

ORIGINAL ARTICLE

**Resistance of Winter Wheat Seedlings to Short-term Freezing
Temperature Influence May be Determined by Activation of Uncoupling
Protein and ATP/ADP Antiporter**

O.I. Grabelnych^{1,2*}, O.A. Borovik¹, N.S. Pavlovskaya^{1,2},
T.P. Pobezhimova¹, I.V. Lyubushkina^{1,2}, A.V. Korsukova^{1,2},
E.L. Tauson¹, V.K. Voinikov¹

¹ *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of RAS, Irkutsk, Russia*

² *Irkutsk State University, Irkutsk, Russia*

*E-Mail: grolga@sifibr.irk.ru

Received July 30, 2013

Aftereffect of freezing temperature (-8 ° C, 1-6 h) on the content of reactive oxygen species (ROS), intactness mitochondria, their oxidative and phosphorylating activity and the contribution of uncoupling proteins (UCPs) and ATP/ADP antiporter to linoleate-induced mitochondrial respiration in winter wheat seedlings have been studied. It has been shown that the survival of seedlings during cold exposure is dependent on the activity of pUCP and ATP/ADP antiporter in mitochondria, the function of which under cold stress is probably the regulation of ROS content.

Key words: cold stress, reactive oxygen species, mitochondria, ATP/ADP antiporter, uncoupling proteins, Triticum aestivum L.

ORIGINAL ARTICLE

**Устойчивость Проростков Озимой Пшеницы к Кратковременному
Действию Отрицательной Температуры Может Быть Обусловлена
Активацией Разобщающих Белков и АТФ/АДФ Антипортера**

О.И. Грабельных^{1,2*}, О.А. Боровик¹, Н.С. Павловская^{1,2},
Т.П. Побежимова¹, И.В. Любушкина^{1,2}, А.В. Корсукова^{1,2},
Е.Л. Таусон¹, В.К. Войников¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской Академии наук, 664033, Иркутск, Россия

² ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

*E-Mail: grolga@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 30 июля 2013 г.

Изучено последствие отрицательной температуры (-8 °С, 1-6 ч) на содержание активных форм кислорода (АФК), интактность митохондрий, их окислительную и фосфорилирующую активность и вклад разобщающих белков (UCPs) и АТФ/АДФ антипортера в линолеат-индуцированное дыхание митохондрий в проростках озимой пшеницы. Показано, что выживаемость проростков при холодовом воздействии зависит от активности рUCP и АТФ/АДФ антипортера в митохондриях, функцией которых при холодовом стрессе, по-видимому, является регуляция содержания АФК.

Key words: cold stress, reactive oxygen species, mitochondria, ATP/ADP antiporter, uncoupling proteins, Triticum aestivum L.

Ранее было показано, что кратковременная обработка отрицательной температурой вызывает переход митохондрий морозоустойчивых злаков в низкоэнергетическое состояние, сменяющееся при увеличении длительности охлаждения снижением окислительной и фосфорилирующей активности органелл (Войников, 1987). В митохондриях неустойчивых к морозу злаков

такая реакция на охлаждение отсутствовала, что позволило предположить наличие генетического контроля за функционированием митохондрий при низкотемпературном стрессе (Войников, 1987). Предполагалось, и было доказано с использованием ингибиторов, что переход митохондрий в низкоэнергетическое состояние обусловлен разобщающим действием эндогенных свободных жирных кислот (СЖК)

(Войников, 1987). Разобшение окислительного фосфорилирования, обусловленное СЖК, является механизмом адаптации к холодовому, гиперосмотическому, окислительному и другим стрессам как в митохондриях животных, так и у растений (Войников, 1987; Скулачев *и др.*, 2010; Nantes *et al.*, 1999; Casolo *et al.*, 2000; Pastore *et al.*, 2000; Popov *et al.*, 2002). Образование эндогенных СЖК возможно осуществляется с участием недавно обнаруженной в митохондриях растений фосфолипазы A₂ (Tropea *et al.*, 2013). У растений показана роль СЖК в разобшении окислительного фосфорилирования митохондрий посредством нескольких механизмов, в том числе за счет активации ими АТФ/АДФ антипортера (Vianello *et al.*, 1994; Saviani and Martins, 1998; Popov *et al.*, 2002) и рUCP (plant Uncoupling Protein)-подобных белков (Vercesi *et al.*, 1995, 2006; Ježek *et al.*, 1996; Nantes *et al.*, 1999; Borecky *et al.*, 2001; Hourton-Cabassa *et al.*, 2002; Navet *et al.*, 2005). Нами показано, что вклад разобщающих белков и АТФ/АДФ антипортера в разобшение насыщенными и ненасыщенными СЖК в митохондриях озимой пшеницы неодинаков: активность разобщающих белков в основном обеспечивается ненасыщенными СЖК, в то время как АТФ/АДФ антипортера – насыщенными (Грабельных *и др.*, 2009). UCP1 озимой пшеницы кодируется генами *WhUCP1a* и *WhUCP1b* и, хотя их индукцию под действием низкой температуры не наблюдали (Murayama and Handa, 2000), в промоторной области другого гена *AtUCP1*, кодирующего UCP1 у арабидопсиса, идентифицированы АБК-связанный элемент (ABRE) и четыре G-box элемента (Nogueira *et al.*, 2011). Присутствие таких регуляторных элементов согласуется с индукцией синтеза UCP1 и увеличением его

активности при длительном действии низкой положительной температуры, что было обнаружено у арабидопсиса (Maia *et al.*, 1998; Armstrong *et al.*, 2008; Hourton-Cabassa *et al.*, 2009; Figuera and Arruda, 2011), картофеля (Nantes *et al.*, 1999; Calegario *et al.*, 2003) и арахиса (Valente *et al.*, 2012). Увеличение активности АТФ/АДФ антипортера при низкой положительной температуре показано в митохондриях клубней картофеля (Popov *et al.*, 2002), в митохондриях из проростков кукурузы (De Santis *et al.*, 1999), а его экспрессия - в суспензионной культуре клеток риса (Hashimoto *et al.*, 1993). В то же время отсутствуют данные о функционировании этих белков у растений при отрицательных температурах. Поскольку митохондрии морозоустойчивых озимых злаков при кратковременном холодовом стрессе переходят в низкоэнергетическое состояние, связанное с увеличением содержания СЖК (Войников, 1987), то мы предположили, что в этом механизме задействованы разобщающие белки и АТФ/АДФ антипортер. В связи с этим, целью нашего исследования явилось изучение функционирования разобщающих белков и АТФ/АДФ антипортера в митохондриях из проростков озимой пшеницы, подвергнутых кратковременной обработке отрицательной температурой (-8 °C).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили этилированные проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Иркутская), выращенные на влажной фильтровальной бумаге при 25-26 °C в темноте в течение 3 суток. 3-х суточные проростки подвергали действию отрицательной температуры -8 °C в течение 1, 3 и 6 часов. Одну часть проростков оттаивали и

оставляли на отрастание для определения выживаемости. Другую часть проростков использовали для определения содержания АФК и выделения митохондрий.

Общее содержание АФК в тканях побегов определяли с использованием 2',7'-дихлорофлуоресцеин диацетата (H₂DCF-DA) по методике, опубликованной ранее (Корсукова *и др.*, 2013). Флуоресценцию DCF измеряли на спектрофлуорофотометре RF-5301PC (SHIMADZU, Япония).

Митохондрии из побегов проростков выделяли по методике, опубликованной ранее (Грабельных *и др.*, 2011). Скорость поглощения кислорода митохондриями измеряли с использованием кислородного электрода Кларка на полярографе ОН-105 (Венгрия) при 26 °С. Реакционная среда содержала 300 мМ сахарозу, 10 мМ КСl, 18 мМ КН₂РO₄, 1 мМ MgCl₂, 5 мМ ЭДТА, рН 7.4. Интактность внешней мембраны митохондрий определяли по скорости аскорбат-зависимого стимулируемого цитохромом с KCN-чувствительного поглощения кислорода в отсутствие и присутствии 0.04% Тритона X-100. Параметры окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий рассчитывали из полярограмм: состояние 3 (V₃) – скорость поглощения кислорода при фосфорилировании АДФ, состояние 4 (V₄) – скорость поглощения кислорода после истощения АДФ, дыхательный контроль по Чансу и Вильямсу ($DК=V_3/V_4$), V_{олиго} – скорость нефосфорилирующего дыхания, вызванная добавлением ингибитора АТФ-синтазы олигомицина (2,5 мкг/мг белка митохондрий) к митохондриям в состоянии 3, отношение АДФ/О – отношение фосфорилированного АДФ к количеству утилизированного при этом

кислорода (Estabrook, 1967). В качестве субстрата окисления использовали 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата. Максимальную скорость окисления малата измеряли в присутствии 100 мкМ АДФ. Концентрацию митохондриального белка определяли согласно методу Лоури (Lowry *et al.*, 1951).

Активацию АТФ/АДФ антипортера и UCP-подобных разобщающих белков вызывали инкубацией митохондрий с линолевой кислотой (10 мкМ), а вклад этих белков в линолеат-индуцированное дыхание – последовательным добавлением ингибиторов АТФ/АДФ антипортера (2 мкМ карбоксиатрактилозида) и разобщающих белков (2 мМ ГДФ или 2 мМ АТФ).

Белок из суспензии митохондрий экстрагировали буфером, содержащим 62.5 мМ Трис-НСl (рН 6.8), 1 мМ ЭДТА, 1% ДДС-На, 20% глицерин, 5% β-меркаптоэтанол и 0.001% бромфеноловый синий, и инкубировали 5 мин при 97 °С. После центрифугирования (10000g, 15 мин) супернатант использовали для электрофореза и вестерн-блоттинга. Белки фракционировали электрофоретически в 12,5%-ном ПААГе с ДДС-На в модифицированной системе Laemmli (Laemmli, 1970), используя Mini-PROTEAN 3 Electrophoretic Cell (BIO-RAD, США). Перенос анализируемых белков на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma, США) проводили в Towbin-буфере (25 мМ Трис-НСl (рН 9,2), 192 мМ глицин, 10% метанол) в соответствии с рекомендациями фирмы производителя, используя Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, США). В работе использовали антитела против UCP1/2 (AS12 1850, Agrisera, Швеция), порина (любезно предоставленные Prof. T. Elthon, University of Nebraska, США) (Armstrong *et al.*, 2008),

цитохрома *c* (7Н8.2С12, Pharmingen, США).

Проводили не менее трех независимых экспериментов. Представлены средние арифметические значения и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На основе анализа жизнеспособности проростков озимой пшеницы в качестве отрицательной температуры в работе была выбрана температура -8°C , одночасовое охлаждение при которой не вызывает снижения жизнеспособности проростков, в то время как повышение длительности воздействия до 3 часов приводит к снижению жизнеспособности на 29%, а до 6 часов - к полной гибели проростков (табл. 1). При этом одночасовое воздействие не сопровождалось значительным повышением содержания АФК в тканях побегов и снижением интактности изолированных из побегов митохондрий, в то время как 3 и особенно 6 часов обработки приводили к увеличению содержания АФК в тканях побегов и снижению интактности митохондрий (табл. 1).

С помощью антител против UCP1/2 показано некоторое повышение содержания UCP в митохондриях озимой пшеницы после 1 часа обработки проростков, а затем снижение, особенно выраженное в митохондриях, изолированных из проростков, подвергнутых 6 часовой обработке (рис. 1, *a*). Обработка отрицательной температурой в течение 6 часов приводила к значительной элиминации цитохрома *c* из митохондрий (рис. 1, *a*), что, по-видимому, было обусловлено нарушением интактности этих органелл (табл. 1). Действие температуры -8°C на проростки в течение 1 часа сопровождалось увеличением скоростей дыхания в состояниях 3 и 4 у митохондрий,

выделенных из побегов этих проростков, а также снижением величины отношения АДФ/О (рис. 1, *b*). При этой температуре линолевая кислота вызывала более существенную стимуляцию скорости нефосфорилирующего дыхания, которая была связана с возрастанием активности как АТФ/АДФ антипортера (в 2.5 раза по сравнению с контрольными митохондриями), так и рUCPs (в 1.8 раза по сравнению с контрольными митохондриями) (рис. 2). Увеличение длительности обработки до 3 часов сопровождалось снижением скоростей дыхания митохондрий, в основном, скорости дыхания в состоянии 3 и падением величин коэффициента ДК и отношения АДФ/О (рис. 1, табл. 1). При этом также снижалось линолеат-индуцированное дыхание и вклад АТФ/АДФ антипортера и рUCPs (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют, что только при холодовом стрессе, вызванном обработкой проростков -8°C в течение 1 часа, происходит активация линолеат-индуцированного дыхания, чувствительного к карбоксиатрактилозиду и ГДФ (АТФ). В то же время холодовой шок, вызванный обработкой проростков температурой -8°C в течение 3 и 6 часов, которая приводила к частичной (3-х часовое воздействие) или полной (6-ти часовое воздействие) гибели проростков, вызывал повреждение окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий, опосредованное действием АФК, которое сопровождалось снижением содержания цитохрома *c* в митохондриях. Таким образом, стимуляция дыхания ненасыщенными СЖК может представлять собой защитный механизм, обеспечивающий выживание растений на начальном этапе действия отрицательной температуры.

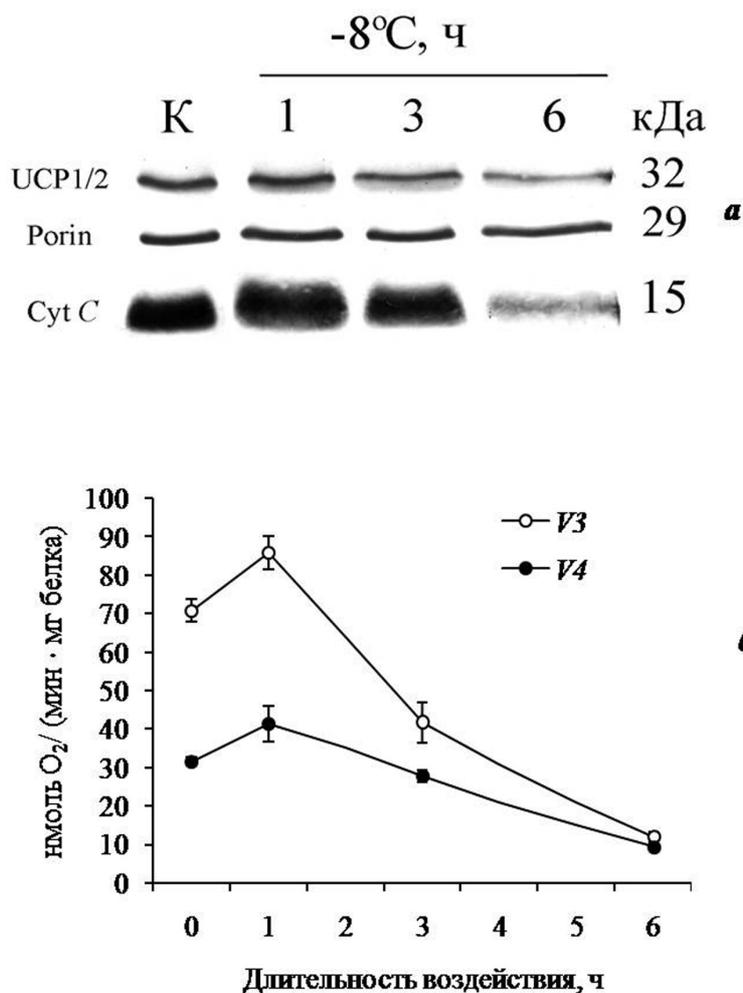


Рисунок 1. Изменения в содержании митохондриальных белков (а) и скорости дыхания в состояниях 3 и 4 (б) в митохондриях озимой пшеницы, изолированных из проростков, подвергнутых действию отрицательной температуры -8 °С.

Обозначения: К (контроль) – до воздействия отрицательной температурой.

Таблица 1. Изменение параметров функциональной активности митохондрий, содержания АФК и выживаемости проростков озимой пшеницы после действия на проростки отрицательной температуры -8 °С длительностью 1-6 часов

Длительность обработки (часы)	Параметры изолированных митохондрий			Содержание АФК в побегах** (%)	Выживаемость проростков (%)
	КДК*	АДФ/О	Интактность (%)		
0	2.25±0.25	2.13±0.18	96.1±1.8	100	100
1	2.11±0.34	1.45±0.17	93.5±2.8	133.7±2.6	100
3	1.50±0.10	1.57±0.04	80.5±5.4	182.1±3.3	71
6	1.29±0.05	1.03±0.05	68.8±9.2	230.1±19.3	0

Примечание. *КДК – коэффициент ДК; ** - за 100% принято содержание АФК в тканях побегов проростков, не подвергнутых действию отрицательной температуры.

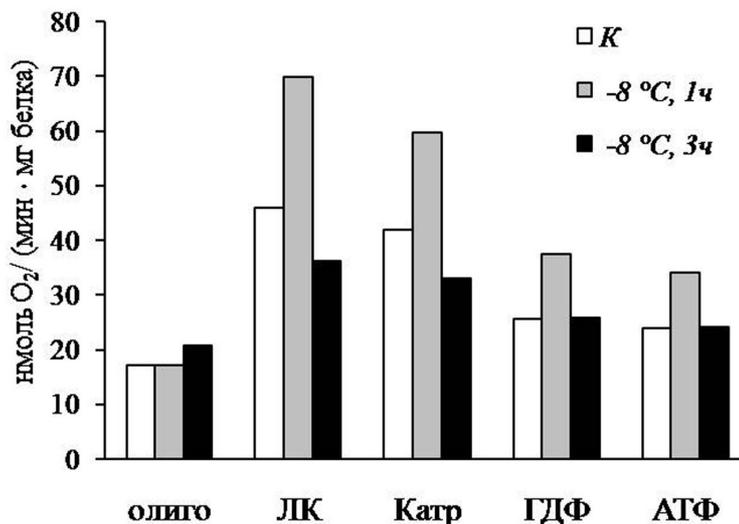


Рисунок 2. Влияние линолевой кислоты и ингибиторов АТФ/АДФ антипортера и UCPs на скорость нефосфорилирующего дыхания в митохондриях озимой пшеницы, изолированных из проростков, подвергнутых действию отрицательной температуры -8°C . Последовательность добавления соединений указана слева направо. Представлены данные типичного эксперимента.

Обозначения: К (контроль) – до воздействия отрицательной температурой, олиго – скорость нефосфорилирующего дыхания, вызванная добавлением ингибитора АТФ-синтазы олигомицина (2.5 мкг/мг белка митохондрий), ЛК – скорость нефосфорилирующего дыхания в присутствии 10 мкМ линолевой кислоты, Катр – скорость дыхания после добавления 2 мкМ карбоксиатрактилозида, ГДФ, АТФ – скорость дыхания после добавления 2 мМ ГДФ или 2 мМ АТФ.

У растений показано участие UCP-подобных белков в термогенезе (Onda *et al.*, 2008), в предотвращении окислительного стресса (Brandlise *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; Vegcy *et al.*, 2011), в поддержании работы цикла Кребса (Smith *et al.*, 2004) и фотосинтетического метаболизма (Sweetlove *et al.*, 2006) в листьях растений на свету. Как известно, АТФ/АДФ антипортер и UCP-подобные белки катализируют протонную проводимость через митохондриальные мембраны и рассеивают протонный градиент (Скулачев *и др.*, 2010). При этом некоторое повышение протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий представляет собой механизм «мягкого» разобщения, важной физиологической функцией которого у

млекопитающих является продукция тепла для поддержания необходимой температуры тела при низкой температуре и снижение генерации $\text{O}_2^{\cdot -}$ дыхательной цепью (Скулачев *и др.*, 2010). Поскольку в промоторных областях генов *AtUCP1* и *AtUCP2* обнаружен ABRE-элемент (Nogueira *et al.*, 2011), эти данные предполагают, что активация синтеза UCP1/2 является ответной реакцией на холодовой стресс, а, следовательно, эти белки могут выполнять защитную роль при действии низких температур на растения. При этом рUCP и АТФ/АДФ антипортер вносят свой вклад в разобщение не только при длительном действии низкой положительной температуры, но, согласно нашим данным, и при кратковременном действии отрицательной температуры.

ACKNOWLEDGEMENT

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 8266.

ЛИТЕРАТУРА

- Войников, В.К. (1987) Температурный стресс и митохондрии растений. Новосибирск, 133 с.
- Грабельных, О.И., Пивоварова, Н.Ю., Побежимова, Т.П., Колесниченко, А.В., Войников, В.К. (2009) Роль свободных жирных кислот в энергетическом метаболизме митохондрий проростков озимой пшеницы. *Физ. раст.*, **56**, 369–381.
- Грабельных, О.И., Побежимова, Т.П., Павловская, Н.С., Королева, Н.А., Боровик, О.А., Любушкина, И.В., Войников, В.К. (2011) Антиоксидантная функция альтернативной оксидазы в митохондриях озимой пшеницы при холодовом закаливании. *Биол. мембраны*, **28**, 274–283.
- Корсукова, А.В., Грабельных, О.И., Побежимова, Т.П., Королева, Н.А., Федосеева, И.В., Павловская, Н.С., Любушкина, И.В., Боровик, О.А., Федяева, А.В., Возненко, С.А., Ильюшнева, Э.М., Войников, В.К. (2013) Холодовое закаливание предотвращает индуцированную перекисью водорода программируемую клеточную гибель в колеоптилях кукурузы. *Журнал стресс-физиологии и биохимии*, **9**, 246–257.
- Скулачев, В.П., Богачев, А.В., Каспаринский, Ф.О. (2010) Мембранная биоэнергетика: Учебное пособие. М.: Издательство Московского университета, 368 с.
- Armstrong, A.F., Murray, R.B., Day, D.A., Barthet, M.M., Smith, P.M.C., Millar, A.H., Whelan, J. and Atkin, O.K. (2008) Dynamic changes in the mitochondrial electron transport chain underpinning cold acclimation of leaf respiration. *Plant, Cell and Environment*, **31**, 1156–1169.
- Begcy, K., Mariano, E.D., Mattiello, L., Nunes, A.V., Mazzafera, P., Maia, I.G. and Menossi, M. (2011) An *Arabidopsis* mitochondrial uncoupling protein confers tolerance to drought and salt stress in transgenic tobacco plants. *Plas One*, **6**, 23776.
- Borecký, J., Maia, I.G., Costa, A.D., Jezek, P., Chaimovich, H., de Andrade, P.B., Vercesi, A.E. and Arruda, P. (2001) Functional reconstitution of *Arabidopsis thaliana* plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMP) expressed in *E. coli*. *FEBS Lett.*, **505**, 240–244.
- Brandalise, M., Maia, I.G., Borecký, J., Vercesi, A.E. and Arruda, P. (2003) Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **35**, 203–209.
- Calegario, F.F., Cosso, R.G., Fagian, M.M., Almeida, F.V., Jardim, W.F., Jezek, P., Arruda, P. and Vercesi, A.E. (2003) Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **35**, 211–220.
- Casolo, V., Bradot, E. and Chiandussi, E. (2000) The role of mild uncoupling and non-coupled respiration in the regulation of hydrogen peroxide generation by plant mitochondria. *FEBS Lett.*, **474**, 53–57.
- De Santis, A., Landi, P. and Genchi, G. (1999) Changes of mitochondrial properties in maize seedlings associated with selection for germination at low temperature. Fatty acid

- composition, cytochrome *c* oxidase, and adenine nucleotide translocase activities. *Plant Physiol.*, **119**, 743–754.
- Estabrook, R.W. (1967) Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratio. *Methods Enzymol.*, **10**, 41–47.
- Figueira, T.R.S. and Arruda, P. (2011) Differential expression of uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase in the plant response to stress. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **43**, 67–70.
- Hashimoto, H., Nishi, R., Umeda, M., Ichimiya, H. and Kato, A. (1993) Isolation and characterization of a rice cDNA clone encoding ATP-ADP translocator. *Plant. Mol. Biol.*, **22**, 163–164.
- Hourton-Cabassa, C., Mesneau, A., Miroux, B., Roussaux, J., Ricquier, D., Zachowski, A. and Moreau, F. (2002) Alteration of plant mitochondrial proton conductance by free fatty acids. Uncoupling protein involvement. *J. Biol. Chem.*, **277**, 41533–41538.
- Hourton-Cabassa, C., Matos, A.R., Arrabaça, J., Demandre, C., Zachowski, A. and Moreau, F. (2009) Genetically modified *Arabidopsis thaliana* reveal the involvement of the mitochondrial fatty acid composition in membrane basal and uncoupling protein-mediated proton leaks. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 2084–2091.
- Ježek, P., Costa, A.D. and Vercesi, A.E. (1996) Evidence for anion translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **271**, 32743–32748.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- Maia, I.G., Benedetti, C.E., Leite, A., Turcinelli, S.R., Vercesi, A.E. and Arruda, P. (1998) AtPUMP: an *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. *FEBS Lett.*, **429**, 403–406.
- Murayama, S. and Handa, H. (2000) Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondrial uncoupling proteins in wheat: wheat UCP-genes are not regulated by low temperature. *Mol. Gen. Genet.*, **264**, 112–118.
- Nantes, I.L., Fagian, M.M., Catisti, R., Arruda, P., Maia, I.G. and Vercesi, A.E. (1999) Low temperature and aging promoted expression of PUMP in potato tuber mitochondria. *FEBS Lett.*, **457**, 103–106.
- Navet, R., Douette, P., Puttine-Marique, F., Sluse-Goffart, C.M., Jarmuszkiewicz, W. and Sluse, F.E. (2005) Regulation of uncoupling protein activity in phosphorylating potato tuber mitochondria. *FEBS Lett.*, **579**, 4437–4442.
- Nogueira, F.T.S., Sasaki, F.T. and Maia, I.G. (2011) *Arabidopsis thaliana* uncoupling proteins (AtUCP): insights into gene expression during development and stress response and epigenetic regulation. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **43**, 71–79.
- Onda, Y., Kato, Y., Abe, Y., Ito, T., Morohashi, M., Ito, Y., Ichikawa, M., Matsukawa, K., Kakizaki, Y., Koiwa, H. and Ito, K. (2008) Functional coexpression of the mitochondrial alternative oxidase and uncoupling protein underlies thermoregulation in the thermogenic florets of skunk cabbage. *Plant Physiol.*, **146**, 636–645.
- Pastore, D., Fratianni, A., di Pede, S., and Passarella, S. (2000) Effects of fatty acids, nucleotides and

- reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. *FEBS Lett.*, **471**, 88–92.
- Popov, V.N., Markova, O.V., Mokhova, E.N. and Skulachev, V.P. (2002) Effects of cold exposure *in vivo* and uncouplers and recouplers *in vitro* on potato tuber mitochondria. *Bioch. Bioph. Acta*, **1553**, 232–237.
- Saviani, E.E. and Martins, I.S. (1998) Fatty acids – mediated uncoupling of potato tuber mitochondria. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **44**, 893–899.
- Smith, A.M.O., Rateliffe, R.G. and Sweetlove, L.J. (2004) Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants. *J. Biol. Chem.*, **279**, 51944–51962.
- Sweetlove, L.J., Lytovchenko, A., Morgan, M., Nunes-Nesi, A., Taylor, N.L., Baxter, C.J., Elckmeler, I. and Fernie, A.R. (2006) Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *PNAS*, **103**, 19587–19592.
- Trono, D., Soccio, M., Laus, M.N. and Pastore, D. (2013) The existence of phospholipase (A₂) activity in plant mitochondria and its activation by hyperosmotic stress in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant Sci.*, **199–200**, 91–102.
- Valente, C., Pasqualim, P., Jacomasso, T., Maurer, J.B.B., de Souza, E.M., Martinez, G.R., Rocha, M.E.M., Carnieri, E.G.S. and Cadena, S.M.S.C. (2012) The involvement of PUMP from mitochondria of *Araucaria angustifolia* embryogenic cells in response to cold stress. *Plant Sci.*, **197**, 84–91.
- Vercesi, A.E., Martins, I.S., Silva, M.A.P., Leite, H. M. F., Cuccovia, I.M. and Chaimovich, H. (1995) PUMPing plants. *Nature*, **375**, 24–25.
- Vercesi, A.E., Borecky, J., Maia, I.G., Arruda, P., Cuccovia, I.M. and Chaimovich, H. (2006) Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 383–404.
- Vianello, A., Petrusa, E. and Macri, F. (1994) ATP/ADP antiporter is involved in uncoupling of plant mitochondria induced by low concentrations of palmitate. *FEBS Lett.*, **347**, 239–242.