the paradigm of ozone toxicity in plants and animals. *Water Air Soil Pollut.* 187,285–301.
- Iriti, M., Di Maro, A., Bernasconi, S., Burlini, N., Simonetti, P., Picchi, V., Panigada, C., Gerosa, G., Parente, A., Faoro, F., 2009. Nutritional traits of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds from plants chronically exposed to ozone pollution. *J. Agri. Food Chem.* 57,201–8.
- Kanofsky, J.R., Sima, P.D., 1995. Singlet oxygen generation from the reaction of ozone with plant leaves. *J. Biol. Chem.* 270,7850–7852.
- Keller, T., Schwager, H., 1977. Air-Pollution and Ascorbic-Acid. *Eur. J. Forest Pathol.* 7,338–350.

- Kendall, A.C., Keys, A.J., Turner, J.C., Lea, P.J., Mifflin, B.J., 1983. The isolation and characterisation of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta*. 159,505–511.
- Kobayashi, K., 1995. Effects of ozone on dry matter partitioning and yield of Japanese cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Agric. Ecosyst. Environ.* 53,109–122.
- Krupa, S., Mcgrath, M.T., Andersen, C.P., Booker, F.L., Burkey, K.O., Chappelka, A.H., Chevone, B.I., Pell, E.J., Zilinskas, B.A., 2000. Ambient ozone and plant health. *Plant Dis.* 85,4–12.
- Leitao, L., Dizengremel, P., Biolley, J.-P.P., 2008. Foliar CO₂ fixation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) submitted to elevated ozone: Distinct changes in Rubisco and PEPc activities in relation to pigment content. *Ecotox. Environ. Safe.* 69,531–540.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and Carotenoids - Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Metho. Enzymol.* 148,350–382.
- Luwe, M., Takahama, U., Heber, U., 1993. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol.* 101,969–976.
- Matyssek, R., Sandermann, H., Wieser, G., Booker, F., Cieslik, S., Musselman, R., Ernst, D., 2008. The challenge of making ozone risk assessment for forest trees more mechanistic. *Environ. Pollut.* 156,567–82.
- Menser, H.A., 1964. Response of Plants to Air Pollutants: 3. Relation between ascorbic acid levels + ozone susceptibility of light-preconditioned tobacco plants. *Plant Physiol.* 39,564–&.
- Mudd, J.B., Leavitt, R., Ongun, A., McManus, T.T., 1969. Reaction of ozone with amino acids and proteins. *Atmos. Environ.* 3,669–681.
- Myhre, O., Andersen, J.M., Aarnes, H., Fonnum, F., 2003. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharmacol.* 65,1575–1582.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49,249–279.
- Pääkkönen, E., Vahala, J., Holopainen, T., Karjalainen, R., Kärenlampi, L., 1996. Growth responses and related biochemical and ultrastructural changes of the photosynthetic apparatus in birch (*Betula pendula*) saplings exposed to low concentrations of ozone. *Tree Physiol.* 16,597–605.
- Paget, M.S.B., Buttner, M.J., 2003. Thiol-based regulatory switches. *Ann. Rev. Genet.* 37,91–121.

- Pasqualini, S., Piccioni, C., Reale, L., 2003. Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiol.* 133,1122–1134.
- Pasqualini, S., Paolocci, F., Borgogni, A., Morettini, R., Ederli, L., 2007. The overexpression of an alternative oxidase gene triggers ozone sensitivity in tobacco plants. *Plant Cell Environ.* 30,1545–1556.
- Pell, E.J., Eckardt, N.A., Glick, R.E., 1994. Biochemical and molecular-basis for impairment of photosynthetic potential. *Photosynth Res.* 39,453–462.
- Pell, E.J., Sinn, J.P., Brendley, B.W., Samuelson, L., Vinten-Johansen, C., Tien, M., Skillman, J., 1999. Differential response of four tree species to ozone-induced acceleration of foliar senescence. *Plant Cell Environ.* 22,779–790.
- Pellinen, R.I., Korhonen, M., Tauriainen, A.A., Palva, E.T., Kangasja, J., 2002. Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in Birch 1. *Plant Physiol.* 130,549–560.
- Puckette, M.C., Weng, H., Mahalingam, R., 2007. Physiological and biochemical responses to acute ozone-induced oxidative stress in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol. Biochem.* 45,70–79.
- Puckette, M.C., Tang, Y., Mahalingam, R., 2008. Transcriptomic changes induced by acute ozone in resistant and sensitive *Medicago truncatula* accessions. *BMC Plant Biol.* 8,46.
- Ranieri, A., Castagna, A., Padu, E., Moldau, H., Rahi, M., Soldatini, G.F., 1999. The decay of O-3 through direct reaction with cell wall ascorbate is not sufficient to explain the different degrees of O-3-sensitivity in two poplar clones. *J. Plant Physiol.* 154,250–255.
- Ranieri, A., Giuntini, D., Ferraro, F., Nali, C., Baldan, B., Lorenzini, G., Soldatini, G.F., Soldatini, F., 2001. Chronic ozone fumigation induces alterations in thylakoid functionality and composition in two poplar clones. *Plant Physiol. Biochem.* 39,999–1008.
- Sakaki, T., Kondo, N., Sugahara, K., 1983. Breakdown of photosynthetic pigments and lipids in spinach leaves with ozone fumigation: Role of active oxygens. *Physiol. Plant.* 59,28–34.
- Sarkar, A., Agrawal, S.B., 2010. Elevated ozone and two modern wheat cultivars: An assessment of dose dependent sensitivity with respect to growth, reproductive and yield parameters. *Environ. Exp. Bot.* 69,328–337.
- Sarkar, A., Rakwal, R., Agrawal, S.B., Shibato, J., Ogawa, Y., Yoshida, Y., Agrawal, G.K., Agrawal, M., 2010. Investigating the Impact of Elevated Levels of Ozone on Tropical Wheat Using Integrated Phenotypical, Physiological, Biochemical, and Proteomics Approaches. *J. Proteome Res.* 4565–4584.

- Sarkar, A., Agrawal, S.B., 2012. Evaluating the response of two high yielding Indian rice cultivars against ambient and elevated levels of ozone by using open top chambers. *J. Environ. Manage.* 95, 19–24.
- Scebba, F., Giuntini, D., Castagna, A., Soldatini, G., Ranieri, A., 2006. Analysing the impact of ozone on biochemical and physiological variables in plant species belonging to natural ecosystems. *Environ. Exp. Bot.* 57,89–97.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., Waner, D., 2001. Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52,627–658.
- Sharma, Y.K., Davis, K.R., 1994. Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 105,1089–1096.
- Sharma, Y.K., Davis, K.R., Harma, Y.O.K.S., Avis, K.E.R.D., 1997. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radic. Biol. Med.* 23,480–488.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012,1–26.
- Smirnoff, N., 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.* 78,661–669.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B., 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *Plant J.* 11,1187–1194.
- Torres, N.L., Cho, K., Shibato, J., Hirano, M., Kubo, A., Masuo, Y., Iwahashi, H., Jwa, N.S., Agrawal, G.K., Rakwal, R., 2007. Gel-based proteomics reveals potential novel protein markers of ozone stress in leaves of cultivated bean and maize species of Panama. *Electrophoresis.* 28,4369–4381.
- Tosti, N., Pasqualini, S., Borgogni, A., Ederli, L., Falistocco, E., Crispi, S., Paolocci, F., 2006. Gene expression profiles of O₃-treated *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Environ.* 29,1686–702.
- US DA, 2010. Brazilian Dry Bean Production. Agriculture Foreign Service Report, GAIN Report Number: BR0627. Washington, DC.
- Vandenabeele, S., Van Der Kelen, K., Dat, J., Gadjev, I., Boonefaes, T., Morsa, S., Rottiers, P., Sloaten, L., Van Montagu, M., Zabeau, M., Inze, D., Van Breusegem, F., 2003. A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100,16113–8.
- Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H.K., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F., 2004. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 39,45–58.

- Van Hove, L.W., Bossen, M.E., San Gabino, B.G., Sgreva, C., 2001. The ability of apoplastic ascorbate to protect poplar leaves against ambient ozone concentrations: a quantitative approach. *Environ. Pollut.* 114,371–82.
- Vingarzan, R., 2004. A review of surface ozone background levels and trends. *Atmos. Environ.* 38,3431–3442.
- Wang, Y., Yang, L., Han, Y., Zhu, J., Kobayashi, K., Tang, H., Wang, Y., 2012. The impact of elevated tropospheric ozone on grain quality of hybrid rice: A free-air gas concentration enrichment (FACE) experiment. *Field Crops Res.* 129,81–89.
- Willekens, H., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D., Langebartels, C., Sandermann, H., 1994. Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet b have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiol.* 106,1007–1014.
- Willekens, H., Inzé, D., Montagu, M., Camp, W., 1995. Catalases in plants. *Mol. Breed.* 1,207–228.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Montagu, M. V, Inzé, D., Camp, W. V, 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO J.* 16,4806–4816.
- Yi, H., Galant, A., Ravilious, G.E., Preuss, M.L., Jez, J.M., 2010. Sensing sulfur conditions: simple to complex protein regulatory mechanisms in plant thiol metabolism. *Mol. Plant.* 3,269–79.
- Zhang, S., Klessig, D.F., 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* 6,520–7.

FIGURES

Figure 1.

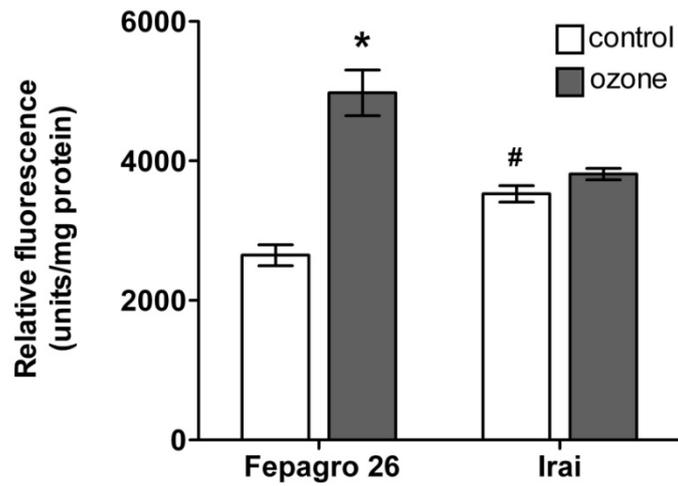


Fig. 1. Reactive oxygen species levels on control and O₃-exposed leaves from Fepagro 26 and Irai seedlings. Values represent mean \pm SEM (n = 6) of three independent experiments. * indicate difference from control ($p < 0.05$); # indicate difference between varieties ($p < 0.05$) as analyzed by ANOVA.

Figure 2.

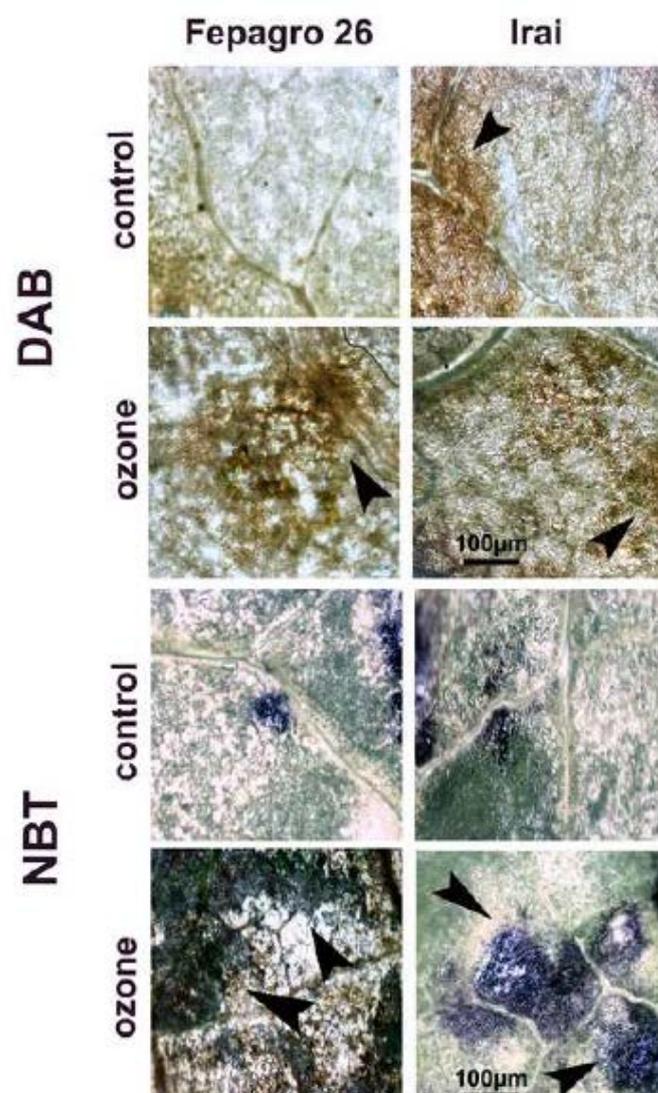


Fig. 2. *In situ* localization of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 respectively by NBT and DAB staining in control and O_3 -exposed leaves from Fepagro 26 and Irai seedlings. Arrows are indicating the H_2O_2 accumulation areas (brown-stained spots), and $O_2^{\cdot-}$ accumulation areas (purple spots) (magnification x10).

Figure 3.

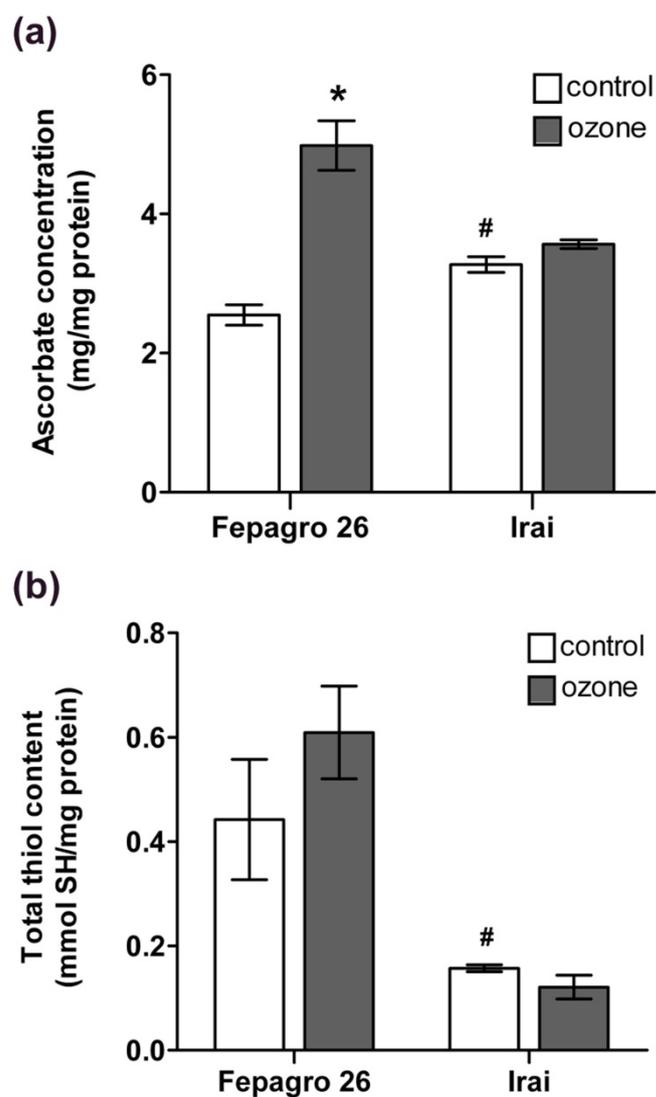


Fig. 3. (a) Ascorbate concentration and (b) Total thiol content on control and O₃-exposed leaves from Fepagro 26 and Irai seedlings. Values represent mean \pm SEM (n = 6) of three independent experiments. * indicate difference from control ($p < 0.05$); # indicate difference between varieties ($p < 0.05$) as analyzed by ANOVA.

Figure 4.

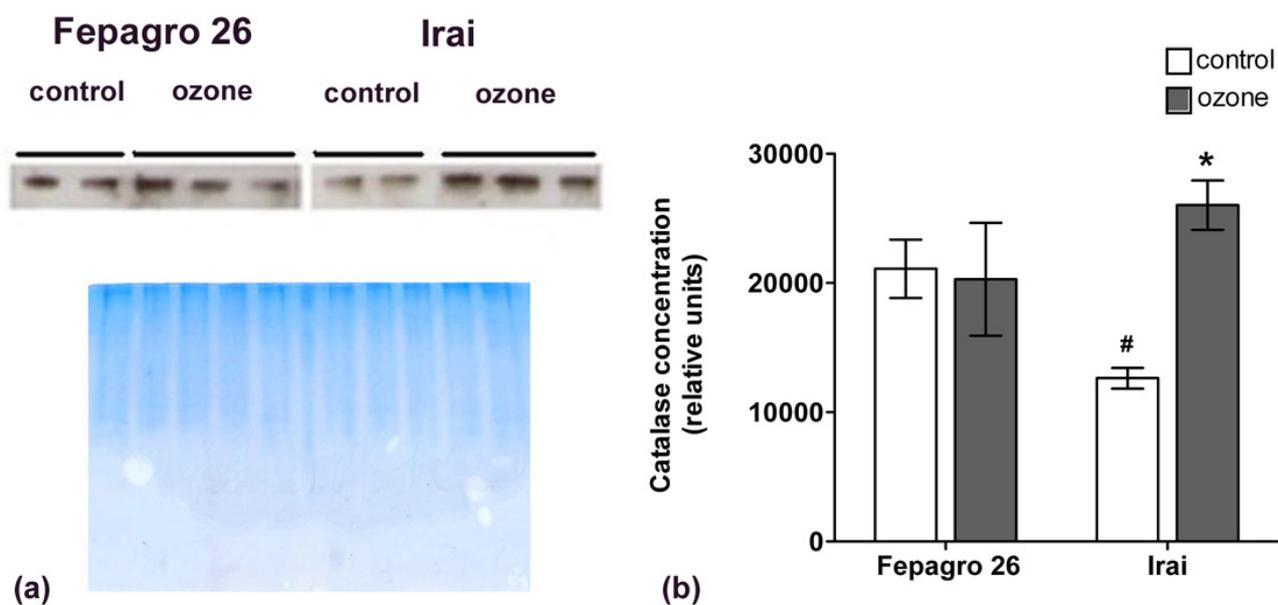


Fig. 4. (a) Catalase immunocontent on control and O₃-exposed leaves from Fepagro 26 and Irai seedlings and loading control with Coomassie Blue staining. (b) Catalase immunocontent expressed as relative units. Values represent mean \pm SEM (n = 3) of three independent experiments. * indicate difference from control ($p < 0.05$); # indicate difference between varieties ($p < 0.05$) as analyzed by Student t-test.

Figure 5.

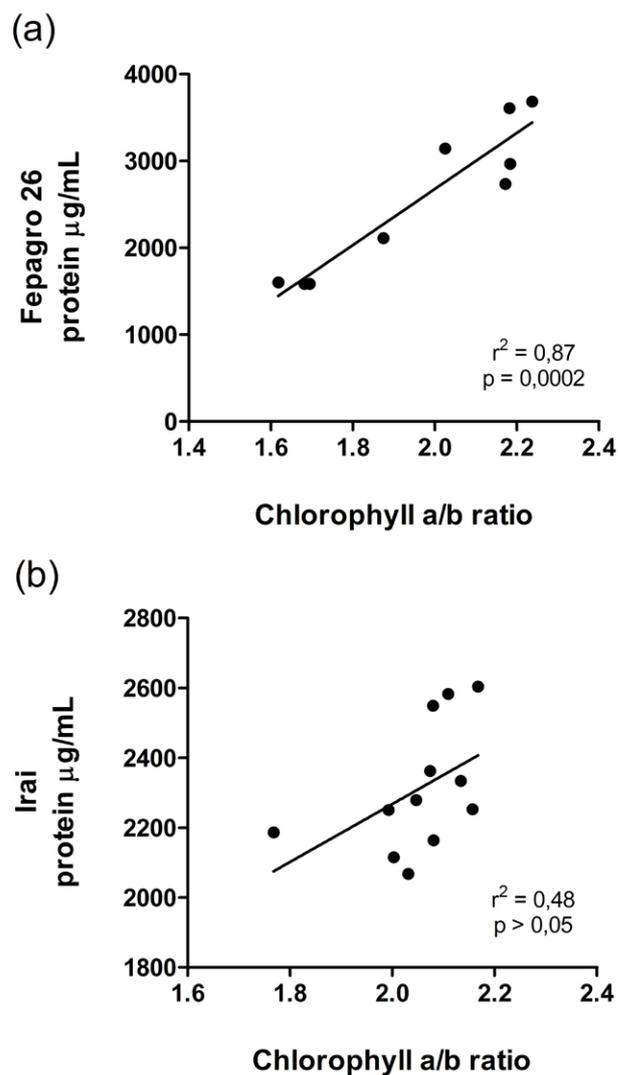


Fig. 5. Relationship between chlorophyll content and total protein levels on control and O_3 -exposed leaves from (a) Fepagro 26 and (b) Irai. Values represent mean \pm SEM (n = 6) of three independent experiments. Data were analyzed using linear bivariate regression analysis. The significance of the P -values are shown, and a significant relationship was considered for a $p < 0.05$.

Table 1.

Chlorophyll a and b content, and protein concentration on control and O_3 -exposed *Phaseolus vulgaris* seedlings. Values represent mean \pm SEM (n=6) of three independent experiments. * indicate difference between control and exposed leaves ($p < 0.05$); ns indicates no significant differences between control and exposed leaves as analyzed by ANOVA.

	Fepagro 26			Irai		
	Control	O_3 treated	P value	Control	O_3 treated	P value
Chlorophyll a (mg/g)	7.7 \pm 0.41	3.6 \pm 0.31*	< 0.0001	7.8 \pm 0.71	6.5 \pm 0.44	ns
Chlorophyll b (mg/g)	3.5 \pm 0.20	2.1 \pm 0.17*	< 0.001	3.7 \pm 0.34	3.2 \pm 0.14	ns
Total chlorophyll (mg/g)	11.3 \pm 0.59	5.7 \pm 0.49*	< 0.001	11.62 \pm 1.06	9.8 \pm 0.60	ns
Chlorophyll a/b ratio	2.1 \pm 0.040	1.7 \pm 0.062*	< 0.0005	2.1 \pm 0.030	2.0 \pm 0.04	ns
Protein (μ g/mL)	3227.9 \pm 183	1722.1 \pm 130*	< 0.001	2353.6 \pm 77	2219.5 \pm 48*	< 0.05

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos revelam que a exposição controlada ao O₃ das cultivares de feijão desenvolvidas para cultivo no sul do Brasil induz alterações significativas no estado oxidativo do tecido foliar de todas as plantas analisadas, porém estas alterações variam bastante de acordo com a cultivar. A análise integrada dos parâmetros relacionados à capacidade antioxidante e ao estado oxidativo nos sugere que o grau de sensibilidade das cultivares com relação à toxicidade do O₃ pode estar diretamente associado com as respostas bioquímicas aqui avaliadas.

Assim como em outros estudos que avaliam os efeitos do O₃ em diversas espécies de plantas (Bussotti et al., 2007; Grandjean & Fuhrer, 1989; Sarkar & Agrawal, 2012), os experimentos de exposição foram desenvolvidos em câmaras de topo-aberto (Grünhage & Jäger, 2003), onde há um sistema de gaseificação com atmosfera enriquecida com O₃, como demonstrado no esquema e foto na Figura 5. Esta abordagem foi utilizada porque possibilita que, uma multiplicidade de variáveis seja controlada, garantindo que as respostas observadas sejam quase que exclusivas da ação do O₃.

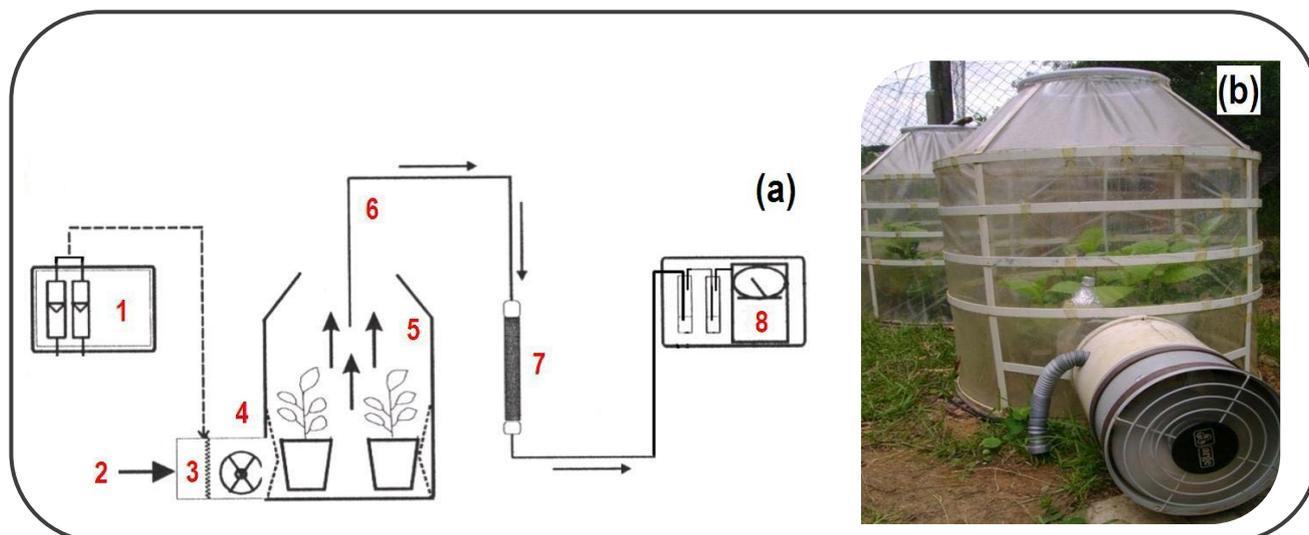


Figura 5. (a) Diagrama esquemático de um sistema para cultivo de plantas em atmosferas enriquecidas com O₃. 1: Ozonizador, 2: Entrada de ar para a câmara de topo aberto, 3: Câmara de homogenização, 4: Ventilador homogenizador de ar, 5: Câmara de topo aberto, 6: Tubulação para amostra de ar para medição, 7: Filtro de umidade, 8: Amostrador atmosférico para O₃. (b) Foto das câmaras de topo aberto utilizadas nos experimentos.

No Artigo I, a exposição ao O₃ (AOT₄₀ de 212 ppb h) durante o período de uma semana induziu dano oxidativo aos lipídios de maneira significativamente em apenas duas cultivares, a Fepagro 26 e a Guapo Brilhante (artigo I, figura 1a). Porém, a análise da atividade da CAT revelou que, apenas nessas cultivares, não houve um aumento significativo na atividade da enzima, sendo que essa a principal enzima responsável pela degradação e manutenção dos níveis de H₂O₂ (artigo I, figura 1b). Nas cultivares Iraí, Macotaço e Pinto 111 a atividade da CAT aumentou significativamente após o tratamento com O₃, o que provavelmente evitou que nestas cultivares, os níveis de lipoperoxidação aumentassem. O ensaio para avaliar os níveis totais das defesas antioxidante não-enzimáticas no tecido foliar revelou que as cultivares Fepagro 26 e Iraí diminuíram significativamente os níveis de defesas antioxidantes não-enzimáticos em respostas a exposição ao O₃ (artigo I, figura 1c).

Neste trabalho foi possível comparar os resultados obtidos para as cultivares desenvolvidas pela Fepagro (Iraí, Fepagro 26, Guapo Brilhante e Macotaço) com uma cultivar reconhecidamente sensível ao O₃, a Pinto 111 (Peters et al., 1989), que se sabe, pode apresentar reduções de até 40,7% na sua produtividade quando cresce na presença de níveis ambientais de O₃ (Fenn et al., 2002). Esta cultivar tem origem Mesoamericana, sendo amplamente estudada em virtude da sua suscetibilidade universal a ferrugem causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus*, uma das mais importantes doenças que afetam a cultura do feijão (Souza et al., 2005). Considerando os parâmetros utilizados na nossa análise, podemos observar que a cultivar Fepagro 26 apresentou respostas mais pronunciadas aos efeitos danosos do O₃ do que a cultivar Pinto 111, indicando que essa cultivar talvez seja tão sensível quanto, ou até mais, que a cultivar Pinto 111.

Clebsch e colaboradores (2009) demonstraram que a Fepagro 26 apresenta um decréscimo significativo na taxa de assimilação líquida quando exposta ao O₃, redução essa que pode ser explicada pela limitação no processo de carboxilação, o qual está associado ao decréscimo na velocidade máxima de carboxilação da Rubisco e na eficiência da carboxilação. O O₃ é conhecido por afetar o processo fotossintético, uma vez que a redução na eficiência de carboxilação está associada a prejuízos causados a fotossíntese. Leitao e colaboradores (2008) relatam que a exposição de plantas de *P.*

vulgaris a ATO_{40} de $122 \text{ nL L}^{-1} \text{ h}$ de O_3 diminui a atividade da Rubisco, mas aumenta a atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPc). Os autores comprovam que a redução na atividade da Rubisco acontece em decorrência da diminuição na quantidade das duas subunidades da enzima e das modificações oxidativas na menor subunidade e que, nas folhas primárias, estes efeitos são acompanhados pela diminuição no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e *b*, e carotenóides). Este conjunto de eventos metabólicos desencadeados pela presença do O_3 tem correlação com a aceleração da morte celular programada. O aumento nos níveis de lipoperoxidação observados na cultivar Fepagro 26 podem assim explicar o efeito negativo sobre a taxa de carboxilação, uma vez que a desestruturação da membrana dos cloroplastos inviabilizaria a manutenção do processo fotossintético.

A análise preliminar sobre a eficácia do sistema de defesas antioxidantes não-enzimáticas revelou que existe uma diminuição nos níveis totais dos antioxidantes não-enzimáticos apenas nas cultivares Fepagro 26 e Iraí. Dentre as principais moléculas antioxidantes não-enzimáticas presentes nas células vegetais encontra-se a GSH, que desempenha importante papel na regulação do estado redox intracelular, e o AsA, um antioxidante primário chave na conjugação de metabólitos para detoxificação, principalmente no apoplasto (Noctor et al., 2002). A alteração observada na capacidade antioxidante não-enzimática nas duas cultivares, indica que esse decréscimo pode estar associado a uma diminuição nas concentrações tanto de GSH como de AsA, uma vez que diversos autores afirmam que o AsA é o metabólito utilizado como primeira linha de defesa não-enzimática de plantas, e que o aumento nas vias de reciclagem do AsA oxidado para o reduzido são responsáveis por conferir grande tolerância de plantas ao O_3 (Chen & Gallie, 2004; Horemans et al., 2000b; Noctor & Foyer, 1998a).

O fato da cultivar Fepagro 26 apresentar uma diminuição no potencial antioxidantes não-enzimático, aliado ao aumento na oxidação de lipídios e à falta de ativação da CAT, é um indicativo de que dentre todas cultivares estudadas, esta poderia ser considerada mais suscetível ao estresse oxidativo desencadeado pelo O_3 . Como já relatado para outras espécies vegetais sensíveis a este poluente, as ações coordenadas que resultam no aumento da produção de EAO e inibem as respostas das defesas antioxidantes, acabam por acionar as rotas de sinalização que desencadeiam a morte celular programada (Apel & Hirt, 2004; Mahalingam et al., 2006; Pasqualini et al., 2007). Ao contrário, na cultivar Iraí, mesmo que tenha havido uma diminuição na

capacidade antioxidante total, o aumento na atividade da CAT foi aparentemente crucial para que não houvesse um desbalanço na produção de EAO, fato esse que pode explicar porque não observamos um aumento no dano oxidativo aos lipídios.

Assim, a análise integrada dos resultados obtidos no Artigo I nos levou a entender que, talvez, dentre as cultivares avaliadas, a Iraí fosse mais tolerante ao O₃ do que as demais cultivares estudadas. Nesta cultivar, aparentemente, a indução coordenada do sistema de defesa antioxidante foi essencial para que fossem alcançados a manutenção do metabolismo e da integridade fisiológica do tecido foliar. Desse modo, decidimos aprofundar o estudo sobre como essas modificações no estado oxidativo poderiam estar conferindo maior resistência à cultivar Iraí, e sensibilidade à cultivar Fepagro 26, quando essas crescem na presença do O₃. Assim, os resultados do Artigo II ampliaram o espectro de informações sobre como as alterações no balanço redox e na capacidade antioxidante desencadeados pela ação do O₃ podem estar associadas com a tolerância ao O₃.

Primeiramente, observamos que a produção de EAO em ambas as cultivares submetidas ao tratamento com O₃ é bastante diferente (artigo II, figura 1). O acúmulo de EAO no tecido foliar das plantas de Fepagro 26 aumentou significativamente após o tratamento, o que não foi observado na cultivar Iraí. Entretanto, os níveis basais de EAO encontrados nessa cultivar foram mais elevados, indicando talvez que, as concentrações mais elevadas de EAO estejam associadas a uma resposta antioxidante mais eficiente, ou seja, uma adaptação que torna a planta capaz de ser mais resistente ao O₃. Os resultados obtidos com as marcações *in situ* para análise da produção de H₂O₂ e do O₂^{•-} indicaram que houve um aumento no acúmulo de ambas EAO nas plantas de Fepagro 26 expostas ao O₃ (artigo II, figura 2). Já nas folhas da cultivar Iraí, observou-se que o tratamento com O₃ parece não exercer o mesmo efeito com relação à produção de H₂O₂, uma vez que a marcação com DAB revelou a mesma intensidade nas plantas controle e tratadas. Porém, a produção de O₂^{•-} parece sofrer maior alteração em resposta ao O₃, pois as folhas das plantas controle apresentaram menor reação com NBT, indicando que a concentração de O₂^{•-} no tecido foliar é menor nas plantas controle, quando comparadas com as plantas expostas.

De fato, sabe-se que padrões distintos de acúmulo de EAO ocorrem diferencialmente em plantas sensíveis e tolerantes ao O₃. Guidi e colegas (2010)

compararam as respostas de duas cultivares de *P. vulgaris* submetidas ao tratamento agudo com O₃ (165 nL L⁻¹) e mostraram que, após 3 h de exposição, houve um acúmulo maior de H₂O₂ nas folhas da cultivar sensível Cannellino, ao passo que os depósitos de H₂O₂ na cultivar tolerante Top Crop foram detectados somente após 24 h do início do tratamento. Ainda, na cultivar sensível Cannellino o acúmulo inicial de H₂O₂ foi correlacionado com danos irreversíveis na estrutura celular e no aparato fotossintético. Além disso, um estudo realizado por Puckette et al. (2007) com 38 variedades diferentes de *Medicago truncatula* fumigadas com 300 nmol mol⁻¹ de O₃ durante 6 h, demonstrou que as variedades que apresentavam níveis endógenos mais elevados de EAO eram mais tolerantes ao O₃ do que as variedades que tinham níveis de EAO mais baixos, sugerindo que as plantas com níveis elevados de EAO podem estar intrinsecamente preparadas para tolerar insultos oxidativos extremos. Este fato reforça a importância do papel que as EAO desempenham como moléculas sinalizadoras durante condições normais de crescimento e estresse (Puckette et al., 2007).

A análise das concentrações de AsA e grupamentos tióis totais no tecido foliar foi essencial para que pudéssemos entender como o O₃ influencia o balanço do estado oxidativo nas cultivares estudadas (artigo II, figura 3). Novamente, observamos que as concentrações fisiológicas dos parâmetros avaliados nas duas cultivares são diferentes. Os níveis basais de AsA são significativamente maiores na cultivar Iraí, mas a concentração de grupamentos tióis é muito menor do que na Fepagro 26. Entretanto, quando as plantas de Fepagro 26 crescem na presença do O₃, há um aumento significativo nos níveis de AsA, o que pode indicar que existe a modulação do sistema antioxidante não-enzimático baseado no ciclo do AsA em resposta às alterações nos níveis de EAO. O papel protetor do AsA como *scavenger* de EAO foi demonstrado pela primeira vez em mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes na síntese de AsA, onde se observou que os mutantes eram mais sensíveis aos efeitos negativos do O₃ (Conklin et al., 1996). Desde então, vários estudos têm buscado esclarecer como níveis mais elevados de AsA poderiam estar associados a uma maior resistência ao O₃ e hoje, se acredita que a capacidade de tolerar os danos decorrentes da exposição ao O₃ depende tanto do conteúdo existente de antioxidantes celulares (AsA e GSH), como da intensidade da ação das vias de desintoxicação, que são as principais vias responsáveis pela regeneração de ambos metabólitos antioxidantes (Calatayud et al., 2001; Dizengremel et al., 2009; Leitao et al., 2008; Luwe et al., 1993). Assim, podemos inferir

que, por ter níveis constitutivos mais elevados de AsA, e por não modificar as concentrações de AsA em resposta a exposição ao O₃, a cultivar Iraí parece ser mais eficaz no processo de detoxificação das EAO geradas pela presença do O₃. Já na cultivar Fepagro 26, o tratamento com O₃ parece estimular a produção e /ou a movimentação do AsA do espaço intracelular para o apoplasto, na tentativa de aumentar a detoxificação celular das EAO. Sabe-se que, o fluxo de O₃ para o interior do tecido foliar é controlado pela taxa de regeneração do AsA, o que significa que quando as moléculas de O₃ não são detoxificadas, ficam livres para desencadear sua ação oxidativa, principalmente através da sua conversão em EAO (Di Baccio et al., 2008; van Hove et al., 2001; Smirnov, 1996). Mesmo que as plantas de Fepagro 26 expostas ao O₃ aumentem a concentração de AsA, a eficácia da sua capacidade antioxidante em responder ao fluxo de O₃ é provavelmente menor do que a da cultivar Iraí. Juntamente com os resultados do acúmulo foliar de EAO, podemos inferir que a capacidade antioxidante do AsA por unidade de fluxo de O₃ é reduzida na Fepagro 26 e, portanto, mais moléculas de O₃ devem estar livres para serem decompostas em EAO (H₂O₂ e O₂^{•-}) no interior do tecido foliar.

Porém, o papel antioxidante desempenhado pelo AsA está estritamente associado a capacidade da célula em mantê-lo em seu estado reduzido, o que ocorre através da ação do ciclo do AsA-GSH (Di Baccio et al., 2008; Noctor & Foyer, 1998b). Conforme relatado por vários outros estudos, a regeneração do AsA está intimamente ligada aos níveis de GSH intracelular, uma vez que este é responsável por fazer a reposição do *pool* de AsA reduzido no apoplasto (revisão ver Horemans et al., 2000b e Smirnov, 1996). Desse modo, a oxidação do AsA extracelular afeta as características do estado redox (grupamentos tióis) no meio intracelular. A análise dos níveis de tióis reduzidos totais indicam que, em ambas as variedades o *pool* antioxidante baseado nos grupamentos tióis não foi modificado pela exposição ao O₃ (artigo II, figura 3b). Entretanto, houve uma diferença significativa nos níveis endógenos entre as cultivares analisadas, sendo os valores encontrados na cultivar Fepagro 26 4,2 vezes maiores do que na cultivar Iraí. Com base em estudos recentes de proteômica que indicam que a regulação baseada nos grupamentos tióis desempenha um papel crítico na resposta das plantas à exposição O₃ (Galant et al., 2012; Gillespie et al., 2011), podemos sugerir que, num esforço para evitar alterações oxidativas deletérias em proteínas, as células do tecido foliar da Fepagro 26 tentam fazer a manutenção dos níveis de tióis totais como

um mecanismo de proteção contra danos oxidativos às enzimas envolvidas nos principais processos metabólicos.

A modulação na atividade das principais enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX, GR) em resposta a exposição ao O₃ já foi relatada para diferentes espécies vegetais (Calatayud et al., 2003; Heath, 2007; Pell et al., 1999). No entanto, as mudanças observadas na atividade das enzimas estão muitas vezes acompanhadas de alterações paralelas na expressão gênica dessas enzimas (Pasqualini et al., 2007; Pellinen et al., 2002; Torres et al., 2007). Assim, a análise dos resultados obtidos através da técnica de “Western blot” ampliou nosso entendimento sobre como a presença do O₃ modula diferentemente a atividade da CAT nas duas cultivares (artigo II, figura 4). De acordo com os resultados, o tratamento com O₃ eleva a quantidade da enzima CAT no meio intracelular nas folhas da cultivar Irai. Assim, o estímulo da resposta antioxidante enzimática nessa cultivar aumenta a capacidade de degradação do H₂O₂, o que ocorre tanto através do aumento da atividade da CAT (artigo I), como do aumento na quantidade de enzimas disponíveis para realizar essa degradação. Já para a cultivar Fepagro 26, nenhuma alteração na concentração da CAT foi observada. A CAT é uma das mais importantes enzimas utilizadas no processo de desintoxicação de H₂O₂ (Willekens et al., 1995), sendo que a única enzima de degradação do H₂O₂ que não necessita de equivalentes redutores para catalisar a reação de conversão do H₂O₂ à água (Sharma et al., 2012). As demais enzimas responsáveis por realizar também a degradação do H₂O₂ (peroxidases) necessitam de um agente redutor, que na maioria das vezes é o AsA (Mehlhorn et al., 1996), molécula antioxidante que pode ser facilmente oxidada sob condições de estresse, tais como a exposição ao O₃. Em suma, em um ambiente pró-oxidante, uma ação eficaz da CAT é fundamental para a manutenção do equilíbrio redox intracelular, o que, na cultivar Iraí, provavelmente contribui para evitar um desbalanço entre a produção e degradação das EAO.

Os resultados obtidos para os conteúdos de clorofila *a* e *b*, revelaram que a exposição ao O₃ induz uma perda significativa no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos apenas para a cultivar Fepagro 26 (artigo II, tabela 1). Sabe-se que, as modificações causadas nos componentes estruturais e funcionais dos cloroplastos são um dos principais efeitos prejudiciais do O₃ (Pell et al., 1994), afetando com isso a fotossíntese. Através da oxidação dos lipídios da membrana, o O₃ e as EAO derivadas dos mesmos, podem causar a ruptura das membranas biológicas, provocando alterações

irreversíveis nos componentes dos cloroplastos, como os tilacóides (Anderson et al., 2003; Calatayud et al., 2001, 2003), causando com isso a liberação das moléculas de clorofila aderidas aos mesmos, deixando-as assim livres para serem oxidadas pelas EAO presentes no ambiente intracelular (Ranieri et al., 2001; Sakaki et al., 1983). Assim, a diminuição no conteúdo de clorofila, observado na cultivar Fepagro 26, pode ser decorrente da oxidação das moléculas de clorofila ocasionado pelo desbalanço oxidativo gerado pela produção descontrolada de EAO. Tanto as alterações na permeabilidade de membrana, em decorrência do dano oxidativo aos lipídios (artigo I), como a diminuição na concentração dos principais pigmentos fotossintetizantes podem explicar como o O₃ induz um declínio na capacidade fotossintética. Através da análise de correlação entre a concentração proteica e a razão entre os níveis de clorofila *a/b* foi possível comprovar que, na cultivar Fepagro 26, a diminuição no conteúdo dos pigmentos responsáveis pela fotossíntese está associada a uma redução no conteúdo proteico total, evidenciando que a presença do O₃ pode afetar negativamente o crescimento dessas plantas.

Utilizando a análise de correlação podemos mostrar que, quando a razão de clorofila *a/b* está diminuída nas plantas de Fepagro 26 expostas ao O₃, a quantidade de proteína total é também reduzida (artigo II, figura 5). Tal relação não foi observada para a cultivar Iraí. A análise integrada dos resultados nos indica que, na cultivar Fepagro 26, a exposição ao O₃ ocasiona o acúmulo de EAO, o que pode causar a diminuição no conteúdo de clorofila, afetando o processo fotossintético e por final a aquisição de biomassa. Clebsch e colegas (2009), estudando diferentes variedades de feijão subtropicais, incluindo a Fepagro 26 e a Iraí, observaram que o tratamento com O₃ diminuiu a assimilação líquida de carbono em todas as variedades estudadas, menos na Iraí. Os autores ainda verificaram que a eficiência de carboxilação, que é considerada como sendo um dos principais fatores envolvidos na capacidade fotossintética (Pell et al., 1994), foi significativamente reduzida nas plantas de Fepagro 26 tratadas com O₃.

Com base nos resultados até aqui obtidos, podemos sugerir que a cultivar Fepagro 26 é mais propensa a sofrer os impactos negativos dos altos níveis de O₃ do que a cultivar Iraí, que parece ser uma variedade mais robusta. A maior sensibilidade da Fepagro 26 parece estar associada com um desbalanço na produção de EAO, o que acaba por criar um ambiente pró-oxidante no interior das células do tecido foliar. Aparentemente, tanto o sistema de defesa antioxidante enzimático (CAT), como o não-enzimático (AsA) são incapazes de manter a homeostase redox do meio intracelular,

causando danos oxidativos a moléculas estruturais, tais como os lipídios da membrana. A desestruturação da membrana pode ser a causa da perda de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e *b*), o que leva a uma redução na taxa de fotossíntese e afeta a aquisição de biomassa nas plantas de Fepagro 26, fato esse que pode ser indicado pela redução dos níveis totais de proteína. Ao contrário, a cultivar Iraí apresenta níveis endógenos de EAO mais elevados, e um sistema de defesa antioxidante preparado, e assim quando na presença do O₃, seu aparato antioxidante é prontamente estimulado e responde com maior rapidez, evitando o desbalanço no equilíbrio redox do meio intracelular e a propagação do dano oxidativo.

Estudos experimentais têm descrito que o a presença do O₃ pode comprometer a produção das principais culturas agrícolas do mundo. Reduções na altura das plantas, na área foliar, no teor de clorofila, na taxa fotossintética, na condutância estomática e na fluorescência da clorofila foram associadas com a diminuição no crescimento e na produtividade de duas importantes cultivares de arroz na Índia (*Oryza sativa* L. cvs Malviya dhan 36 e Shivani) (Sarkar & Agrawal, 2012). Além disso, estudos realizados com uma cultivar de soja (*Glycine max*) sensível ao O₃, demonstraram que a exposição ao O₃ afeta negativamente a eficiência das plantas em converter energia solar em biomassa, reduzindo a eficiência fotossintética e aumentando a taxa de respiração, o que contribui para a redução na produtividade da cultivar (Betzberger et al., 2012).

Sendo assim, compreender como as alterações moleculares e metabólicas desencadeadas por mudanças climáticas e como o aumento nas concentrações troposféricas de O₃ afetam a produtividade e qualidade das plantas utilizadas para agricultura tem se tornado essenciais nos últimos anos. Hoje, já se sabe que as plantas reagem ao O₃ através de uma gama variedade de estratégias de defesas que envolvem a modulação coordenada que inicia na percepção do estresse, transmite informações através das vias de sinalização e modula as respostas metabólicas, que em última análise, determinam a capacidade das plantas em lidar com o estresse (Castagna & Ranieri, 2009). Assim, o risco dos efeitos negativos do O₃ na produtividade de plantas utilizadas para agricultura poderá criar nos próximos anos, a necessidade de que novas variedades de culturas adaptadas ao O₃ sejam utilizadas nos sistemas de produção agrícola, como já ocorre no caso de pragas e doenças. Embora sejam poucas as evidências de que cultivares criadas em regiões com concentrações de O₃ mais elevadas sejam mais resistentes ao O₃, sabe-se que para as principais plantas utilizadas na

agricultura existe uma grande variação intra e inter-específicas com relação a sensibilidade ao O₃, e isso ocorre devido às variações intrínsecas (genotípicas) de cada cultivar em resistir ou não ao O₃, inclusive para plantas de feijão (Flowers et al., 2007). Assim, os efeitos do aumento das concentrações de O₃ no rendimento da colheita, na qualidade nutricional e na segurança alimentar podem, em princípio, ser reduzidos através da seleção e utilização de plantas que apresentem uma maior tolerância ao O₃ (The Royal Society, 2008). A busca por uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à tolerância ao O₃ possibilitará que o cultivo de plantas resistentes ao poluente seja realizado com segurança, especialmente em regiões cada vez mais poluídas, e onde a redução da poluição do ar ainda não se mostra suficientemente eficaz.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos na presente tese, concluí-se que:

- Considerando os parâmetros de estresse oxidativo avaliados no Artigo I (lipoperoxidação, atividade da catalase e capacidade antioxidante não-enzimática) as cultivares de *P. vulgaris* desenvolvidas pela Fepagro (Iraí, Fepagro 26, Guapo Brilhante e Macotaço) foram afetadas diferentemente pela exposição ao O₃.
- Quando comparada com a cultivar Pinto 111, sensível ao O₃, a cultivar Fepagro 26 apresentou mais sinais de danos oxidativos e alterações na capacidade antioxidante quando tratada com O₃. Ao contrário, na cultivar Iraí, ocorreu a modulação do sistema antioxidante em resposta ao O₃, o que evitou um aumento na oxidação dos lipídios.
- Os níveis endógenos de EAO são mais elevados na cultivar Iraí do que na Fepagro 26 e, após o tratamento com O₃, somente as plantas de Fepagro 26 acumulam níveis significativos de EAO no tecido foliar.
- As marcações *in situ* revelam que, na Fepagro 26, a exposição ao O₃ aumenta a produção de H₂O₂ e de O₂^{•-}, já nas folhas da cultivar Iraí, o tratamento com O₃ não modifica os níveis de H₂O₂, mas parece aumentar ligeiramente a produção de O₂^{•-}.
- Os níveis basais de AsA são significativamente maiores na cultivar Iraí, mas a concentração de grupamentos tióis é muito menor do que na Fepagro 26. A exposição da cultivar Fepagro 26 ao O₃ causa um aumento na concentração de AsA, indicando que há uma modulação do sistema antioxidante não-enzimático que utiliza a molécula de AsA.
- A cultivar Iraí, apesar de ter níveis endógenos da enzima catalase (imunoconteúdo) menores apresenta aumento, da atividade e da quantidade, da enzima em resposta ao tratamento com O₃. Já a cultivar Fepagro 26, não altera nem a atividade nem a concentração da enzima quando tratada com O₃.

- O conteúdo de clorofila *a* e *b* foram diminuídos após o tratamento com O₃ apenas para a cultivar Fepagro 26. A análise de correlação revelou que a diminuição na razão da de clorofila *a/b* nas plantas de Fepagro 26 expostas ao O₃ está positivamente correlacionada com a redução na concentração de proteínas totais.
- Embora os parâmetros aqui avaliados possam surgir como consequência de outros agentes de estresse ambiental, nossos dados fornecem resultados confiáveis sobre como o O₃ altera os parâmetros bioquímicos relacionados ao perfil redox e à capacidade antioxidante de duas cultivares de *P. vulgaris* desenvolvidas para o cultivo no sul do Brasil.
- Considerando os parâmetros aqui avaliados, podemos inferir que as características bioquímicas relacionadas à homeostase redox e a capacidade antioxidante da cultivar Iraí podem conferir a esta cultivar maior resistência ao O₃ do que a cultivar Fepagro 26, que parece ser mais sensível aos efeitos negativos do O₃.

6. PERSPECTIVAS

- Pretendemos aprofundar ainda mais os estudos sobre como o O₃ afeta a aquisição de biomassa. Para isso temos como metas avaliar a atividade da principal enzima envolvida na fixação de carbono em plantas, a Rubisco (ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase), bem como realizar análise da concentração e do perfil de expressão (PCR) dessa enzima em plantas expostas ao O₃.
- Para melhor caracterizar essas duas cultivares de acordo com sua O₃ suscetibilidade uma avaliação de sensibilidade dose-dependente será realizada para observar as respostas com relação à taxa de crescimento, os parâmetros de produtividade da planta e na qualidade dos grãos gerados deverão ser realizados.
- Como os precursores das vias metabólicas secundárias são originados dos produtos do metabolismo primário, um fator de estresse como o O₃ pode induzir desvios de recursos essenciais disponíveis para o crescimento para a síntese de metabólitos de defesa. Assim, pretendemos também avaliar as alterações nos níveis dos principais metabólitos secundários como os fitoesteróis e fenilpropanóides, conhecidos por sua capacidade antioxidante (Iriti et al., 2009; Saviranta et al., 2010)

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, P.D., Palmer, B., Houppis, J.L.J., Smith, M.K., Pushnik, J.C., 2003. Chloroplastic responses of ponderosa pine (*Pinus ponderosa*) seedlings to ozone exposure. *Environment International*. 29,407–413.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55,373–399.
- Ashmore, M.R., 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant Cell and Environment*. 28,949–964.
- Di Baccio, D., Castagna, A., Paoletti, E., Sebastiani, L., Ranier, A., Ranieri, A., 2008. Could the differences in O₃ sensitivity between two poplar clones be related to a difference in antioxidant defense and secondary metabolic response to O₃ influx? *Tree Physiology*. 28,1761–1772.
- Baier, M., Kandlbinder, A., Gollack, D., Dietz, K.-J., 2005. Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant, Cell and Environment*. 28,1012–1020.
- Barbosa, F.R., Gonzaga, A.C. de O., 2012. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. Documento EMBRAPA Arroz e Feijão. 247p.
- Bender, J., Weigel, H.-J., 2011. Changes in atmospheric chemistry and crop health: A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 31,81–89.
- Betzlberger, A.M., Yendrek, C.R., Sun, J., Leisner, C.P., Nelson, R.L., Ort, D.R., Ainsworth, E. a, 2012. Ozone exposure response for U.S. soybean cultivars: linear reductions in photosynthetic potential, biomass, and yield. *Plant physiology*. 160,1827–39.
- Biswas, D.K., Jiang, G.M., 2011. Differential drought-induced modulation of ozone tolerance in winter wheat species. *Journal of Experimental Botany*. 62,4153–4162.
- Black, V.J., Stewart, C.A., Roberts, J.A., Black, C.R., 2007. Ozone affects gas exchange, growth and reproductive development in *Brassica campestris* (Wisconsin Fast Plants). *New Phytologist*. 176,150–163.
- Booker, F.L., Miller, J.E., 1998. Phenylpropanoid metabolism and phenolic composition of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] leaves following exposure to ozone. *Journal of Experimental Botany*. 49,1191–1202.
- Booker, F.L., Muntifering, R., McGrath, M., Burkey, K., Decoteau, D., Fiscus, E., Manning, W., Krupa, S., Chappelka, A., Grantz, D., 2009. The Ozone Component of Global Change: Potential Effects on Agricultural and Horticultural Plant Yield,

- Product Quality and Interactions with Invasive Species. *Journal of Integrative Plant Biology*. 51,337–351.
- Burkey, K.O., Miller, J.E., Fiscus, E.L., 2005. Assessment of ambient ozone effects on vegetation using snap bean as a bioindicator species. *Journal of Environmental Quality*. 34,1081–1086.
- Bussotti, F., Desotgiu, R., Cascio, C., Strasser, R.J., Gerosa, G., Marzuoli, R., 2007. Photosynthesis responses to ozone in young trees of three species with different sensitivities, in a 2-year open-top chamber experiment (Curno, Italy). *Physiologia Plantarum*. 130,122–135.
- Calatayud, A., Alvarado, J.W., Barreno, E., 2001. Changes in chlorophyll a fluorescence, lipid peroxidation, and detoxification system in potato plants grown under filtered and non-filtered air in open-top chambers. *Photosynthetica*. 39,507–513.
- Calatayud, A., Barreno, E., 2004. Response to ozone in two lettuce varieties on chlorophyll a fluorescence, photosynthetic pigments and lipid peroxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42,549–555.
- Calatayud, A., Iglesias, D.J., Talon, M., Barreno, E., 2003. Effects of 2-month ozone exposure in spinach leaves on photosynthesis, antioxidant systems and lipid peroxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41,839–845.
- Calatayud, V., Cerveró, J., Sanz, M.J., Cervero, J., 2007. Foliar, physiological and growth responses of four maple species exposed to ozone. *Water Air and Soil Pollution*. 185,239–254.
- Calatayud, V., García-Breijo, F.J., Cervero, J., Reig-Armiñana, J., Sanz, M.J., 2011. Physiological, anatomical and biomass partitioning responses to ozone in the Mediterranean endemic plant *Lamottea diana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74,1131–1138.
- Cano, I., Calatayud, V., Cervero, J., Sanz, M.J., 2007. Ozone effects on three *Sambucus* species. *Environmental Monitoring and Assessment*. 128,83–91.
- Castagna, A., Ranieri, A., 2009. Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake to gene expression adjustment. *Environmental Pollution*. 157,1461–1469.
- CETESB, 2012. *Qualidade do ar no estado de São Paulo 2011*. 120p.
- Chameides, W.L., Saylor, R.D., Cowling, E.B., 1997. Ozone Pollution in the Rural United States and the New NAAQS. *Science*. 276,916–916.
- Chen, Z., Gallie, D.R., 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell*. 16,1143–1162.

- Clebsch, C.C., Junior, A.D., Divan Junior, A.M., Oliveira, P.L., Nicolau, M., 2009. Physiological disturbances promoted by ozone in five cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 21,319–329.
- Collins, W., Stevenson, D., Johnson, C., Derwent, R., 2000. The European regional ozone distribution and its links with the global scale for the years 1992 and 2015. *Atmospheric Environment*. 34,255–267.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, 2013. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_01_09_17_44_20_boletim_graos_janeiro_2013.pdf> Acessado em abril de 2013.
- 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 of the United States of America*. 93,9970–9974.
- Crutzen, P.J., Lawrence, M.G., Poschl, U., 1999. On the background photochemistry of tropospheric ozone. *Tellus Series a-Dynamic Meteorology and Oceanography*. 51,123–146.
- Crutzen, P.J., Oppenheimer, M., 2008. Learning about ozone depletion. *Climatic Change*. 89,143–154.
- D'Haese, D., Vandermeiren, K., Asard, H., Horemans, N., 2005. Other factors than apoplastic ascorbate contribute to the differential ozone tolerance of two clones of *Trifolium repens* L. *Plant Cell and Environment*. 28,623–632.
- Van Dingenen, R., Dentener, F.J., Raes, F., Krol, M.C., Emberson, L., Cofala, J., 2009. The global impact of ozone on agricultural crop yields under current and future air quality legislation. *Atmospheric Environment*. 43,604–618.
- Dizengremel, P., Le Thiec, D., Bagard, M., Jolivet, Y., 2008. Ozone risk assessment for plants: Central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environmental Pollution*. 156,11–15.
- Dizengremel, P., Le Thiec, D., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Vaultier, M.-N., Bagard, M., Jolivet, Y., 2009. Metabolic-dependent changes in plant cell redox power after ozone exposure. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*. 1,35–42.
- Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, C., Chétrit, P., Foyer, C.H., Paepe, R. De, 2003. Leaf Mitochondria Modulate Whole Cell Redox Homeostasis , Set Antioxidant Capacity , and Determine Stress Resistance through Altered Signaling and Diurnal Regulation. 15,1212–1226.
- Eltayeb, A.E., Kawano, N., Badawi, G.H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Morishima, I., Shibahara, T., Inanaga, S., Tanaka, K., 2006. Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. *Physiologia Plantarum*. 127,57–65.

- Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2003. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/index.htm>>. Acessado em abril de 2013.
- Feder, W.A., 1978. Plants as bioassay systems for monitoring atmospheric pollutants. *Environmental Health Perspectives*. 27,139–147.
- Feng, Z., Kobayashi, K., Ainsworth, E.A., 2008. Impact of elevated ozone concentration on growth, physiology, and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.): a meta-analysis. *Global Change Biology*. 14,2696–2708.
- Feng, Z., Kobayashi, K., 2009. Assessing the impacts of current and future concentrations of surface ozone on crop yield with meta-analysis. *Atmospheric Environment*. 43,1510–1519.
- Feng, Z.W., Jin, M.H., Zhang, F.Z., Huang, Y.Z., 2003. Effects of ground-level ozone (O_3) pollution on the yields of rice and winter wheat in the Yangtze River Delta. *Journal of Environmental Sciences (China)*. 15,360–362.
- Fenn, M.E., Bauer, L.I. de, Hernandez-Tejeda, T., 2002. *Urban Air Pollution and Forests Resources at Risk in the* ., Springer, EUA.
- FEPAM, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler do Rio Grande do Sul, 2003. Relatório da qualidade do ar 2001-2002. Porto Alegre. .
- FEPAM, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler do Rio Grande do Sul, 2013. Disponível em <http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/boletim_ar_automatica.asp> Acessado em abril de 2013.
- Finlayson-Pitts, B.J., Pitts Jr, J.N., 1997. Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science*. 276,1045–1052.
- Flowers, M.D., Fiscus, E.L., Burkey, K.O., Booker, F.L., Dubois, J.J.B., 2007. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and yield of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes differing in sensitivity to ozone. *Environmental and Experimental Botany*. 61,190–198.
- Foyer, C.H., Noctor, G.D., 2008. Redox Regulation in Photosynthetic Organsims: Signaling, Acclimation and Practical Implications. *Antioxidant Redox Signaling*. 11,861–905.
- Fuhrer, J., Booker, F., 2003. Ecological issues related to ozone: agricultural issues. *Environment international*. 29,141–54.
- Fuhrer, J., 2009. Ozone risk for crops and pastures in present and future climates. *Naturwissenschaften*. 96,173–194.

- Galant, A., Koester, R.P., Ainsworth, E. a, Hicks, L.M., Jez, J.M., 2012. From climate change to molecular response: redox proteomics of ozone-induced responses in soybean. *The New phytologist*. 194,220–9.
- Gillespie, K.M., Rogers, A., Ainsworth, E.A., 2011. Growth at elevated ozone or elevated carbon dioxide concentration alters antioxidant capacity and response to acute oxidative stress in soybean (*Glycine max*). *Journal of Experimental Botany*. 62,2667–78.
- Godzik, B., 1997. Section 1. Characterization of air pollution status of forests - Ground level ozone concentrations in the Krakow region, southern Poland. *Environmental Pollution*. 98,273–280.
- Grandjean, A., Fuhrer, J., 1989. Growth and leaf senescence in spring wheat (*Triticum aestivum*) grown at different ozone concentrations in open-top field chambers. *Physiologia Plantarum*. 77,389–394.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*. 32,481–494.
- Grünhage, L., Jäger, H.-J., 2003. From critical levels to critical loads for ozone: a discussion of a new experimental and modelling approach for establishing flux–response relationships for agricultural crops and native plant species. *Environmental Pollution*. 125,99–110.
- Haagen-Smit, A.J., Bradley, C.E., Fox, M.M., 1953. Ozone Formation in photochemical oxidation of organic substances. *Industrial and Engineering Chemistry*. 45,2086–2089.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free radicals in biology and medicine*. , Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell, B., 2006. Reactive Species and Antioxidants . *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life*. *Plant Physiology*. 141,312–322.
- Heath, R.L., 2007. Alterations of the biochemical pathways of plants by the air pollutant ozone: Which are the true gauges of injury? *The scientific world journal*. 7,110–118.
- Horemans, N., Foyer, C.H., Asard, H., 2000a. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science*. 5,263–267.
- Horemans, N., Foyer, C.H., Potters, G., Asard, H., 2000b. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38,531–540.
- Hrapsky, A., Counselor, A., Morin, J., 2010. Brazilian Dry Bean Production. USDA Foreign Agricultural Service, Global Agricultural Information Network - Grain Report.1–6.

- Iglesias, D.J., Calatayud, A., Barreno, E., Primo-Millo, E., Talon, M., 2006. Responses of citrus plants to ozone: leaf biochemistry, antioxidant mechanisms and lipid peroxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44,125–131.
- Iriti, M., Faoro, F., 2008. Oxidative stress, the paradigm of ozone toxicity in plants and animals. *Water Air and Soil Pollution*. 187,285–301.
- Iriti, M., Di Maro, A., Bernasconi, S., Burlini, N., Simonetti, P., Picchi, V., Panigada, C., Gerosa, G., Parente, A., Faoro, F., 2009. Nutritional traits of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds from plants chronically exposed to ozone pollution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57,201–8.
- Kanofsky, J.R., Sima, P.D., Kanofsky, J R; Sima, P., 1995. Singlet oxygen generation from the reaction of ozone with plant leaves. *Journal of Biological Chemistry*. 270,7850–7852.
- Korkina, G., 2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cellular and Molecular Biology*. 53,15–25.
- Krupa, S., McGrath, M.T., Andersen, C.P., Booker, F.L., Burkey, K.O., Chappelka, A.H., Chevone, B.I., Pell, E.J., Zilinskas, B.A., 2001. Ambient ozone and plant health. *Plant Disease*. 85,4–12.
- Leitao, L., Dizengremel, P., Biolley, J.-P.P., 2008. Foliar CO₂ fixation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) submitted to elevated ozone: Distinct changes in Rubisco and PEPc activities in relation to pigment content. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 69,531–540.
- Lelieveld, J., Crutzen, P.J., 1994. Role of Deep Cloud Convection in the Ozone Budget of the Troposphere. *Science*. 264,1759–1761.
- Luwe, M., Takahama, U., Heber, U., 1993. Role of Ascorbate in Detoxifying Ozone in the Apoplast of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Leaves. *Plant physiology*. 101,969–976.
- Mahalingam, R., Jambunathan, N., Gunjan, S.K., Faustin, E., Weng, H., Ayoubi, P., 2006. Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment*. 29,1357–1371.
- MAPA, O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>> Acessado em abril de 2013.
- Matyssek, R., Sandermann, H., Wieser, G., Booker, F., Cieslik, S., Musselman, R., Ernst, D., 2008. The challenge of making ozone risk assessment for forest trees more mechanistic. *Environmental pollution (Barking, Essex)*. 156,567–82.
- Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H.G., Foyer, C.H., 1996. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *Febs Letters*. 378,203–206.

- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G., 2010. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*. 61,4197–220.
- Mills, G., Buse, A., Gimeno, B., Bermejo, V., Holland, M., Emberson, L., Pleijel, H., 2007. A synthesis of AOT40-based response functions and critical levels of ozone for agricultural and horticultural crops. *Atmospheric Environment*. 41,2630–2643.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7,405–410.
- Moreno, J., García-Murria, M.J., Marín-Navarro, J., 2008. Redox modulation of Rubisco conformation and activity through its cysteine residues. *Journal of Experimental Botany*. 59,1605–14.
- Mulholland, J.A., Butler, A.J., Wilkinson, J.G., Russell, A.G., Tolbert, P.E., 1998. Temporal and spatial distributions of ozone in Atlanta: Regulatory and epidemiologic implications. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 48,418–426.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.P., 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 129,185–195.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998a. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49,249–279.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998b. Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma-glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: Comparison with two other assay methods for glutathione. *Analytical Biochemistry*. 264,98–110.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H., 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany*. 53,1283–1304.
- Ollerenshaw, J., Lyons, T., Barnes, J., 1999. Impacts of ozone on the growth and yield of field-grown winter oilseed rape. *Environmental Pollution*. 104,53–59.
- Pasqualini, S., Paolocci, F., Borgogni, A., Morettini, R., Ederli, L., 2007. The overexpression of an alternative oxidase gene triggers ozone sensitivity in tobacco plants. *Plant Cell and Environment*. 30,1545–1556.
- Pell, E.J., Eckardt, N.A., Glick, R.E., 1994. Biochemical and Molecular-Basis for Impairment of Photosynthetic Potential. *Photosynthesis Research*. 39,453–462.
- Pell, E.J., Schlagnhauser, C.D., Arteca, R.N., 1997. Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum*. 100,264–273.

- Pell, E.J., Sinn, J.P., Brendley, B.W., Samuelson, L., Vinten-Johansen, C., Tien, M., Skillman, J., 1999. Differential response of four tree species to ozone-induced acceleration of foliar senescence. *Plant Cell and Environment*. 22,779–790.
- Pellinen, R.I., Korhonen, M., Tauriainen, A.A., Palva, E.T., Kangasja, J., 2002. Hydrogen Peroxide Activates Cell Death and Defense Gene Expression in Birch 1. *Plant Physiology*. 130,549–560.
- Pelloux, J., Jolivet, Y., Fontaine, V., Banvoy, J., Dizengremel, P., Forestière, L.D.B., Inra, U.C., I, U.H.P., Sciences, F., 2001. Changes in Rubisco and Rubisco activase gene expression and polypeptide content in *Pinus halepensis* M. subjected to ozone and drought. *Physiologia Plantarum*. 105,123–131.
- Peters, J.L., Castillo, F.J., Heath, R.L., 1989. Alteration of Extracellular Enzymes in Pinto Bean Leaves upon Exposure to Air Pollutants, Ozone and Sulfur Dioxide. *Plant physiology*. 89,159–64.
- Piana, C.F. de B., Antunes, I.F., Silva, J.G.C. da, Silveira, E.P., 1999. Adaptabilidade e estabilidade do rendimento de grãos de genótipos de feijão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 34,553–564.
- Piikki, K., De Temmerman, L., Ojanperä, K., Danielsson, H., Pleijel, H., 2008. The grain quality of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to elevated ozone uptake and carbon dioxide exposure. *European Journal of Agronomy*. 28,245–254.
- Pryor, W.A., Church, D.F., Das, B., 1991. Aldehydes and Hydrogen-Peroxide as Mediators of Ozone Toxicity. *Faseb Journal*. 5,A1156–A1156.
- Puckette, M.C., Tang, Y., Mahalingam, R., 2008. Transcriptomic changes induced by acute ozone in resistant and sensitive *Medicago truncatula* accessions. *BMC Plant Biology*. 8,46.
- Puckette, M.C., Weng, H., Mahalingam, R., 2007. Physiological and biochemical responses to acute ozone-induced oxidative stress in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45,70–79.
- Ranieri, A., Castagna, A., Padu, E., Moldau, H., Rahi, M., Soldatini, G.F., 1999. The decay of O₃ through direct reaction with cell wall ascorbate is not sufficient to explain the different degrees of O₃-sensitivity in two poplar clones. *Journal of Plant Physiology*. 154,250–255.
- Ranieri, A., Giuntini, D., Ferraro, F., Nali, C., Baldan, B., Lorenzini, G., Soldatini, G.F., Soldatini, F., 2001. Chronic ozone fumigation induces alterations in thylakoid functionality and composition in two poplar clones. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39,999–1008.
- Ribeiro, N.D., Jost, E., Possebon, S.B., Cargnelutti Filho, A., 2004. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares registradas de feijão em diferentes épocas de semeadura para a depressão central do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*. 34,1395–1400.

- Ribeiro, N.D., De Souza, J.F., Antunes, I.F., Poersch, N.L., 2009. Estabilidade de produção de cultivares de feijão de diferentes grupos comerciais no estado do Rio Grande do Sul. *Bragantia*. 68,339–346.
- Sakaki, T., Kondo, N., Sugahara, K., 1983. Breakdown of photosynthetic pigments and lipids in spinach leaves with ozone fumigation: Role of active oxygens. *Physiologia Plantarum*. 59,28–34.
- Sarkar, A., Agrawal, S.B., 2012. Evaluating the response of two high yielding Indian rice cultivars against ambient and elevated levels of ozone by using open top chambers. *Journal of environmental management*. 95 Suppl,S19–24.
- Sarkar, A., Rakwal, R., Agrawal, S.B., Shibato, J., Ogawa, Y., Yoshida, Y., Agrawal, G.K., Agrawal, M., 2010. Investigating the Impact of Elevated Levels of Ozone on Tropical Wheat Using Integrated Phenotypical , Physiological , Biochemical , and Proteomics Approaches research articles. *Journal of Proteome Research*. 9,4565–4584.
- Saviranta, N.M.M., Julkunen-Tiitto, R., Oksanen, E., Karjalainen, R.O., 2010. Leaf phenolic compounds in red clover (*Trifolium pratense* L.) induced by exposure to moderately elevated ozone. *Environmental pollution (Barking, Essex)*. 158,440–6.
- Schraudner, M., Langebartels, C., Sandermann, H., 1997. Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environmental pollutant ozone. *Physiologia Plantarum*. 100,274–280.
- Sharma, P., Ambuj, B.J., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. 2012,1–26.
- Sharma, Y.K., Davis, K.R., 1997. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology and Medicine*. 23,480–488.
- Silva, M.A. V., 2006. Disponível em
<http://www.agritempo.gov.br/publish/publicacoes/livros/METEOROLOGIA_E_CLIMATOLOGIA_VD2_Mar_2006.pdf> Acessado em abril de 2013.
- Smirnoff, N., 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*. 78,661–669.
- Souza, T.L.P.O. de, Alzate-Marin, A.L., Moreira, M.A., Barros, E.G. de, 2005. Análise comparativa da variabilidade patogênica de *Uromyces appendiculatus* em algumas regiões brasileiras. *Fitopatologia Brasileira*. 30,143–149.
- Tai, H.H., Percy, K.E., Karnosky, D.F., 2010. DNA damage in *Populus tremuloides* clones exposed to elevated O₃. *Environmental pollution (Barking, Essex)*. 158,969–76.
- The Royal Society, 2008. Ground-level ozone in the 21st century: future trends , impacts and policy implications *Science Policy*. 148.

- Torres, N.L., Cho, K., Shibato, J., Hirano, M., Kubo, A., Masuo, Y., Iwahashi, H., Jwa, N.S., Agrawal, G.K., Rakwal, R., 2007. Gel-based proteomics reveals potential novel protein markers of ozone stress in leaves of cultivated bean and maize species of Panama. *Electrophoresis*. 28,4369–4381.
- Tuzet, A., Perrier, A., Loubet, B., Cellier, P., 2011. Modelling ozone deposition fluxes: The relative roles of deposition and detoxification processes. *Agricultural and Forest Meteorology*. 151,480–492.
- Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H.K., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F., 2004. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 39,45–58.
- Van Hove, L.W., Bossen, M.E., San Gabino, B.G., Sgreva, C., 2001. The ability of apoplastic ascorbate to protect poplar leaves against ambient ozone concentrations: a quantitative approach. *Environmental pollution (Barking, Essex)*. 114,371–82.
- Vingarzan, R., 2004. A review of surface ozone background levels and trends. *Atmospheric Environment*. 38,3431–3442.
- Vorne, V., Ojanperä, K., De Temmerman, L., Bindi, M., Högy, P., Jones, M., Lawson, T., Persson, K., 2002. Effects of elevated carbon dioxide and ozone on potato tuber quality in the European multiple-site experiment “CHIP-project”. *European Journal of Agronomy*. 17,369–381.
- Wang, Y., Frei, M., 2011. Stressed food – The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 141,271–286.
- WHO, World Health Organization, 2005. Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide - Summary of risk assessments (Global update 2005). 74p.
- Willekens, H., Inzé, D., Montagu, M., Camp, W., 1995. Catalases in plants. *Molecular Breeding*. 1,207–228.
- Wohlgemuth, H., Mittelstrass, K., Kschieschan, S., Bender, J., Weigel, H.-J., Overmyer, K., Kangasjärvi, J., Sandermann, H., Langebartels, C., 2002. Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant, Cell and Environment*. 25,717–726.
- Yi, H., Galant, A., Ravilious, G.E., Preuss, M.L., Jez, J.M., 2010. Sensing sulfur conditions: simple to complex protein regulatory mechanisms in plant thiol metabolism. *Molecular Plant*. 3,269–79.
- Zhang, N., Kallis, R.P., Ewy, R.G., Portis, A.R., 2002. Light modulation of Rubisco in *Arabidopsis* requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99,3330–4.