



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

FABRÍCIO EULÁLIO LEITE CARVALHO

**A SUPEREXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS COM ATIVIDADES
FOTOQUÍMICA E FOTORESPIRATÓRIA INDUZIDA POR SILENCIAMENTO
DAS APX CITOSÓLICAS CONTRIBUI PARA UMA FOTOINIBIÇÃO SIMILAR A
DE ARROZ NÃO-TRANSFORMADO SUBMETIDO À ALTA LUZ**

**FORTALEZA
2013**

FABRÍCIO EULÁLIO LEITE CARVALHO

A SUPEREXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS COM ATIVIDADES FOTOQUÍMICA E FOTORESPIRATÓRIA INDUZIDA POR SILENCIAMENTO DAS APX CITOSÓLICAS CONTRIBUI PARA UMA FOTOINIBIÇÃO SIMILAR A DE ARROZ NÃO-TRANSFORMADO SUBMETIDO À ALTA LUZ

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

**FORTALEZA
2013**

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

-
- C323s Carvalho, Fabrício Eulálio Leite.
A superexpressão de proteínas relacionadas com atividades fotoquímica e fotorespiratória induzida por silenciamento das APX citosólicas contribui para uma fotoinibição similar a de arroz não-transformado submetido à alta luz / Fabrício Eulálio Leite Carvalho. – 2013.
118 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
Área de concentração: Bioquímica vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira.
1. Fotossíntese. 2. Peroxidase. 3. Oryza sativa. I. Título.

CDD 574.192

FABRÍCIO EULÁLIO LEITE CARVALHO

**SUPEREXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS COM FOTOQUÍMICA
DESENCADEADAS POR SILENCIAMENTO DE APXS CITOSÓLICAS EM ARROZ
(ORYZA SATIVA) NÃO CONTRIBUEM PARA A EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA E
PROTEÇÃO CONTRA FOTOINIBIÇÃO INDUZIDA POR ALTA LUZ**

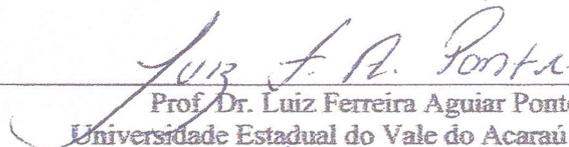
Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica vegetal.

Aprovada em 25 / 01 / 2013

BANCA EXAMINADORA



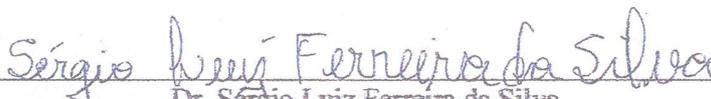
Prof. Dr. Joaquim Albênisio Gomes da Silveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Luiz Ferreira Aguiar Ponte
Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA)



Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Sérgio Luiz Ferreira da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus queridos pais, alicerces de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira pela oportunidade do aprendizado, paciência e incentivo ao longo do desenvolvimento desse trabalho. À professora Dra. Márcia Márgis-Pinheiro e ao professor Dr. Rogério Márgis pela total colaboração e fornecimento das plantas silenciadas, assim como o apoio oferecido durante a estadia na UFRGS. À professora Dra. Célia Carlini e ao professor Dr. Charley Staats por todo apoio e colaboração na utilização da estrutura da UNIPROTE-MS do Centro de Biotecnologia da UFRGS durante a etapa de identificação das proteínas. Aos amigos da família LABPLANT que tanto colaboraram para execução desse trabalho, em especial professora Dra. Aurenívia Bonifácio, Dr. Márcio Martins, Dr. Milton Lima Neto, Msc. Adilton Fontenele, Msc. Ana Karla Lobo, João Victor e Lara Mesquita pela assistência e companheirismo. À Daniela Goetze pelo total apoio durante as análises MS/MS na UFRGS. À Carolina Ribeiro por todo auxílio com as análises de PCR na UFRGS.

Aos meus queridos pais Aloizio e Betânia, que sempre ofereceram todo apoio e incentivo para que eu pudesse chegar até aqui. À minha namorada Luana, por toda compreensão e carinho nas horas difíceis. A Deus pela dádiva da saúde e da força para trabalhar.

“Imagination is more important than knowledge. Knowledge is limited; imagination encircles the word.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Em regiões tropicais, onde existe alta incidência luminosa, os elétrons podem se acumular na cadeia transportadora (PET) produzindo grandes quantidades de H₂O₂ e outras ROS, que podem gerar fotodano e fotoinibição. Para sobreviver a esse desafio, plantas desenvolveram vários mecanismos de atenuação do excesso de energia nos fotossistemas, além de contar com uma eficiente maquinaria de remoção do excesso de H₂O₂, da qual fazem parte as APX citosólicas (cAPX). Entretanto, plantas duplamente silenciadas para as cAPX (OsAPX1/2) não apresentam grandes diferenças morfo-fenotípicas quando comparadas às não transformadas (NT), embora OsAPX1/2 apresente indução de expressão de diversas proteínas relacionadas com a fotossíntese, comparadas com as NT. As implicações fisiológicas dessa indução, assim como suas consequências para a resistência de OsAPX1/2 contra estresses de alta luz (HL), ainda são pouco conhecidas. Objetivando clarificar o papel das cAPX na fotossíntese, plantas de arroz OsAPX1/2 foram produzidas, submetidas a 24 horas de HL (2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e estudadas quanto à expressão e atividade de proteínas relacionadas com a fotossíntese, fotorespiração e homeostase redox. A quantidade de diversas proteínas da PET (Lhcb1, PsbO, PsbP, PsbQ, PSAC, PC, e FDX FNR), bem como teores de Chl e Pheo foram aumentadas em OsAPX1/2 em condições normais de crescimento sem causar alterações nos parâmetros de atividade fotoquímica *in vivo* (Fv/Fm e $\Delta\text{Fm}/\text{Fm}'$). Em contraste, as proteínas relacionadas com expressão ciclo de Calvin-Benson (Rls, ativase de Rbc) e a atividade de carboxilação da rubisco (*in vivo* e *in vitro*) não foram alterados nos mutantes em condições normais de crescimento. Em HL, a expressão de proteínas relacionadas com fotossíntese foi fortemente reprimida em ambos os genótipos, assim como os parâmetros de trocas gasosas e Fv/Fm, sendo esse último forte indício de fotoinibição. Por outro lado, as proteínas relacionadas com a fotorespiração, ou mostraram aumento na expressão/atividade em resposta à luz elevada (NT) ou manutenção de níveis já elevados (OsAPX1/2). A expressão e atividade de Cu/Zn-SOD de cloroplastos mostrou resposta similar a exibida pelas proteínas da fotorespiração, embora a atividade de APX de tilacóides tenha sido fortemente reduzida em OsAPX1/2, evidenciando deficiência no ciclo água-água. Tomados em conjunto, estes dados demonstram que a indução da expressão de proteínas relacionadas com o PET em OsAPX1/2 pode representar um mecanismo compensatório para a manutenção da atividade fotossintética aos níveis da NT. Por outro lado, sob HL, é possível que o aumento da expressão de proteínas associadas com fotorespiração em OsAPX1/2 atue como dissipador alternativo de elétrons, compensando a deficiência no ciclo da água-água dessas plantas.

Palavras-chave: Excesso de irradiância. Fotossíntese. Fotossistemas. Metabolismo redox. *Oryza sativa*.

ABSTRACT

In tropical regions, where there is a high incidence of light, electrons can accumulate in the transport chain (PET) producing large quantities of H₂O₂ and other ROS, which might generate photodamage and photoinhibition. To survive to these challenges, plants have developed several mechanisms to mitigate the excess energy in photosystems, besides having an efficient machinery for removal of excess H₂O₂, which includes cytosolic APX (cAPX). However, double-silenced rice plants for cAPX (OsAPX1/2) do not show large differences in morpho-phenotype when compared to non-transformed (NT), although OsAPX1/2 presents induction of expression on several proteins related to photosynthesis. The physiological implications of this induction, as well as its consequences for OsAPX1/2 resistance against stresses of high light (HL), are still poorly known. Aiming to clarify the role of cAPX in photosynthesis, OsAPX1/2 plants were produced, subjected to 24 hours of HL (2,000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and studied for the expression and activity of proteins related to photosynthesis, photorespiration and redox homeostasis. The amount of several PET proteins (Lhcb1, PsbO, PsbP, PsbQ, PSAC, PC, FNR and FDX) and Chl and Pheo were increased in OsAPX1/2 in normal growth conditions, however without causing changes in the *in vivo* photochemistry activity parameters (Fv/Fm and $\Delta\text{Fm}/\text{Fm}'$). In contrast, expression of proteins associated with Calvin-Benson cycle (RIs, atvase RBC) and rubisco carboxylation activity (*in vivo* and *in vitro*) were not altered in mutants under normal growth conditions. In HL, the expression of proteins related to photosynthesis was strongly repressed in all genotypes, as well as gas exchange parameters and Fv/Fm, the latter being strong indication of photoinhibition. Moreover, proteins related to photorespiration showed increased expression/activity in response to HL in NT and maintenance of already high levels in OsAPX1/2. In OsAPX1/2 the expression and activity of chloroplastic Cu/Zn-SOD showed a similar response exhibited by photorespiration-related proteins, although the activity of thylakoid APX has been greatly reduced, meaning deficiency in water-water cycle. Taken together, these data demonstrate that induction of expression of proteins related PET in OsAPX1/2 plants may represent a compensatory mechanism for maintaining the photosynthetic activity levels similar to NT. Moreover, in HL, it is possible that the increased expression of photorespiration-related proteins in OsAPX1/2 acts as alternative electron sink, compensating the deficiency in the water-water cycle from these plants.

Key words: Irradiance excess. Photosynthesis. Photosystems. Redox metabolism. *Oryza sativa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Cadeia fotossintética transportadora de elétrons dos tilacóides.	15
Figura 2 – Proteínas D1 e D2.	17
Figura 3 – Complexo de evolução do oxigênio.	18
Figura 4 – Modelos de mecanismos do OEC	19
Figura 5 – Aceptores primários do PSII.	22
Figura 6 – Reações do citocromo b6f.	23
Figura 7 – Modelos de interação da plastocianina.	25
Figura 8 – As interações da plastocianina com o PSI.	27
Figura 9 – Modelo tridimensional da interação entre o complexo Fdx-FNR e a subunidade PsaC do PSI.	29
Figura 10 – Modelos tridimensionais da proteína Fdx e do complexo FNR-Fdx.	30
Figura 11 – Esquema geral da cadeia linear de transporte de elétrons nas membranas dos tilacóides.	31
Figura 12 – O ciclo água-água.	33
Figura 13 – Redução de Trx dependente luz nos cloroplastos.	36
Figura 14 – Ciclo da água-água alternativo mediado por Prx.	38
Figura 15 – Estrutura tridimensional da enzima funcional rubisco.	41
Figura 16 – Modelo do processo de ativação da rubisco.	42
Figura 17 – Modelo esquemático do ciclo de Calvin-Benson:	45
Figura 18 – A via fotorespiratória	47
Figura 19 – Mecanismos envolvidos na proteção contra fotoinibição em plantas	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DE: Eletroforese bidimensional	HSP: Proteína do choque térmico
cAPX: Peroxidases do ascorbato citosólicas	J _{max} : taxa de transporte de elétrons destinados a regeneração da RuBP
<i>OsAPX1/2</i> : Silenciadas para expressão de APX 1 e APX 2	KDa: quilodalton
APX1s: Silenciadas para expressão de APX 1	LHC: I: complexo de coleta de luz do PSI em plantas
APX2s: Silenciadas para expressão de APX 2	LHC: II: complexo de coleta de luz do PSII em plantas
AsA: Ascorbato	Lhcb: proteínas ligantes de clorofila do PSII
ATP: Adenosina trifosfato	LHCP: supercomplexo formado por Lhcb1+ Lhcb2+ Lhcb3
CAT: Catalase	MDHA: Monodehidroascorbato
cDNA: DNA complementar	NPQ: <i>quenching</i> não: fotoquímico
Chl: clorofila	NT: Não transformada
CP43: proteína ligante a clorofila a contendo com massa molecular aparente de 43: KDa	OEC: complexo de evolução do oxigênio
CP47: proteína ligante a clorofila a contendo com massa molecular aparente de 47: KDa	PC: plastocianina
Cyt: citocromo	PGK: quinase do fosfoglicerato
D1: subunidades do Centro de Reação de PSII	PN _{max} (CO ₂): fotossíntese máxima da curva de CO ₂ (P _N -Ci)
D1CHL e D2CHL: duas moléculas de clorofila um acessório ligadas a subunidades D1 e D2, respectivamente;	P _{Nmax} (luz): fotossíntese máxima da curva de luz (P _N -PPFD)
D2: subunidades do Centro de Reação de PSII	PQ: plastoquinona
DHA: Dehidroascorbato	PQH ₂ : plastoquinol
ETR: taxa de transporte de elétrons do PSII	PRK: fosforibuloquinase
FAD: flavina-adenina-dinucleótido	Prx: peroxirredoxina
Fdx: ferredoxina	PSI: fotossistema I
Feo: feofitina	PSII: fotossistema II
FeS: Tipo de RC que têm átomos Fe e S como aceptores finais de elétrons	Q _A : quinona firmemente ligado no fotossistema II
FMN: mononucleotido de flavina	Q _B : quinona móvel no fotossistema II
FNR: NADP (H) oxirredutase da ferredoxina	qP: <i>quenching</i> fotoquímico
FTR: redutase da ferredoxina-tioredoxina	Rbc: rubisco
Fv/Fm: eficiência quântica potencial máxima do PSII	RC: centros de reação dos fotossistemas I e II
G-3-P: gliceraldeído-3-fosfato	RNAi: RNA de interferência
G3PD: Dehidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato	RNase: Ribonuclease
GD: desidrogenase da glicina	ROS: espécies reativas de oxigênio
GO: oxidase do glicolato	Rubisco: Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase
GPx: Peroxidase da glutatona	RuBP: ribulose-1,5-bifosfato
gs: condutância estomática	SC: Sequencia de cobertura
GS: Sintetase da glutamina	SOD: Dismutase do superóxido
GSH: Glutaciona reduzida	THF1: proteína formadora de tilacóides
GSSG: Glutaciona oxidada	Trx: tioredoxina
GST: Glutaciona-S-transferase	V _{max} : velocidade máxima de carboxilação da rubisco
H ₂ O ₂ : Peróxido de hidrogênio	ΔF/Fm': eficiência quântica atual do PSII

SUMÁRIO

CAPITULO I - REVISÃO DE LITERATURA	12
1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2. AS PROTEÍNAS DA FOTOSSÍNTESE E VIAS ASSOCIADAS – UMA REVISÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL	13
2.1 Fotoquímica	13
2.1.1 <i>Complexo coletor de luz (LHC)</i>	16
2.1.2 <i>Proteínas D1 e D2</i>	17
2.1.3 <i>Proteínas extrínsecas do PSII</i>	20
2.1.4 <i>As feofitinas e o citocromo b6f</i>	22
2.1.5 <i>A plastocianina</i>	24
2.1.6 <i>O Fotossistema I (PSI)</i>	26
2.1.7 <i>Ferredoxina e Oxireductase da ferredoxina NADP(H)</i>	29
2.2 Drenos alternativos de elétrons do PSI e PSII	32
2.2.1 <i>O ciclo água-água</i>	32
2.2.2 <i>Via das tioredoxinas-peroxiredoxinas</i>	36
2.3 O ciclo de Calvin-Benson	39
2.3.1 <i>Ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco)</i>	40
2.3.2 <i>As etapas redutoras do ciclo de Calvin-Benson</i>	42
2.3.3 <i>As etapas regenerativas do ciclo de Calvin-Benson</i>	43
2.3.4 <i>O ciclo C2 (fotorespiração)</i>	46
3. ESTRESSE DE ALTA LUZ	48
4. O SILENCIAMNETO DE cAPX	54
5. OBJETIVOS	57
6. BIBLIOGRAFIA	58
CAPITULO II – MANUSCRITO	138

Capitulo I - Revisão de literatura

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os organismos fotossintetizantes evoluíram para conviver com um intrigante paradoxo: por um lado a energia luminosa do sol é indispensável para a assimilação do CO₂ e síntese de açúcares, por outro, o excesso dessa mesma energia nas vias fotossintéticas pode causar fotodano, fotoinibição e levar o organismo à morte. (GOH; KO; KOH, 2012; LI *et al.*, 2009; ORT, 2001). O excesso de elétrons nos fotossistemas pode causar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que afetam diretamente o equilíbrio da síntese/degradação de proteínas-chave da fotossíntese, como a proteína D1 do PSII, levando a fotoinibição (GOH; KO; KOH, 2012; LI *et al.*, 2009; ORT, 2001). Portanto, o controle dos níveis de ROS que são produzidos/removidos nos cloroplastos, especialmente o H₂O₂ que é capaz de migrar para outras organelas subcelulares, é de vital importância para a sobrevivência celular (MILLER; DICKINSON; CHANG, 2010; SLESAK *et al.*, 2007). O H₂O₂ pode ainda participar de diversos processos de sinalização gênica, incluindo a regulação de expressão de genes de diferentes enzimas de proteção antioxidativa (KARPINSKI, 1999; KLEIN *et al.*, 2012).

Haja vista a importância da manutenção dos níveis de H₂O₂, as peroxidases do ascorbato (APX) desempenham papel crucial na sua remoção, utilizando o ascorbato como doador de elétrons e produzindo água (FOYER; NOCTOR, 2009). As isoformas citosólicas de APX (principais responsáveis pela atividade total de APX) são consideradas cruciais na defesa antioxidativa, uma vez que o H₂O₂ produzido nos peroxissomos e cloroplastos pode facilmente migrar e se acumular no citosol (MITTLER; FENG; COHEN, 1998). Plantas de *Arabidopsis thaliana* e de tabaco deficientes na expressão de APX 1 (citosólica) apresentam acúmulo de H₂O₂, menor estatura, maiores níveis de oxidação de proteínas cloroplásticas e atividade fotossintética reduzida (KOUSSEVITZKY *et al.*, 2008; MITTLER; FENG; COHEN, 1998; PNUELI *et al.*, 2003).

Paradoxalmente, quando plantas de tabaco foram duplamente silenciadas para a expressão de APX e catalase, essas plantas exibiram uma melhor aclimação a estresses abióticos (RIZHSKY *et al.*, 2002). Uma resposta similarmente intrigante foi observada em plantas de *A. thaliana* com duplo nocaute para as isoformas APX 1 (citosólica) e APX8 (tilacoidal), as quais apresentaram menores níveis de oxidação de proteínas cloroplásticas quando comparadas as não transformadas (MILLER *et al.*, 2007). Esse resultado intrigante e aparentemente contraditório tem sido amplamente observado na literatura e comumente

atribuído à plasticidade gênica e existência de vias redundantes compensatórias, embora muito pouco se conheça de concreto a respeito de tais vias.

Recentemente, estudos com mutantes de *Oryza sativa* que apresentavam deficiência na expressão de ambas as APX citosólicas (*OsAPX1/2*) não exibiram diferenças morfo-fenotípicas significantes (BONIFACIO *et al.*, 2011; ROSA *et al.*, 2010) e apresentaram modulação na expressão de diversas proteínas envolvidas com a fotossíntese e vias associadas como fotorespiração e metabolismo redox (RIBEIRO *et al.*, 2012). Particularmente, esse último estudo relatou a existência de uma grande quantidade de proteínas integrantes da cadeia de transporte de elétrons dos tilacóides em superexpressão nas plantas *OsAPX1/2* comparadas com as não-transformadas, em condições normais de crescimento (RIBEIRO *et al.*, 2012). Portanto, o conhecimento acerca do real papel desempenhado pelas APX citosólicas na proteção dos fotossistemas permanece bastante contraditório e pouco claro, principalmente em condições de estresse abiótico.

Para melhor compreender o papel das APX na proteção dos fotossistemas a utilização de novas abordagens é extremamente necessária. Abordagens que possibilitem uma mensuração da expressão conjunta de diferentes proteínas envolvidas com a fotossíntese, assim como a compreensão de como a expressão dessas proteínas afetam a fotossíntese *in vivo* poderiam esclarecer a relação APX/fotossíntese, principalmente em condições de estresse de luz, que permanecem pouco estudadas. Logo, o presente trabalho utilizou uma abordagem proteômica para estudar a expressão de diferentes proteínas em condições normais de crescimento e de alta luz. Foram estudadas as expressões de nove proteínas relacionadas à atividade fotoquímica, cinco associadas à fotorespiração e sete envolvidas com a proteção antioxidante. Além disso, foram mensurados os teores de clorofila, feofitina e antocianina. Essas análises foram associadas com medidas *in vivo* da fotossíntese por meio de parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (F_v/F_m , NPQ, $\Delta F/F_m'$) e de trocas gasosas ($P_{N_{max}}$, $V_{c_{max}}$ e J_{max}). As características e funções das diferentes proteínas analisadas no corrente estudo, assim como uma caracterização do estresse de luz são alvo de revisão bibliográfica no primeiro capítulo do presente estudo.

2. AS PROTEÍNAS DA FOTOSÍNTESE E VIAS ASSOCIADAS – UMA REVISÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL

A fotossíntese é o processo metabólico no qual moléculas de carbono atmosféricas são assimiladas em moléculas orgânicas de açúcar, utilizando para tal a energia proveniente da luz. Simplificadamente, a fotossíntese pode ser subagrupada em dois processos chaves, que são: a etapa fotoquímica, onde ocorre captação de luz e formação de moléculas com elevado potencial energético, e a etapa redutora, onde essa energia captada é gasta na assimilação do carbono para formação de carboidratos. A seguir serão discutidas em maiores detalhes as proteínas envolvidas com essas duas etapas da fotossíntese e funções acessórias de drenagem de elétrons acerca de suas respectivas funções.

2.1 Fotoquímica

A etapa da fotossíntese de plantas superiores na qual ocorre a fotólise de moléculas de água para que ocorra a formação de NADPH e ATP é denominada etapa fotoquímica (KRAMER; EVANS, 2011). Essa etapa ocorre nas membranas dos tilacóides, por sua vez situados no interior dos cloroplastos. As reações envolvidas nessa etapa ocorrem em uma grande cadeia envolvendo vários super-complexos proteicos, além de pigmentos como clorofilas, feofitinas e carotenóides, denominada cadeia fotossintética de transporte de elétrons (FROMME; GROTHJOHANN, 2008). A luz é captada inicialmente por um super-complexo do qual fazem parte pigmentos e proteínas denominado complexo coletor de luz (LHC). As moléculas de clorofila presentes nesse supercomplexo conduzem por meio de ressonância a energia proveniente da luz até as clorofilas do P680, as quais são excitadas e perdem um elétron (CHENG; FLEMING, 2009; PAULSEN, 1995). Quando o P680 perde um elétron devido à excitação luminosa, o mesmo é repostado pela oxidação de um resíduo de tirosina da proteína D1. O resíduo de tirosina oxidado é então reduzido pelo elétron resultante da fotólise da água que ocorre no complexo de evolução do oxigênio (OEC) e produz concomitantemente O₂ (LIU; CHANG, 2008).

O OEC está situado na face lumenal da membrana do tilacóide, consistindo em um *cluster* de quatro átomos de Mn e um átomo de Ca⁺². Os átomos de Mn estão ligados a resíduos de aminoácidos da proteína D1 e o átomo de Ca⁺² está possivelmente ligado a uma proteína denominada PsbO, uma proteína extrínseca do OEC (UMENA *et al.*, 2011). Plantas

superiores possuem três principais proteínas extrínsecas ao OEC, sendo elas PsbO, PsbP e PsbQ. O papel dessas proteínas é provavelmente indicado pela ligação do Ca^{+2} ao *cluster* do OEC e pela ação acessória no processo de evolução do oxigênio (BONDARAVA; UN; KRIEGER-LISZKAY, 2007; BRICKER *et al.*, 2012a; LOLL *et al.*, 2005). As proteínas extrínsecas do OEC, juntamente com D1 e as proteínas que compõem o complexo coletor de luz são parte de um super-complexo denominado fotossistema II (PSII). Outras proteínas com funções similarmente importantes estão presentes no PSII como a D2, CP43 e CP47 (NELSON; YOCUM, 2006). A função de cada uma dessas proteínas no PSII será discutida em maiores detalhes em uma seção posterior do corrente trabalho.

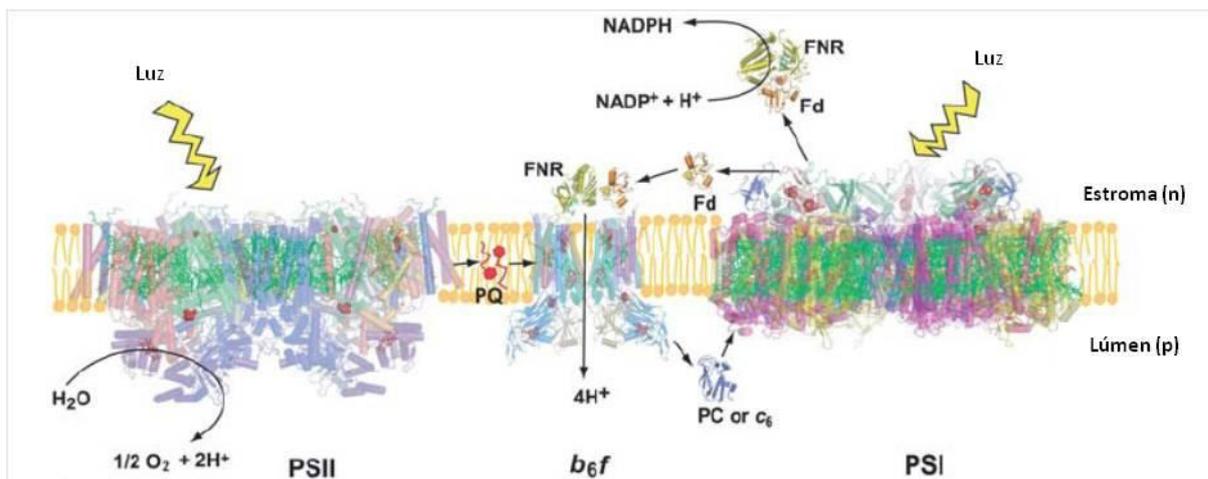
Os elétrons doados pela molécula de clorofila excitada são captados por moléculas de pigmentos denominadas feofitinas. As moléculas de feofitina conduzem os elétrons até a plastoquinona A (Q_A) e esta por sua vez até a plastoquinona B (Q_B) (KERN; RENGER, 2007). Duas transferências como essa produzem a forma totalmente reduzida da plastoquinona, ou hidroplastoquinona (Q_BH_2). As Q_BH_2 formadas ingressam então no *pool* de quinonas lipossolúveis, dissolvidas na membrana dos tilacóides, sendo então capaz de transitar pela camada lipídica, afastando-se da posição lumenal do centro de reação (NELSON; YOCUM, 2006). As Q_BH_2 atingem então o complexo citocromo *b₆f*, onde são oxidadas por uma série de reações. Um elétron é passado para o centro Fe-S da proteína de Rieske, outro é passado para o grupo heme do citocromo *b₆*. O elétron proveniente do citocromo *b₆* é utilizado para regeneração da hidroplastosemiquinona, reestabelecendo o ciclo Q. O elétron que foi doado para a proteína de Rieske é então passado para o citocromo *f*, do qual atinge a plastocianina. A plastocianina é a proteína responsável pela interconexão entre fotossistema II (PSII) e fotossistema I (PSI) (DÍAZ-QUINTANA; HERVÁS, 2008).

O fluxo de elétron através do complexo citocromo *b₆f* produz uma concomitante transferência de prótons do lado estromal para o lado do lúmen dos tilacóides. Esse processo tem como consequência o acúmulo de prótons no lado lumenal dos tilacóides, gerando um potencial de gradiente eletroquímico que é aproveitado por outro complexo proteico denominado ATPase, o qual catalisa a fosforilação de moléculas de adenosina difosfato (ADP), produzindo adenosina trifosfato (ATP). Portanto, o fluxo de elétron através do citocromo *b₆f* está fortemente ligado com a síntese de ATP nos cloroplastos (NELSON; YOCUM, 2006). O elétron que é doado pelo citocromo *b₆f* reduz a plastocianina e essa última atua como agente redutor do PSI. O PSI, similarmente ao PSII, é um supercomplexo que envolve proteínas e pigmentos fotossintetizantes como a clorofila (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008). Quando a energia luminosa incide sobre os pigmentos de clorofila do PSI,

essas moléculas conduzem a energia por meio de ressonância até o P700, o qual se excita e doa um elétron ao receptor primário (HAEHNEL; HESSE; PROPPER, 1980). O PSI de plantas superiores consiste em dois complexos do centro de reação separados e um complexo coletor de luz. O centro de reação é formado por 12 peptídeos (PsaA, PsaB, PsaC, PsaD, PsaE, PsaF, PsaG, PsaH, PsaI, PsaJ, PsaK, e PsaL) e aproximadamente 100 moléculas de clorofila (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008).

A interação no lado doador do PSI, ou seja, entre a plastocianina e o PSI provavelmente envolve as subunidades PsaA, PsaB e PsaF (HIYAMA, 2005). O modelo mais aceito de interação ao lado receptor do PSI (Ferredoxina-PSI), por sua vez, ocorre nas proximidades de PsaC (FISCHER *et al.*, 1998). A ferredoxina reduzida pelo PSI pode doar seu elétron para a proteína ferredoxina-NADP(H) oxirredutase (FNR), que por sua vez reduz o NADP^+ , o receptor final da cadeia fotossintética de transporte de elétrons (FROMME; GROTJOHANN, 2008). Esse conjunto de reações acima descrito constitui a etapa fotoquímica da fotossíntese e pode ser resumido na figura 1. O processo iniciado com a captação de luz pelo complexo LHC culmina com a produção de energia química na forma de poder redutor (NADPH), fonte energética para o ciclo de Calvin-Benson.

Figura 1 – Cadeia fotossintética transportadora de elétrons dos tilacóides. Resumo esquemático do conjunto de proteínas e pigmentos envolvidos nas vias de síntese de NADP(H) nas membranas dos tilacóides. A reação de fotólise da água é o primeiro de uma série de eventos que conduzem a formação de poder redutor na forma da molécula do NADP(H).



Fonte: figura adaptada de Fromme e Grotjohann (2008).

2.1.1 Complexo coletor de luz (LHC)

O complexo coletor de luz (LHC), ou complexo antena é um sistema intrincado e altamente eficiente na captação de energia luminosa na forma de fótons e transformação de luz em energia química situado na periferia dos fotossistemas I e II (CHENG; FLEMING, 2009; LIU; CHANG, 2008). O LHC é formado pelos produtos dos genes *lhca1-4*, relacionados com o PSI e *lhcb1-6* envolvidos principalmente com o PSII. As proteínas Lhcb1 e Lhcb2 são distribuídas entre os dois fotossistemas, representando um mecanismo de regulação do balanço do fluxo de elétrons entre os fotossistemas (HORTON; RUBAN, 2005; LIU; CHANG, 2008). Atualmente, existe uma grande variedade de nomenclaturas utilizadas para as seis proteínas integrantes do LHC, como indicado por Paulsen (1995). As proteínas Lhcb1, Lhcb2 e Lhcb3 são também denominadas LHCP ou LHCII e as proteínas Lhcb4, Lhcb5 e Lhcb6 denominadas CP29, CP26 e CP24 (KOURIL *et al.*, 2005; PAULSEN, 1995). No corrente trabalho a nomenclatura LHCII será utilizada para definir o complexo formado por Lhcb1, Lhcb2 e Lhcb3 e as demais proteínas do LHC serão denominadas Lhcb4, Lhcb5 e Lhcb6, conforme sugerido por Paulsen (1995).

O complexo antena de PSII em plantas superiores é, portanto, formado por quatro membros homólogos que são LHCII (trímero formado por Lhcb1, Lhcb2 e Lhcb3), Lhcb4, Lhcb5 e Lhcb6. Desses, LHCII é conhecido como o principal e mais abundante LHC em cloroplastos (LIU; CHANG, 2008). Os monômeros de LHCII se ligam cada um a 13-15 moléculas de clorofila a e clorofila b, 3-4 carotenóides e um fosfolipídio (CHENG; FLEMING, 2009; ZIGMANTAS *et al.*, 2006). As moléculas de clorofila ligadas ao LHCII estão distribuídas em duas camadas através da membrana dos tilacóides, onde oito clorofilas (5 clorofilas a e 3 clorofilas b) estão na camada próxima à superfície estromal e seis clorofilas (3 clorofilas a e 3 clorofilas b) estão situadas na camada próxima à superfície luminal (LIU; CHANG, 2008). A hipótese mais aceita é que os *clusters* de clorofila da camada luminal atuam como coletores iniciais da energia luminosa, absorvendo e transmitindo energia para as clorofilas da camada estromal. A energia absorvida pelas clorofilas da camada estromal pode, por sua vez, ser transferida para outros LHC circunvizinhos ou seguir diretamente para o centro de reação (COMMET *et al.*, 2012).

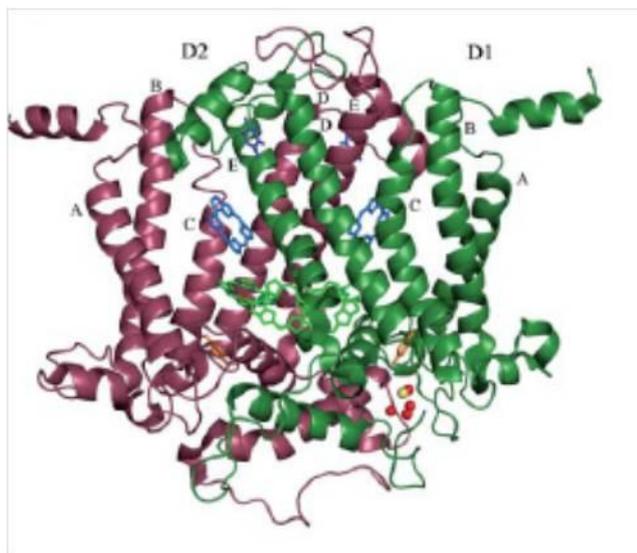
A organização estrutural do LHC é extremamente dependente da intensidade luminosa que a planta é submetida. Plantas cultivadas em condições de alta luz saturam a capacidade de *turnover* dos centros de reação enquanto a arquitetura do LHC favorece a

captação e passagem contínua de energia, o que poderia levar ao fotodano e fotoinibição (JOHNSON *et al.*, 2011).

2.1.2 Proteínas D1 e D2

O PSII de plantas superiores apresentam duas proteínas de crucial importância para os processos iniciais da fotoquímica. Essas proteínas são codificadas pelos genes *psba* e *psbd* e também são conhecidas como proteínas D1 e D2 (EDELMAN; MATTOO, 2006; SHEN; HENMI; KAMIYA, 2008). Essas proteínas são componentes chaves do processo transferência de elétrons do PSII, principalmente a D1 considerada a principal proteína do centro de reação do PSII (HOLZWARTH *et al.*, 2006; SHEN; HENMI; KAMIYA, 2008). As clorofilas associadas com as proteínas D1 e D2 estão localizadas próximas à superfície lumenal das membranas do tilacóide enquanto que as moléculas de feofitina se encontram associadas às proteínas D1 e D2 no lado estromal (EDELMAN; MATTOO, 2006; SHEN; HENMI; KAMIYA, 2008). Existem duas hélices principais para D1 e D2 (figura 2) cada localizada no lado lumenal. Localizado nessa região está o *cluster* de quatro átomos de Mn, um átomo de Ca^{+2} e cinco átomos de oxigênio, também denominado complexo de evolução do oxigênio (MCCARRICK; BRITT, 2008; UMENA *et al.*, 2011).

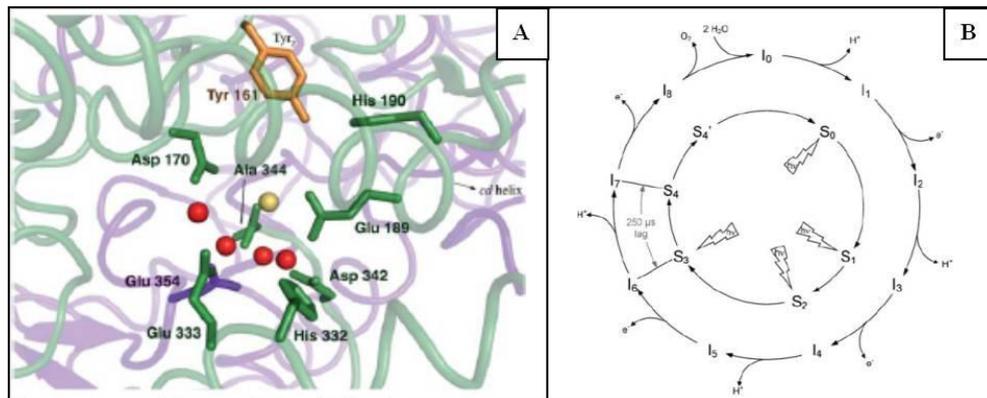
Figura 2 – Proteínas D1 e D2. Estrutura dimensional do produto dos genes *PsbA* e *PsbD*, também chamadas proteínas D1 e D2. A o centro da estrutura está evidenciado o *cluster* de átomos de Mn e Ca, formando o complexo de evolução do oxigênio.



Fonte: figura reproduzida de Shen, Henmi e Kamiya (2008).

Os átomos do *cluster* Mn_4Ca (figura 3) estão todos ligados a resíduos de aminoácidos da proteína D1, onde D1-Glu 189 está ligado a Mn1, D1-Asp 170 está ligado ao Mn4 e ao Ca^{+2} , D1-Glu 333 está ligado ao Mn3 e Mn4, D1-Asp 342 a Mn1 e Mn2, D1-Ala 344 ao Mn2 e Ca (MCCARRICK; BRITT, 2008; UMENA *et al.*, 2011). A energia luminosa que chega aos pigmentos de clorofila do P_{680} causa uma excitação de elétrons para a camada mais externa e um elétron é perdido para a molécula de feofitina, tornando-se oxidado (P_{680}^+). O resíduo de tirosina da proteína D1 (Y_z) é oxidado doando elétrons para P_{680}^+ . O Yz^+ é então reduzido no *cluster* de Mn_4Ca pela oxidação da água, doador inicial de elétrons para a cadeia transportadora dos tilacóides (NELSON; YOCUM, 2006; SJÖDIN *et al.*, 2002; UMENA *et al.*, 2011). A oxidação da água tem ainda como consequência a produção de O_2 no lúmen dos tilacóides (MCCARRICK; BRITT, 2008).

Figura 3 – Complexo de evolução do oxigênio. O *cluster* de Mn_4Ca (A) é o centro ativo de oxidação das moléculas de água, que ocorre por meio de um processo (B) que envolve a participação de duas moléculas de água e 4 fótons para cada molécula de O_2 evoluída.



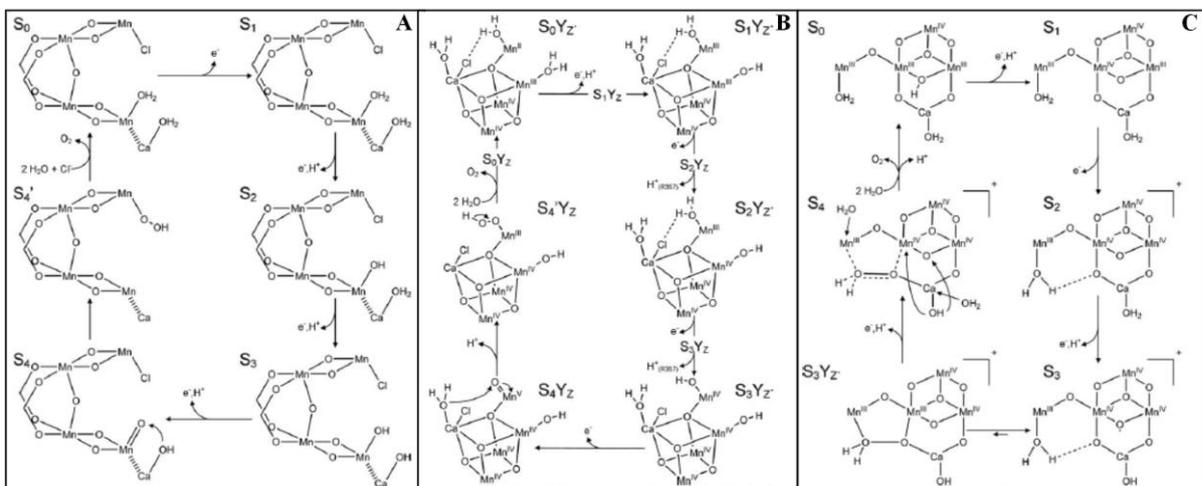
Fonte: figura adaptada de Mccarrick e Britt (2008).

A formação de O_2 a partir da oxidação da água é um processo que ocorre no OEC por meio de uma sequência de estados oxidativos, denominados estados S_n . Plantas adaptadas ao escuro apresentam estado de oxidação S_0 , passando para S_1 após a exposição à luz. O Mn é o único metal com atividade redox no sítio ativo do OEC, portanto o avanço desses estados de oxidação é acompanhado pela oxidação dos átomos de Mn. Em S_1 o estado redox do *cluster* é $2Mn^{+3}/2Mn^{+4}$ (HASEGAWA; ONO, 1999; MCCARRICK; BRITT, 2008; SHEN; HENMI; KAMIYA, 2008; UMENA *et al.*, 2011). Logo, cada fóton incidente causa uma mudança de estado oxidativo de modo que após S_1 passa a S_2 , S_3 , S_4 e retorna a S_0 , liberando O_2 . Conforme o ciclo dos estados S avança, H^+ é liberado, provavelmente seguindo o padrão 1:0:1:2, a partir de S_0 . Portanto, são necessários duas moléculas de água e quatro fótons para a

total oxidação e liberação de uma molécula de O_2 e quatro H^+ (MCCARRICK; BRITT, 2008; SHEN; HENMI; KAMIYA, 2008).

Os íons Cl^- e Ca^{+2} também desempenham papéis importantes no processo de evolução do oxigênio no PSII, embora os mecanismos aos quais estejam envolvidos ainda é motivo de divergência na literatura. Atualmente, são três os principais modelos utilizados para descrever o processo de oxidação (LOLL *et al.*, 2005; MCCARRICK; BRITT, 2008; NELSON; YOCUM, 2006). Segundo o modelo de Pecoraro (figura 4A), o primeiro a estabelecer a presença de Cl^- e Ca^{+2} na atividade de evolução do oxigênio, o papel do Ca^{+2} é de ligar umas das moléculas de água do substrato e ativá-la por meio de ataque nucleofílico em uma ligação de água com um Mn adjacente. O íon Cl^- se liga ao segundo Mn e é liberado no último passo de oxidação da água (MCCARRICK; BRITT, 2008). O modelo de Brudvig (figura 4B), por sua vez postula que uma molécula de água está ligada ao Ca^+ e outra ao Mn. A molécula de água ligada ao Mn é sujeita a ataque nucleofílico pelo íon hidróxido ligado ao Ca^+ . O papel do Cl^- é o de controlar o potencial de redução de dois átomos de Mn, agindo como uma ponte (MCCARRICK; BRITT, 2008). Recentemente o modelo de Messinger (figura 4C), contrariamente aos dois anteriores, apontou a existência de uma ponte de radical de oxigênio ao invés de $Mn=O$, durante a fase S4 (MCCARRICK; BRITT, 2008).

Figura 4 – Modelos de mecanismo do complexo de evolução do oxigênio. O modelo de Pecoraro (A) foi o primeiro a incluir Ca^{+2} e Cl^- . O Ca^{+2} se liga a uma das moléculas de água do substrato ativando-o por ataque nucleofílico. O Cl^- se liga a um ligando segundo Mn e é libertado na etapa final de oxidação da água. No modelo Brudvig (B), uma molécula de água do substrato é ligada ao Ca^{+2} e outra ao Mn. Como no mecanismo de Pecoraro, a água ligada ao Mn sofre ataque de um nucleófilo. O papel do Cl^- é o de controlar o potencial de redução de outros dois Mn. Diferentemente dos outros modelos, o modelo de Messinger (C) inclui um radical de oxigênio servindo de ponte, em vez de um terminal de $Mn=O$.



Fonte: figura adaptada de Mccarrick e Britt (2008).

2.1.3 Proteínas extrínsecas do PSII

Situadas ao lado lumenal dos tilacóides e próximas ao centro de reação do OEC (proteína D1) encontram-se um conjunto de proteínas com funções acessórias no processo de evolução do oxigênio, também conhecidas como proteínas extrínsecas do PSII. Em plantas superiores essas proteínas são quatro: PsbO, PsbP, PsbQ e PsbR, com 33 KDa, 23 KDa, 10KDa e 10KDa respectivamente (BRICKER *et al.*, 2012a; ROOSE; WEGENER; PAKRASI, 2007; YI *et al.*, 2005). A função dessas proteínas tem sido amplamente discutida na literatura através do estudo de plantas deficientes em cada uma das proteínas extrínsecas do PSII e ainda permanece pouco conhecida (BRICKER *et al.*, 2012a; ROOSE; WEGENER; PAKRASI, 2007).

A proteína PsbO é uma proteína de 33 KDa altamente conservada entre plantas superiores, algas verdes e cianobactérias (BRICKER; FRANKEL, 1998, 2011; COMMET *et al.*, 2012). Estudos apontam que provavelmente PsbO interage ao lado luminal com os domínios de D1, D2 e CP47, porém não está diretamente ligada aos átomos do *cluster* Mn₄Ca (BRICKER *et al.*, 2012a; NELSON; YOCUM, 2006). A utilização de Cl₂Ca ou NaCl-uréia tem sido amplamente empregada para o estudo funcional da PsbO uma vez que esse tratamento remove completamente a PsbO sem remover o *cluster* de Mn₄Ca que permanece funcionando a baixa eficiência (BRICKER *et al.*, 2012a). Nesses casos, grandes concentrações de Ca⁺² e Cl⁻ foram necessárias para manter funcional a evolução do oxigênio, além de que a transição dos estados S₃ para S₄ e então de volta a S₀ era significativamente reduzida (BRICKER *et al.*, 2012a; ROOSE; WEGENER; PAKRASI, 2007).

Mutantes de *Arabidopsis thaliana* nocauteadas para a expressão de PsbO apresentaram resposta similar, onde os estados S₂ e S₃ eram mais retardados (LIU; FRANKEL; BRICKER, 2007). Dessas observações surgiu a hipótese de que PsbO tem função ligada à estabilização do átomo de Ca⁺² e, principalmente, do Cl⁻. A adição de 10-20 mM de Cl⁻ é capaz de preservar a atividade do *cluster* do OEC em plantas deficientes em PsbO (LIU; FRANKEL; BRICKER, 2007; YOCUM, 2008). Entretanto, apesar da clara importância do papel desempenhado pela proteína PsbO no complexo de evolução do oxigênio, estudos recentes tem demonstrado que talvez essa proteína esteja envolvida em processos adicionais. Evidências apontam para a forte capacidade de ligação de GTP a PsbO, o que permitiria que a proteína agisse como uma GTPase, atuando no controle do estado de fosforilação da proteína D1 e portanto, na proteção contra fotodano e fotoinibição (BRICKER *et al.*, 2012a).

As proteínas PsbP e PsbQ, por sua vez, apresentam provavelmente funções ligadas à estabilização do Ca^{+2} e Cl^- . Aparentemente essas proteínas desempenham papel relacionado com a otimização da atividade do OEC nas concentrações fisiológicas de Cl^- e Ca^{+2} (COMMET *et al.*, 2012; MIQYASS; VAN GORKOM; YOCUM, 2007; POPELKOVÁ; YOCUM, 2007). Similarmente ao que ocorre quando a proteína PsbO é removida dos fotossistemas, a remoção das proteínas PsbP e PsbQ pode causar uma forte redução na atividade de evolução do oxigênio, além de facilitar o acesso de agentes redutores externos ao *cluster* Mn_4CaO_5 (BRICKER *et al.*, 2012a; YOCUM, 2008). Entretanto, plantas deficientes em PsbQ e PsbR podem manter taxas de atividade de evolução do oxigênio relativamente altas quando submetidas a altas concentrações de Cl^- e Ca^{+2} (YOCUM, 2008).

Haja vista que as proteínas PsbP e PsbQ desempenham papel crucial na atividade do OEC, os mecanismos inerentes a esse papel ainda são motivo de investigação. Duas hipóteses são levantadas para explicar o papel das PsbP e PsbQ (BRICKER; FRANKEL, 2011). A primeira sugere que suas funções estão relacionadas com a manutenção da conformação do PSII. As evidências para essa hipótese são baseadas no fato de que a remoção de PsbP e PsbQ afeta diretamente a conformação do PSII, provavelmente modificando a estrutura das proteínas D1 e D2 (BRICKER; FRANKEL, 2011). A segunda hipótese é baseada no fato circunstancial de que a remoção de PsbP e PsbQ eleva consideravelmente a necessidade por Cl^- e Ca^{+2} . Corrobora com essa hipótese o fato de que, ao menos a proteína PsbP, possui sítios de ligação para cátions como o Ca^{+2} (YOCUM, 2008).

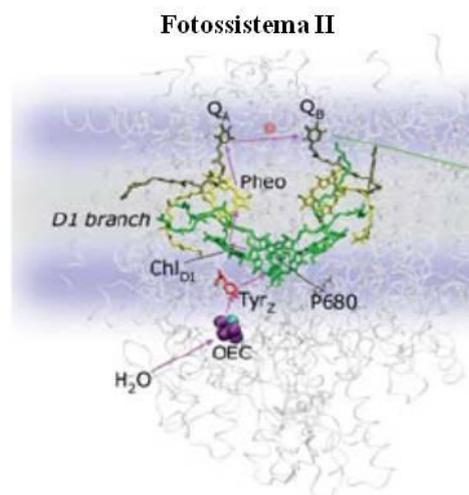
Em plantas superiores existe ainda uma quarta proteína extrínseca ao OEC, a proteína PsbR, entretanto as funções desempenhadas por PsbR permanecem ainda pouco conhecidas (BRICKER *et al.*, 2012b). Estudos revelaram que seu precursor, um peptídeo de apenas 41 aminoácidos, é sintetizado por ribossomos no citosol, similarmente as outras proteínas extrínsecas, porém sua localização exata no PSII permanece pouco conhecida (BRICKER *et al.*, 2012b). Um modelo hipotético sugere que uma quinta proteína, PsbJ, serviria para ancorar PsbR ao PSII, e que a proteína PsbR participaria juntamente com PsbO para a formação de um domínio de ligação para PsbP (BRICKER *et al.*, 2012b). Plantas de *A.thaliana* e batata deficientes em PsbR apresentaram uma grande deficiência na evolução do oxigênio e reduzida reoxidação de Q_A^- (ALLAHVERDIYEVA *et al.*, 2007; STOCKHAUS *et al.*, 1990). Essas alterações provavelmente podem ser atribuídas à incapacidade de PsbP se ligar ao PSII na ausência de PsbR sem, no entanto, causar alterações nas concentrações de outras proteínas do PSII (ALLAHVERDIYEVA *et al.*, 2007).

Portanto, as proteínas extrínsecas do OEC podem ser consideradas como um grande complexo proteico intimamente associado na manutenção da eficiência da evolução de oxigênio (BRICKER; FRANKEL, 2011; ROOSE; WEGENER; PAKRASI, 2007). Essa manutenção está relacionada com a proteção conformacional do PSII, estabilização de íons indispensáveis para a atividade do OEC (Ca^{+2} e Cl^-) e até mesmo possivelmente conferindo proteção oxidativa ao PSII (COMMET *et al.*, 2012). A perfeita funcionalidade do PSII implica na continuidade do fluxo de elétrons, que são doados da proteína D1 para a feofitina, seguida pelas quinonas e citocromo *b₆f* (CRAMER *et al.*, 2008).

2.1.4 As feofitinas e o citocromo *b₆f*

A feofitina é uma molécula de clorofila cujo átomo de magnésio central é substituído por dois átomos de hidrogênio. Essa alteração é suficiente para que a feofitina apresente características químicas e espectrais bastante distintas da clorofila (VERNON, 1960). Os elétrons produzidos na separação de carga inicial no centro de reação são transferidos para uma molécula de feofitina (Feo D1) na região da proteína D1 (HOLZWARTH *et al.*, 2006; SJÖDIN *et al.*, 2002). Os elétrons da feo D1 (figura 5) são então transferidos para uma primeira plastoquinona, Q_A e então para uma segunda Q_B (KERN; RENGER, 2007; NELSON; YOCUM, 2006).

Figura 5 – Aceptores primários do PSII. Duas feofitinas, uma ligada à proteína D2 outra ligada à proteína D1, recebem os elétrons provindos do centro de reação P680* e reduzem a Q_A seguida de Q_B .



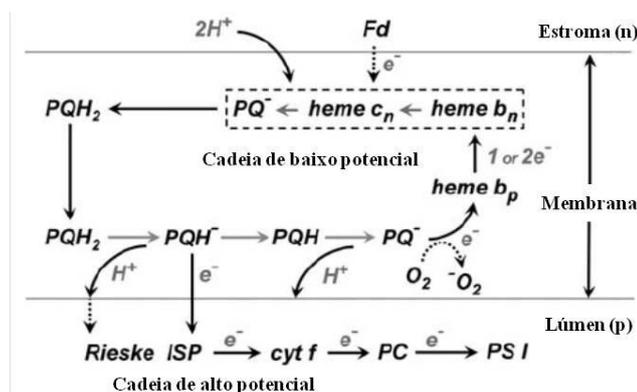
Fonte: figura adaptada de Cramer *et al.* (2008).

O acceptor Q_A está localizado nas proximidades de D2 e age como acceptor de um elétron por vez. Diferentemente, Q_B está localizada nas proximidades de D1 e age como um acceptor de dois elétrons, de modo que é preciso duas doações de Q_A^- para Q_B alcançar a forma totalmente reduzida, a qual deixa o sítio ligante em D1, recebe dois prótons e passa a ser denominada plastohidroquinona (PQH_2) (NELSON; YOCUM, 2006; SHEN; HENMI; KAMIYA, 2008). A molécula de PQH_2 recém-formada se difunde pela membrana dos tilacóides constituindo o pool de plastohidroquinonas (CRAMER *et al.*, 2008).

As PQH_2 podem que são difundidas por entre a bicamada lipídica transferem seus elétrons para o citocromo $b6f$, dando origem ao chamado ciclo Q (BANIULIS *et al.*, 2008; CRAMER *et al.*, 2006). O citocromo $b6f$ é um complexo hetero-oligomérico situado entre os PSII e PSI. A passagem de elétrons pelo complexo gera a transferência de prótons para o lado lumenal do tilacóide, o que juntamente com a oxidação da água ao PSII e a decréscimo na concentração de prótons no lado estromal pela redução do $NADP^+$, produz um gradiente eletroquímico transmembrana entre os lados lumenal e estromal das membranas dos tilacóides (CRAMER *et al.*, 2006, 2005, 2008).

O complexo citocromo $b6f$ é composto em cada monômero por oito subunidades proteicas fracamente ligadas: citocromo b, citocromo f, proteína de Rieske, subunidade IV e as proteínas menores Pet G, N, M e L. Adicionalmente, uma molécula de clorofila *a* e uma molécula de carotenóide também fazem parte da estrutura do monômero (BANIULIS *et al.*, 2008). As quatro subunidades maiores ligam os grupos prostéticos redox do complexo, um grupo heme ligado ao citocromo *f*, três hemes ligados ao citocromo $b6$ e um *cluster* 2Fe-2S na proteína Rieske (BANIULIS *et al.*, 2008). O fluxo de elétrons através do complexo $b6f$ é caracterizado pela existência de uma rota bifurcada de transferência de energia (figura 6).

Figura 6 – Reações do citocromo $b6f$. Os elétrons doados pela PQH_2 podem seguir a via de alto potencial redox (citocromo f) ou a via de baixo potencial redox (citocromo b6).



Fonte: figura adaptada de Cramer *et al.* (2008).

A doação de um elétron de PQH₂ para o *cluster* 2Fe-2S da proteína Rieske gera um radical semiquinona Q⁻ ao lado lumenal da membrana de tilacóide. O elétron doado para a proteína Rieske segue a rota de alto potencial, passando pelo grupo heme do citocromo f, plastocianina e até o PSI e liberando dois prótons ao lado lumenal do tilacóide (CRAMER *et al.*, 2008). O radical Q⁻, por sua vez, segue a rota de baixo potencial (figura 6), passando pelos três grupos heme do citocromo *b6*: heme b_p, heme b_n e heme c_n, que fazem parte da estrutura do citocromo *b6*. O grupo heme c_n do citocromo *b6* doa seu elétron para uma nova semiquinona, produzindo novamente PQH₂ e removendo dois prótons do lado estromal da membrana (ALRIC *et al.*, 2005). A remoção desses dois prótons gera uma diferença de carga equivalente à adição de dois prótons ao lado lumenal da membrana, contribuindo dessa forma para a criação de uma gradiente de prótons entre as duas faces da membrana dos tilacóides (BANIULIS *et al.*, 2008). O grupo heme cn do citocromo *b6* pode ainda receber um elétron diretamente da ferredoxina, caracterizando o chamado fluxo cíclico de elétrons que será discutido em maiores detalhes adiante (ALRIC *et al.*, 2005).

Estudos recentes apontam que, a via de regeneração das PQH₂ por meio do citocromo *b6* pode estar envolvida na produção de radical superóxido e, conseqüentemente outras espécies reativas de oxigênio (CRAMER *et al.*, 2008; MUBARAKSHINA; IVANOV, 2010). As condições da membrana dos tilacóides a qual está presente uma intensa geração de O₂ (OEC) potencializa a capacidade de geração de superóxido a partir da semiquinona no citocromo *b6* (CRAMER *et al.*, 2008; MUBARAKSHINA; IVANOV, 2010). Entretanto, a relativa escassez de observações da geração de superóxido ao nível do PSII, leva a crer que um eficiente mecanismo protetor pode estar presente no citocromo *b6* (CRAMER *et al.*, 2008; MUBARAKSHINA; IVANOV, 2010).

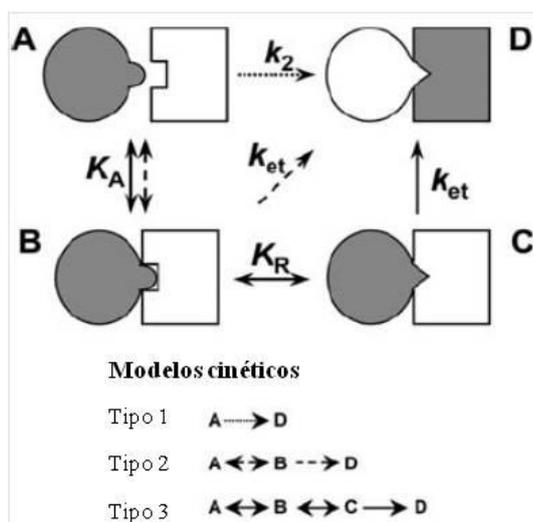
2.1.5 A plastocianina

A plastocianina (PC) é a proteína cuja função está ligada ao transporte de elétrons do complexo citocromo *b6f* para o PSI. PC é um único polipeptídeo, diferente dos complexos proteicos analisados anteriormente. Possui um átomo de cobre coordenado a dois resíduos de histidina, um de metionina e um de cisteína (COHU *et al.*, 2009; DÍAZ-QUINTANA; HERVÁS, 2008; HAEHNEL; HESSE; PROPPER, 1980; PEERS; PRICE, 2006). A formação dos complexos transientes entre plastocianina e citocromo *b6f* ou PSI, assim como a atratividade envolvida nos movimentos da plastocianina são fortemente influenciados pela

distribuição de cargas eletrostáticas na superfície da PC (DÍAZ-QUINTANA; HERVÁS, 2008; HAEHNEL; HESSE; PROPPER, 1980; PEERS; PRICE, 2006).

Portanto, existem duas áreas distintas na superfície de PC: a primeira denominada polo norte, uma região hidrofóbica próxima ao resíduo de histidina 87 e a segunda denominada face leste, uma região negativamente carregada próxima ao grupo tirosina 83 (DÍAZ-QUINTANA; HERVÁS, 2008). A região hidrofóbica, ou polo norte está ativamente envolvido com a interação entre PC e PSI. A face leste que é negativamente carregada, por sua vez, está relacionada com a interação entre PC e citocromo *b6f* (DÍAZ-MORENO *et al.*, 2005; DÍAZ-QUINTANA; HERVÁS, 2008). Essa organização invariavelmente produz um vetor dipolo inclinado, levando a uma separação clara do sítio de ligação nas áreas de interação eletrostáticas e hidrofóbicas, provavelmente em virtude da estrutura tridimensional da subunidade PsaF no PSI (BAI *et al.*, 2001; DÍAZ-QUINTANA; HERVÁS, 2008; PEERS; PRICE, 2006; YOUNG, 1998). Haja vista a importância da PC para a fotossíntese, os mecanismos inerentes a suas interações com citocromo *b6f* e PSI foram alvos de intensos estudos e atualmente são propostos três modelos para essas relações (figura 7).

Figura 7 – Modelos de interação da plastocianina. Modelos cinéticos propostos para o mecanismo da reação de transferência de elétrons entre PC e seus parceiros de membrana. As moléculas reduzidas e oxidadas são descritas na cor escura e branca, respectivamente.



Fonte: figura adaptada de Díaz-Quintana e Hervás (2008).

O primeiro modelo prevê que a interação de PC com seus parceiros segue um princípio de colisão, onde não é possível detectar o complexo transiente entre os dois

parceiros (DÍAZ-QUINTANA; HERVÁS, 2008). Possivelmente, os três modelos (figura 7) evoluíram de uma colisão simples, tipo I, para um modelo mais sofisticado que envolve não só a formação de um complexo transitório, tipo II, mas mesmo um rearranjo dos parceiros, tipo III, no sentido de produzir uma maior eficiência na interação entre PC e seus parceiros, permitindo uma melhor transferência de elétrons para o PSI e assim propiciando um melhor desempenho fotossintético (DÍAZ-QUINTANA; HERVÁS, 2008).

2.1.6 O Fotossistema I (PSI)

A interação entre PC e PSI representa um passo crucial na fotossíntese no qual o elétron obtido através da fotólise da água no PSII atinge um novo supercomplexo de equivalente importância para a manutenção da vida na Terra (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; ZANETTI; MERATI, 1987). O fotossistema I é o responsável pela produção do mais negativo potencial redox encontrado na Terra, portanto ele está diretamente correlacionado com a maior parte da entalpia existente nos organismos vivos (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; HIYAMA, 2005; NELSON; YOCUM, 2006).

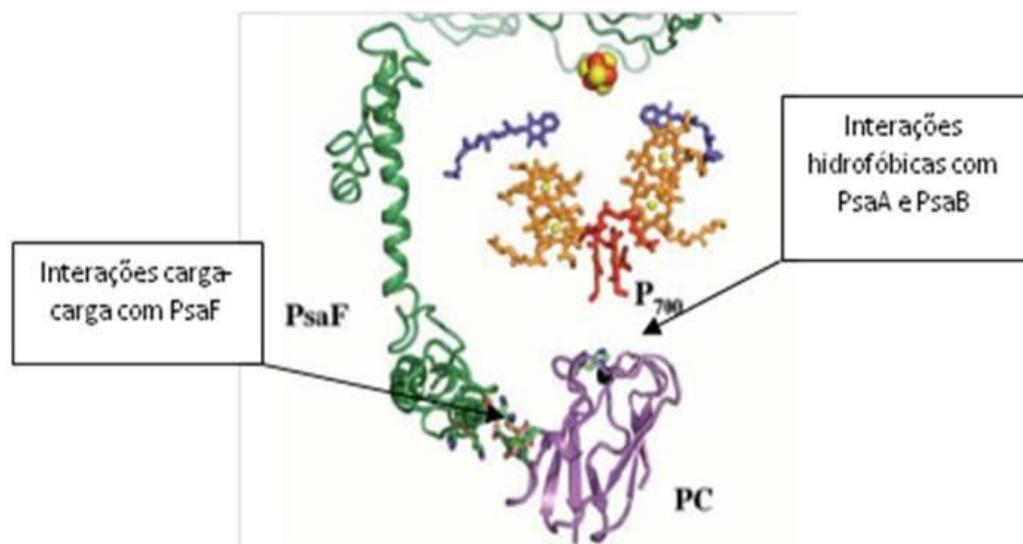
As unidades funcionais de PSI são formadas por dois complexos separados de centro de reação (RC) e um complexo coletor de luz (LHC). O RC de plantas superiores é composto por doze polipeptídeos: PsaA, PsaB, PsaC, PsaD, PsaE, PsaF, PsaG, PsaH, PsaI, PsaJ, PsaK e PsaL, além de aproximadamente 100 moléculas de clorofila (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2007, 2008; HIYAMA, 2005). Entre essas subunidades, duas são exclusivas de plantas (PsaH e PsaG), com papéis de sítio de ancoragem de LHCII e LHCI, respectivamente. As outras proteínas são encontradas ubiquamente em organismos fotossintéticos (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2007, 2008; HIYAMA, 2005).

O complexo LHCI se encontra fortemente ligado ao RC do PSI por meio da subunidade Lhca1. Essa subunidade do LHCI se liga fortemente a proteína PsaG, além de apresentar forte interação com a proteína PsaB. Portanto a subunidade Lhca1 funciona como ponto de ancoragem para as outras subunidades do LHCI (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; COGDELL; GARDINER, 2008; DEKKER; BOEKEMA, 2008). As outras proteínas do LHCI interagem com outras superfícies de subunidades expostas no lado estromal dos tilacóides. Por exemplo, Lhca4 se liga a subunidade PsaF e Lhca2 está fracamente associada com PsaJ (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; HIYAMA, 2005; NELSON; YOCUM, 2006). A subunidade Lhca3 provavelmente possui peculiaridades estruturais quando

comparada com as demais subunidades do LHCI, mas suas interações ainda não foram bem elucidadas (COGDELL; GARDINER, 2008; DEKKER; BOEKEMA, 2008). Outras duas subunidades Lhca5 e Lhca6 foram descobertas recentemente por meio de abordagem proteômica (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; NELSON; YOCUM, 2006). Embora Lhca5 esteja provavelmente esteja ligado a um sítio formado pelas subunidades Lhca2 e Lhca3, ainda permanecem desconhecida as propriedades de interação da subunidade Lhca6 (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; COGDELL; GARDINER, 2008).

A plastocianina (PC) é doador de elétrons universal para o PSI de plantas superiores. Acredita-se que as subunidades PsaA e PsaB estejam envolvidas diretamente na ligação da PC ao PSI através de interações hidrofóbicas (Figura 8). A subunidade PsaF provavelmente tem funções reguladoras nessa ligação por meio de interações de carga. A face leste da plastocianina, carregada negativamente, é capaz de interagir fortemente com o domínio N-terminal de PsaF, implicando em um eficiente mecanismo de passagem de elétrons (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; HIPPLER; RATAJCZAK; HAEHNEL, 1989; HIYAMA, 2005).

Figura 8 – As interações da plastocianina com o PSI. A plastocianina interage com as subunidades do centro de reação P700 (PsaA e PsaB do PSI) por meio de interações hidrofóbicas, enquanto que é ancorada por meio de interações iônicas com a subunidade PsaF.



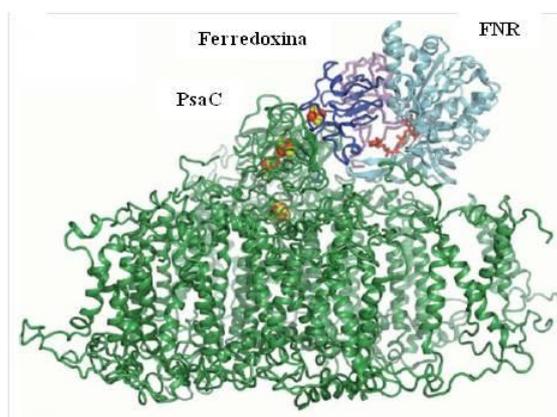
Fonte: figura adaptada de Amunts, Drory e Nelson (2008).

O RC do PSI é formado principalmente pelas proteínas PsaA e PsaB, com funções análogas aquelas desempenhadas pelas proteínas D1 e D2 do PSII (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; HIYAMA, 2005). Um *cluster* 4Fe4S é formado entre as proteínas PsaA e PsaB, denominado Fx. As moléculas de clorofila estão arranjadas em torno de cinco estruturas de α -hélice pertencentes à proteína PsaA e cinco estruturas de α -hélice pertencentes à proteína PsaB (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; GROTHJOHANN; FROMME, 2005; NELSON; YOCUM, 2006). As proteínas PsaA e PsaB ligam ao todo cerca de 90 moléculas de clorofila, sendo 79 simultaneamente envolvidas com o complexo antena e as outras seis envolvidas diretamente com o transporte de elétrons (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; HIYAMA, 2005). Dessas seis moléculas de clorofila, o primeiro par está localizado na superfície luminal da membrana do tilacóide e é também denominado P700. Os outros dois pares de clorofila estão próximos ao primeiro e provavelmente envolvidos com separação primária de cargas (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; GROTHJOHANN; FROMME, 2005; NELSON; YOCUM, 2006).

A energia luminosa incidente sobre o LHCI é transmitida até o primeiro par de clorofilas do PSI, o P700, que se torna excitado (P700*). O elétron da camada mais externa do P700* salta para o aceptor primário que é constituído por uma filoquinona A_0 . O P700+ é reduzido pela plastocianina, que se ancora as subunidades PsaA e PsaB por meio de interações hidrofóbicas, como já foi visto. A filoquinona reduzida A_0^- , reduz uma segunda filoquinona A_1 , que por sua vez transfere o elétron para o *cluster* Fx, formado entre PsaA e PsaB (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; HIYAMA, 2005). Outros dois *clusters* de 4Fe4S estão presentes no PSI, F_A e F_B , sendo esses os únicos cofatores da via de transporte de elétrons do PSI que não estão ligados às subunidades PsaA e PsaB (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2007).

Os *clusters* F_A e F_B estão ligados à subunidade PsaC, também chamada subunidade VII do PSI. A subunidade PsaC apresenta em sua estrutura uma região exposta ao lado estromal da membrana tilacoidal, essa se apresenta positivamente carregada e pode ancorar proteínas ferredoxina negativamente carregadas (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; FISCHER *et al.*, 1998; HIPPLER; RATAJCZAK; HAEHNEL, 1989; NELSON; YOCUM, 2006). A extremidade c-terminal de PsaC, por sua vez, participa de pontes de hidrogênio formadas com resíduos de aminoácidos de PsaB. O elétron que foi transferido para o *cluster* F_A seguido de F_B é então transferido para ferredoxina (figura 9) e finalmente deixa o PSI (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; HIYAMA, 2005; NELSON; YOCUM, 2006).

Figura 9 – Modelo tridimensional da interação entre o complexo Fdx-FNR e a subunidade PsaC do PSI. A Fdx oxidada se liga a subunidade PsaC do PSI e um grupo FeS da Fdx recebe um elétron do *cluster* F_B de PsaC. O ângulo de visão é perpendicular ao plano da membrana tilacoidal.



Fonte: figura adaptada de Amunts, Drory e Nelson (2008).

Embora existam muitas outras subunidades do PSI conhecidas, a maioria delas é de função acessória na organização estrutural do PSI. Por exemplo, a subunidade PsaD tem provavelmente um importante papel na orientação da ligação entre PsaC e PsaB, assim como auxilia na ancoragem da ferredoxina. A proteína PsaE, provavelmente está envolvida com a estabilização da ligação da ferredoxina com PsaC, entretanto ainda muito pouco se sabe sobre a real importância dessa proteína (AMUNTS; DRORY; NELSON, 2008; NELSON; YOCUM, 2006).

2.1.7 Ferredoxina e Oxidoreductase da ferredoxina NADP(H)

O transporte linear de elétrons que ocorre nas membranas dos tilacóides tem como receptor final a molécula de Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato oxidada (NADP⁺), produzindo, conseqüentemente NADP(H) (FROMME, 2008; HANKE *et al.*, 2011; LODEYRO *et al.*, 2012). A etapa final é canalizada por duas importantes enzimas que são: a ferredoxina (Fdx) receptora de elétrons diretamente do PSI e a oxidoreductase da ferredoxina-NADP(H) (FNR), responsável pela redução direta do NADP⁺ e produção de NADP(H) (FROMME, 2008).

A Fdx é uma proteína solúvel, relativamente bem caracterizada entre os diferentes organismos fotossintetizantes, com massa em torno de 20 KDa. A principal característica da Fdx é a presença de um *cluster* do tipo 2Fe2S, contido em uma região formada por quatro

resíduos de cisteína altamente conservados entre as espécies (ANTONKINE *et al.*, 2009; FROMME, 2008; HANKE *et al.*, 2011). A redução do *cluster* 2Fe2S da Fdx gera alterações de carga da proteína que refletirão diretamente na interação carga-carga que ocorre entre a Fdx e a PsaC, no PSI. Essa alteração é suficiente para causar o desprendimento da Fdx carregada no lado estromal da membrana do tilacóide (BENZ *et al.*, 2010; FROMME, 2008; GROTHJAHN; FROMME, 2005). Haja vista a formação da Fdx carregada ao lado estromal do tilacóide, essa se liga à proteína FNR (figura 10) por meio de interações iônicas (BENZ *et al.*, 2010; FROMME, 2008). A FNR é uma proteína monomérica de aproximadamente 35 KDa e possui um FAD ligado não-covalentemente como grupo prostético. Portanto, através da formação do complexo Fdx-FNR ocorre a transferência do elétron da Fdx para o NADP⁺, através da seguinte reação:

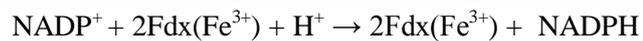
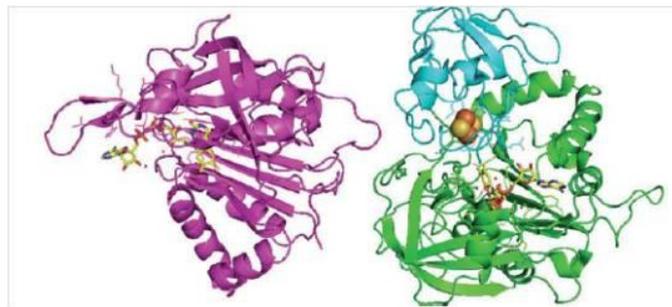


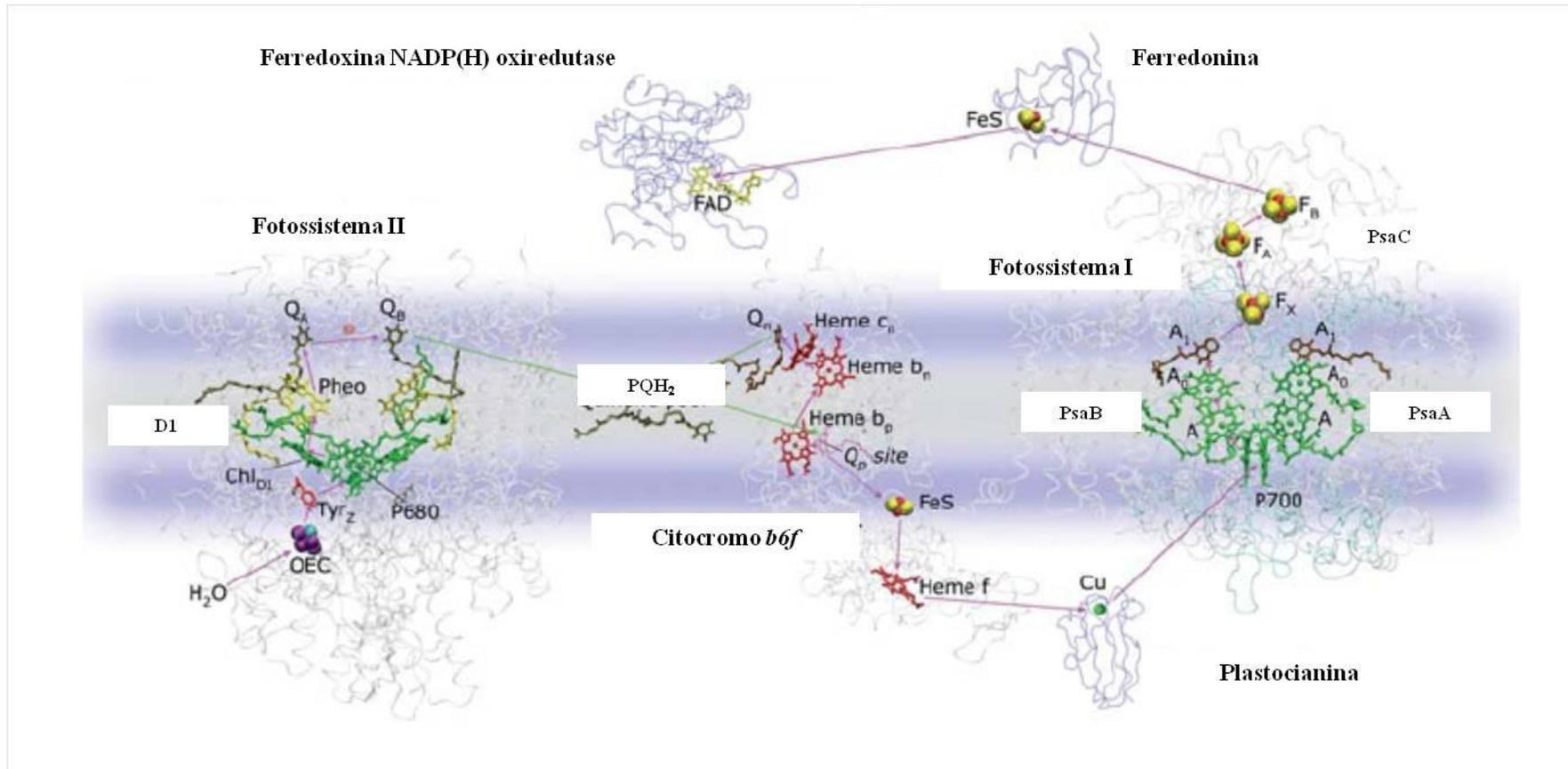
Figura 10 – Modelos tridimensionais da proteína Fdx e do complexo FNR-Fdx. A Fdx pode ser observada com o grupo FeS em destaque ao centro da figura a esquerda. A figura da direita representa a formação do complexo FNR-Fdx, responsável pela redução do NADP⁺ e formação de NADP(H).



Fonte: figura reproduzida de Fromme (2008).

A produção de NADP(H) constitui a etapa final da cadeia linear de transporte de elétrons (Figura 11) e sua formação é de grande importância para outro processo biológico fundamental para a fotossíntese: a carboxilação do CO₂ (BUCHANAN; BALMER, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2009). A carboxilação do CO₂ ocorre nos estromas dos cloroplastos e será estudada em detalhes na próxima seção. Entretanto, ocasionalmente os elétrons podem não chegar a reduzir o NADP⁺, caracterizando um fenômeno ocasionado por diversos fatores, entre os quais excesso de energia na cadeia de transporte fotossintético de elétrons (IVANOV *et al.*, 2012; TAKAHASHI; BADGER, 2011). Esses mecanismos conhecidos como drenos alternativos de elétrons serão estudados em detalhes adiante.

Figura 11 – Esquema geral da cadeia linear de transporte de elétrons nas membranas dos tilacóides. No modelo os elétrons são removidos da água pela atividade do OEC e fluem pelo PSII até o complexo Cytb6f, onde há transporte de prótons para o lúmen, e então chegam a PC, que é doador de elétrons do PSI. A partir do PSI os elétrons chegam ao complexo Fdx-FNR e reduzem o NADP^+ , produzindo NADP(H) .



Fonte: figura adaptada de Fromme e Grotjohann (2008)

2.2 Drenos alternativos de elétrons do PSI e PSII

Os drenos alternativos de elétrons dos fotossistemas são mecanismos bioquímicos que atuam acessoriamente ao fluxo de elétrons nas membranas dos tilacóides, sendo tradicionalmente considerados como mecanismos protetores da integridade dos fotossistemas (IVANOV *et al.*, 2012; NOGUCHI; YOSHIDA, 2008; TAKAHASHI; BADGER, 2011). Dentre as vias bioquímicas relacionadas a esses processos estão o ciclo água-água (PSI), o ciclo das tioredoxinas-peroxiredoxinas (PSI) e a dissipação térmica de energia pelo ciclo das xantofilas (PSII). Nas plantas, esses mecanismos geralmente são associados a condições de estresse fisiológico, principalmente aquelas que causam acúmulo de energia na cadeia transportadora de elétrons dos tilacóides, como alta luz (ASADA, 1999; CHIBANI *et al.*, 2012; FOYER; NOCTOR, 2009). Maiores detalhes acerca do estresse causado por alta luz serão fornecidos em uma seção posterior desse trabalho.

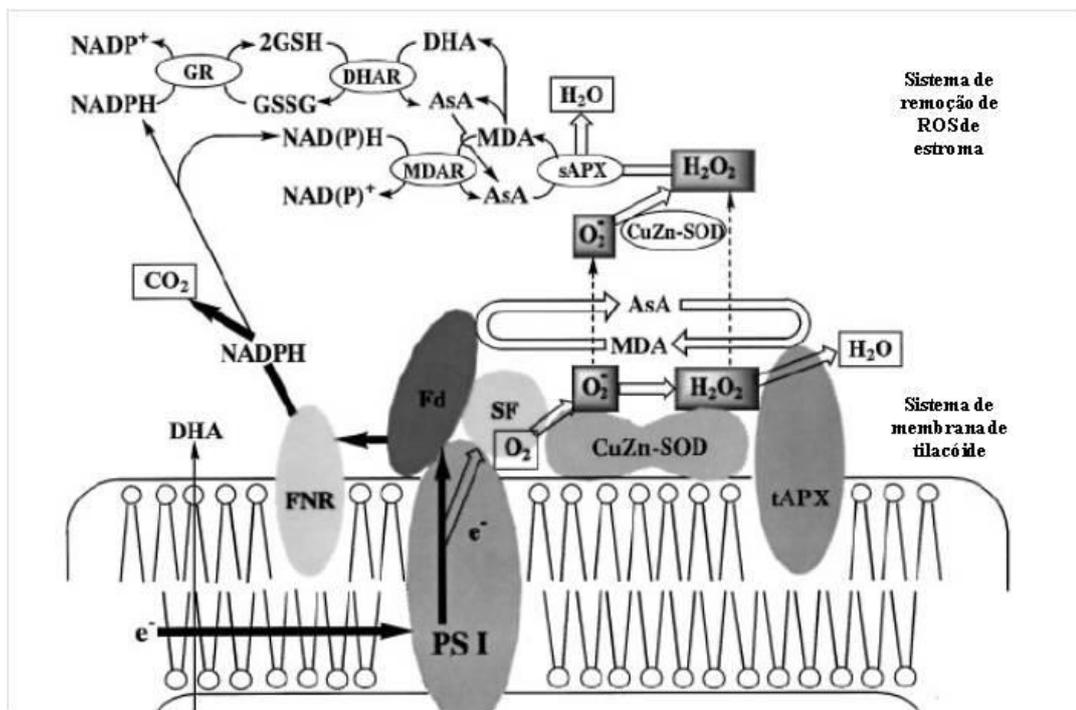
2.2.1 O ciclo água-água

O elétron doado pela plastocianina é transportado através dos grupos heme (F_X , F_A e F_B) das proteínas integrantes do PSI até a ferredoxina ao lado estromal para a produção de NADP(H) (FROMME, 2008). Entretanto, em determinadas situações o O_2 pode substituir a ferredoxina como aceptor de elétrons do PSI, atuando como um oxidante de Hill (ASADA, 2006; FOYER; SHIGEOKA, 2011; FOYER; NOCTOR, 2009). Nesses casos, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio da redução do O_2 com a formação de íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (ASADA, 2006; FOYER; NOCTOR, 2009; LIU *et al.*, 2004). Em virtude da atividade de enzimas com atividade de dismutase de superóxido (SOD), o $O_2^{\bullet-}$ é convertido a H_2O_2 e este é finalmente reduzido à água. Essa via de reações foi primeiramente descrita em 1951 por Alan H. Mehler e, portanto passaram a ser denominadas reações de Mehler (ASADA, 2006; FOYER; NOCTOR, 2009).

Posteriormente, durante os anos 1990, Kozi Asada reuniu as observações de que o elétron proveniente da oxidação da água no OEC do PSII era de fato a fonte de elétrons para a redução do O_2 no PSI (ASADA, 1999). Portanto, como o produto final das reações de Mehler é a água ($O_2^{\bullet-} \rightarrow SOD \rightarrow H_2O_2 \rightarrow APX \rightarrow H_2O$), essa via passou a ser denominada ciclo água-água, o ciclo de Asada (figura 12). Esse ciclo exerce, portanto a clara função de escoamento

alternativo de elétrons, principalmente em casos de excesso de elétrons na cadeia de transporte fotoquímica (ASADA, 1999), muito embora sua real importância seja motivo de muita controvérsia na literatura (KANGASJÄRVI *et al.*, 2008; MARUTA *et al.*, 2010; MILLER; SHULAEV; MITTLER, 2008; MILLER *et al.*, 2007; SUSUKI *et al.*, 2013).

Figura 12 – O ciclo água-água. O_2^- é produzido no complexo PSI direta ou indiretamente mediado por um fator de estroma (SF). O ciclo é composto por Cu/Zn-SOD tilacooidal (em várias plantas, Fe-SOD), APX tilacooidal (tAPX), e ferredoxina (Fdx). Fdx reduz diretamente o MDA a ascorbato (ASA). No estroma o sistema é composto por Cu/Zn-SOD estromal, APX de estroma (sAPX), MDAR, redutase do dehidroascorbato (DHAR) e redutase da glutatona (GR). NADP(H) é gerado por meio de Fdx-FNR.



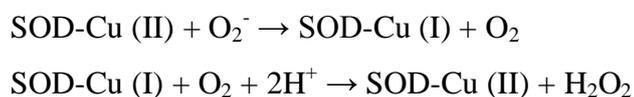
Fonte: figura adaptada de Asada (1999).

A verdadeira origem dos anions $O_2^{\bullet-}$ produzidos no ciclo água-água ainda é motivo de debate na ciência. Consensualmente é bastante improvável que esses anions provenham da doação pela ferredoxina reduzida pelo PSI (ASADA, 1999). A presença de $NADP^+$ no estroma inviabilizaria as chances da Fdx interagir com o O_2 , devido a uma maior diferença de potencial redox (ASADA, 1999). O oposto, condições de baixa disposição de $NADP^+$, ainda não seria suficiente para tais interações, haja vista a presença de reações concorrentes como o fluxo cíclico de elétrons (ASADA, 1999). Atualmente acredita-se que a redução do O_2 ocorra diretamente no PSI, provavelmente envolvendo uma flavo-dehidrogenase estromal (SF) (ASADA, 1999).

O $O_2^{\bullet-}$ produzido no estroma é altamente danoso para a integridade do cloroplasto, podendo facilmente reagir com proteínas, lipídios de membrana ou até mesmo moléculas de DNA, causando sérios danos moleculares e fotoinibição (APEL; HIRT, 2004; ASADA, 2006; FOYER; NOCTOR, 2009). Entretanto a presença da enzima SOD exerce crucial importância na remoção dessas ROS, produzindo em seu lugar o H_2O_2 , que é consideravelmente menos reativo do que o anion O_2^- (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; GIANNOPOLITIS; RIES, 1977; SHARMA; DUBEY, 2007).

As SODs são enzimas com função de dismutase dotados de dois íons metálicos com atividade redox funcionando como cofatores no centro ativo de catálise (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; PILON; RAVET; TAPKEN, 2011). Essas enzimas são classificadas conforme o íon metálico utilizado em FeSOD (cofator Fe), MnSOD (cofator Mn), Cu/ZnSOD (Cu e Zn como cofatores) e NiSOD (cofator Ni), sendo que apenas as três primeiras são de ocorrência no reino vegetal (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; PILON; RAVET; TAPKEN, 2011). As isoformas FeSOD (FSD1) e Cu/ZnSOD (CSD2) são as únicas presentes em cloroplastos, sendo a última a mais abundante e portanto mais importante em cloroplastos de arroz (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; PILON; RAVET; TAPKEN, 2011).

CSD2 é um homodímero e contém apenas um átomo de Cu e Zn em cada subunidade, entretanto apenas o Cu participa da atividade redox (KLIEBENSTEIN; MONDE; LAST, 1998; MYOUGA *et al.*, 2008; PILON; RAVET; TAPKEN, 2011). Estudos estruturais da relação PSI-CSD2 indicam que provavelmente essa proteína se encontra presa à membrana dos tilacóides, provavelmente em virtude de interações iônicas (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; KLIEBENSTEIN; MONDE; LAST, 1998; PILON; RAVET; TAPKEN, 2011). A reação canalizada pela CSD2 é:



Portanto, ao final da reação ocorre o consumo de O_2^- e a formação de H_2O_2 . Embora seja menos reativo, o H_2O_2 ainda é potencialmente danoso aos cloroplastos, pois sua dissociação em OH^- é tão prejudicial quanto o O_2^- (APEL; HIRT, 2004; ASADA, 2006). A presença de enzimas como a peroxidase do ascorbato (APX) nos cloroplastos garante que o

H₂O₂ produzido seja prontamente removido na formação de H₂O e portanto encerrando o ciclo água-água (ASADA, 1999, 2006; MARUTA *et al.*, 2010; MILLER *et al.*, 2007).

A APX é uma heme-peroxidase codificada por uma grande família gênica e largamente distribuída pelas organelas subcelulares (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Em plantas de arroz, ao menos oito diferentes isoformas foram identificadas até o momento, as quais são numeradas de 1 a 8 (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Duas isoformas são cloroplásticas, sendo uma estromal (APX7) e outra aderida à membrana dos tilacóides (APX8), logo, estão diretamente envolvidas com o ciclo água-água (MARUTA *et al.*, 2010; MILLER *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2006). A reação catalisada pela APX nos cloroplastos utiliza o ascorbato como doador de elétrons e, portanto, é bastante similar aquela realizada no citosol:



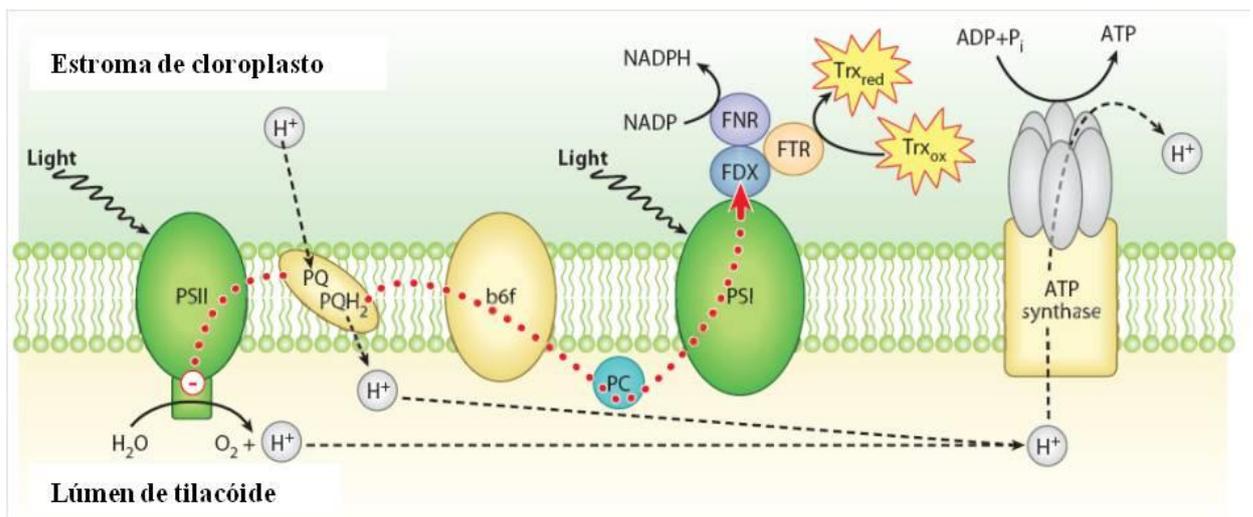
A regeneração do ascorbato nas membranas do tilacóide ocorre por meio de um ciclo no qual a Fdx é utilizada como doador de elétrons para a redução do monodehidroascorbato (MDA), produzindo ascorbato e assim reiniciando o ciclo com a redução do H₂O₂ pela APX8 (ASADA, 1999; MARUTA *et al.*, 2010). Ao nível estromal a redução do H₂O₂ é catalisada pela APX7. A regeneração do ascorbato pode se dar por duas vias. A primeira ocorre por um sistema muito similar aquele apresentado no ciclo de Foyer-Halliwell, Onde o ciclo ascorbato-dehidroascorbato (ASA-DHA) é acoplado ao ciclo da glutathiona oxidada-reduzida (GSSG-GSH), utilizando o NADP(H) como doador inicial de elétrons (ASADA, 1999; FOYER; NOCTOR, 2009). A segunda via descreve a utilização do poder redutor de NADP(H) diretamente pela redutase do monodehidroascorbato, produzindo ASA (ASADA, 1999; FOYER; NOCTOR, 2009).

A peroxidase do ascorbato, entretanto, não é a única enzima presente nos cloroplastos capaz de remover o H₂O₂. Outra enzima de equivalente função, a peroxiredoxina, atua nos cloroplastos, porém seu ciclo está diretamente ligado à outra via de drenagem alternativa de elétrons no PSI, a via das tioredoxinas (CHIBANI *et al.*, 2010; DIETZ *et al.*, 2006; FOYER; NOCTOR, 2009; MEYER *et al.*, 2009). Essa via de similar importância para a drenagem do excesso de elétrons será motivo de maior estudo na próxima seção desse trabalho.

2.2.2 Via das tioredoxinas-peroxiredoxinas

As tioredoxinas (Trx) são uma grande família proteica caracterizada pela presença de dois sítios redox ativos ligados a resíduos de cisteína separados por dois outros aminoácidos, no motivo altamente conservado CxxC (BARAJAS-LÓPEZ *et al.*, 2012; CHIBANI *et al.*, 2010; MEYER *et al.*, 2009). O motivo CxxC é responsável pela catálise de reações de oxi-redução por meio de trocas tiol-disulfeto, reduzindo pontes dissulfeto de proteínas alvo (BARAJAS-LÓPEZ *et al.*, 2012; CHIBANI *et al.*, 2010; MEYER *et al.*, 2009). O mecanismo de ação das Trx pode ser dividido em duas etapas: primeiramente o grupo tiol N-terminal do motivo CxxC ataca a ponte dissulfeto de uma proteína alvo, liberando um grupo tiol livre e formando uma ponte dissulfeto com o segundo resíduo de cisteína; posteriormente o agrupamento tiol C-terminal do motivo CxxC rompe a ponte dissulfeto entre a Trx e o alvo liberando a proteína-alvo reduzida e Trx em seu estado oxidado (BARAJAS-LÓPEZ *et al.*, 2012; CHIBANI *et al.*, 2010; MEYER *et al.*, 2009). As Trx cloroplásticas oxidadas são reduzidas por um heterodímero de TR dependente de ferredoxina (FTR), utilizando o PSI como doador inicial de elétrons (figura 13) (BARAJAS-LÓPEZ *et al.*, 2012; CHIBANI *et al.*, 2010; MEYER *et al.*, 2009).

Figura 13 – Redução de Trx dependente luz nos cloroplastos. Elétrons originados no OEC são transferidos ao longo da cadeia fotossintética de transporte de elétrons via PSII e PSI até Fdx, que pode reduzir os grupos tiol do motivo CXXC em Trx via FTR.



Fonte: figura adaptada de Meyer *et al.* (2009).

As Trx de plantas formam um grupo muito diverso, que é classificado de acordo com a sequência primária de cada proteína e a posição de íntrons na sequência transcrita. As Trx cloroplásticas em *A. thaliana* são atualmente divididas em seis tipos: m, f, x, y, CDSP 32 e liliun com 4, 2, 1, 2, 1 3 5 isoformas respectivamente (BARAJAS-LÓPEZ *et al.*, 2012; CHIBANI *et al.*, 2010; MEYER *et al.*, 2009). As Trx reduzidas podem desempenhar diversos papéis na célula vegetal, entretanto, objetivando manter o foco do corrente trabalho, serão abordadas com maiores detalhes duas das principais funções relacionadas à fotossíntese: remoção de H₂O₂ nos cloroplastos oriundos da atividade da CSD2 (grupos x, y e CDSP32) e sinalização para ativação de proteínas relacionadas ao ciclo de Calvin (grupos f e m) (BARAJAS-LÓPEZ *et al.*, 2012; CHIBANI *et al.*, 2010; MEYER *et al.*, 2009).

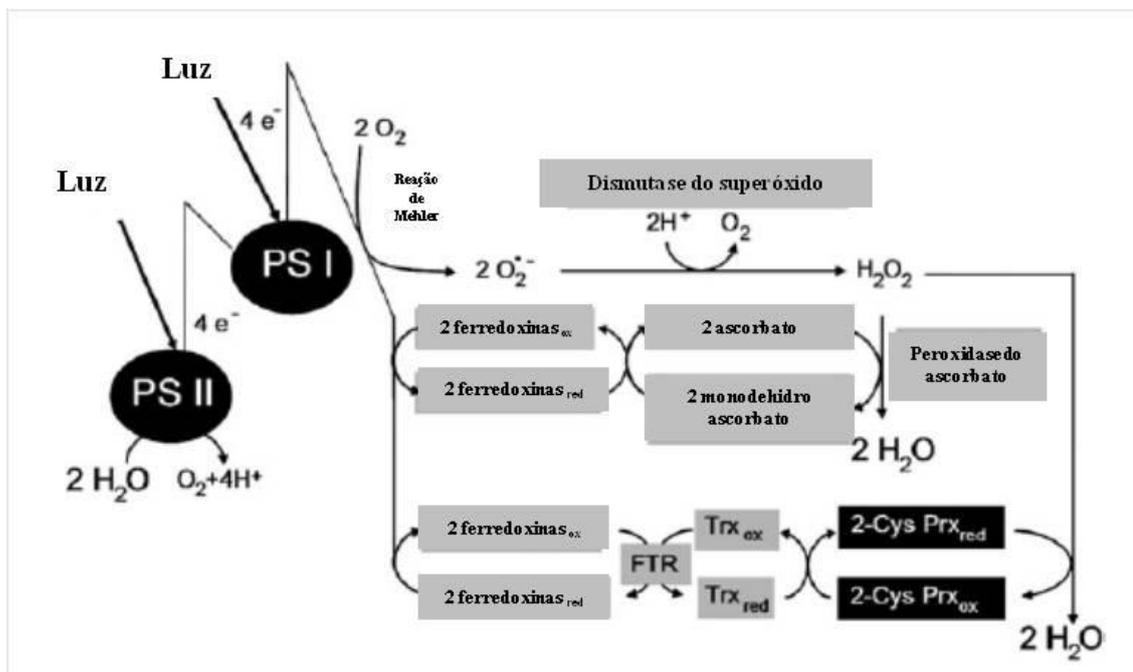
A remoção de H₂O₂ regulada por Trx é um sistema de remoção de ROS cloroplásticas que pode ser comparado ao ciclo água-água, anteriormente descrito. O mecanismo utiliza a enzima Prx (principalmente PrxQ e 2-Cys) ou GPX para reduzir H₂O₂, seguido da re-redução da enzima, que pode envolver uma variedade de doadores de elétrons, tais como Trx, glutarredoxina, ciclofilinas, GSH, e ASA (DIETZ *et al.*, 2006; FOYER; NOCTOR, 2009).

As Prx formam um grupo de peroxidases presentes em todos os organismos vivos e completamente distintas das outras classes de peroxidases (DIETZ *et al.*, 2006; HEBBELMANN *et al.*, 2012; ROUHIER; JACQUOT, 2002). Todas as Prx de plantas são codificadas pelo núcleo e em *A. thaliana* estão presentes quatro diferentes famílias de Prx, que são: 1-Cys, 2-Cys, Tipo II e Prx Q (DIETZ *et al.*, 2006; HEBBELMANN *et al.*, 2012; ROUHIER; JACQUOT, 2002). Essas proteínas possuem 1 ou 2 resíduos N-terminais envolvidos na atividade de peroxidase, portanto sendo dessa forma classificadas. As famílias do Tipo II e Prx Q possuem pontes dissulfeto intramoleculares nesse segundo resíduo, o que as difere das Prx 2-Cys (DIETZ *et al.*, 2006; HEBBELMANN *et al.*, 2012; ROUHIER; JACQUOT, 2002).

Os principais grupos de Prx presentes em cloroplastos são Prx 2-Cys, Prx II e Prx Q, sendo que em *Oryza sativa* duas isoformas de Prx II são encontradas, PrxII E1 e PrxII E2 (DIETZ *et al.*, 2006; HEBBELMANN *et al.*, 2012; ROUHIER; JACQUOT, 2002). As Prx associadas principalmente com as Trx podem catalisar a remoção de ROS em um ciclo água-água alternativo, como mencionado anteriormente. O ânion O₂⁻ gerado no PSI é dismutado ao H₂O₂. As Prx podem funcionar removendo o H₂O₂ em um ciclo água-água alternativo (figura 14) (DIETZ *et al.*, 2006; FOYER; NOCTOR, 2009; HEBBELMANN *et al.*, 2012). Acredita-

se que as isoformas 2-Cys Prx, Prx Q e PrxII E podem atuar similarmente nessa função, sendo a eficiência catalítica de PrxII E ainda maior do que a de 2-Cys Prx, exemplificada na figura abaixo (DIETZ *et al.*, 2006; HEBBELMANN *et al.*, 2012; ROUHIER; JACQUOT, 2002). A Trx ou outros redutores podem reduzir a Prx oxidada sendo regenerado FTR (DIETZ *et al.*, 2006; HEBBELMANN *et al.*, 2012; ROUHIER; JACQUOT, 2002).

Figura 14 – Ciclo da água-água alternativo mediado por Prx. O O_2^- gerado na reação de Mehler é dismutado ao H_2O_2 pela ação da SOD. GPx e Prx podem funcionar em um ciclo água-água alternativo, onde a Trx ou outros redutores reduzem Prx oxidada e esta por sua vez remove o H_2O_2 . Todas as Prx atuam de forma similar.



Fonte: figura adaptada de Dietz *et al.* (2006).

Portanto, as enzimas Trx e Prx podem atuar claramente como um ciclo água-água alternativo, auxiliando no dreno de energia em situações de excesso de elétrons nas cadeias tranas portadoras das membranas dos tilacóides. Entretanto, outra função de similar importância na fotossíntese é desempenhada pelas enzimas Trx, a regulação da atividade de enzimas do ciclo de Calvin no estroma dos cloroplastos, por meio da redução de pontes dissulfeto de proteínas alvo (BARAJAS-LÓPEZ *et al.*, 2012; CHIBANI *et al.*, 2010; MEYER *et al.*, 2009). O ciclo de Calvin, por sua vez, tem como principal função a assimilação do CO_2 por meio da enzima rubisco e subsequente redução das moléculas orgânicas até a síntese dos

açúcares de três carbonos, as trioses fosfato (BARAJAS-LÓPEZ *et al.*, 2012; CHIBANI *et al.*, 2010; MEYER *et al.*, 2009).

2.3 O ciclo de Calvin-Benson

A fotossíntese pode ser dividida em duas grandes etapas. A primeira está relacionada com a captação da energia luminosa proveniente do sol e sua conversão em energia química na forma de ATP e NADP(H) (KRAMER; EVANS, 2011; PERETÓ *et al.*, 1999; MURCHIE; NIYOGI, 2011), e foi objeto de estudo na primeira seção do presente trabalho. A segunda, o ciclo de Calvin-Benson é relacionado com a assimilação de carbono da atmosfera na forma de CO₂ e reações sucessivas de redução para a produção de moléculas de açúcar, matéria orgânica (KRAMER; EVANS, 2011; PERETÓ *et al.*, 1999; MURCHIE; NIYOGI, 2011). Toda a matéria orgânica do planeta Terra é decorrente de tais conjuntos de reações e, portanto, sua importância é indiscutível.

O ciclo de Calvin-Benson é assim denominado em homenagem aos dois pesquisadores americanos que em colaboração descobriram a importância do CO₂ na fotossíntese durante a década de 1950 (PERETÓ *et al.*, 1999). O ciclo se inicia com combinação do CO₂ com uma molécula de cinco carbonos, a ribulose-1,5-bifosfato. Como consequência dessa combinação, um total de seis carbonos é dividido em duas novas moléculas de três carbonos cada: 3-fosfoglicerato, ou ácido 3-fosfoglicérico (TAIZ; ZEIGER, 2009). Essa reação inicial é de extrema importância e é catalisada pela enzima ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase, ou rubisco (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Cada molécula de 3-fosfoglicerato formada sofre redução utilizando o ATP como doadores de elétrons para a formação de 1-3-bifosfoglicerato. Esse último, por sua vez é novamente reduzido, porém utilizando o poder redutor do NADP(H) e produzindo gliceraldeído-3-fosfato. As enzimas relacionadas com os dois passos de redução do 3-fosfoglicerato são a quinase do fosfoglicerato e desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato, respectivamente (TAIZ; ZEIGER, 2009). As moléculas de gliceraldeído-3-fosfato podem ser utilizadas para a síntese de glicose, frutose (monossacarídeos) e posteriormente sacarose (dissacarídeos) e os outros açúcares mais complexos com diversas funções celulares (TAIZ; ZEIGER, 2009). Essas moléculas são então exportadas a partir dos cloroplastos das regiões fotossintetizantes das plantas até os diversos órgãos que não realizam essa atividade (TAIZ;

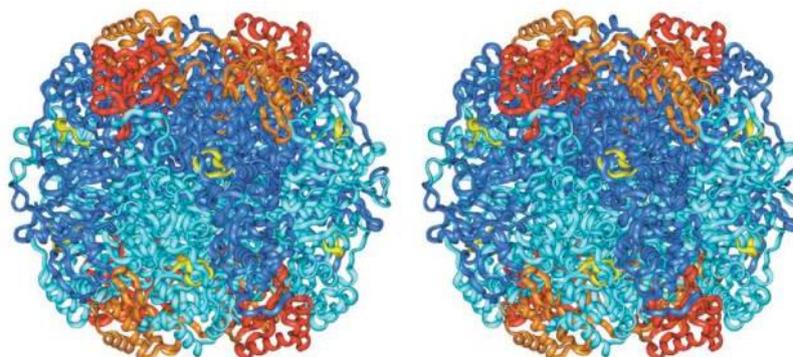
ZEIGER, 2009). As moléculas de gliceraldeído-3-fosfato também podem ser utilizadas para a regeneração da ribulose-1,5-bifosfato, participando da via das pentoses. Essa via é composta por uma série de reações envolvendo a síntese de moléculas de carboidratos e tem como objetivo a reposição da molécula de ribulose-1,5-bifosfato utilizada pela enzima rubisco na etapa de carboxilação, para continuidade do ciclo de Calvin-Benson (TAIZ; ZEIGER, 2009).

2.3.1 Ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco)

A enzima rubisco é uma das maiores (560 KDa) e a mais abundante entre as proteínas encontradas na natureza (PARRY, 2002; PORTIS; PARRY, 2007; SPREITZER; SALVUCCI, 2002; WHITNEY; HOUTZ; ALONSO, 2011). A expressão da holoenzima rubisco é uma evidência da hipótese simbiótica da aquisição dos cloroplastos pelas células eucarióticas (PORTIS; PARRY, 2007; SPREITZER; SALVUCCI, 2002). O gene de cloroplasto *rbcl* é o responsável pela codificação da subunidade maior da rubisco, com aproximadamente 56 KDa enquanto que a subunidade menor (14 KDa) é codificada pelo gene nuclear *rbcS* (PORTIS; PARRY, 2007; SPREITZER; SALVUCCI, 2002).

A holoenzima da rubisco (Figura 15) completa é composta por oito subunidades maiores e oito subunidades menores (PORTIS; PARRY, 2007; SPREITZER; SALVUCCI, 2002). Cada subunidade maior de rubisco possui resíduos de aminoácidos na extremidade C-terminal que estão envolvidos na interação com o análogo do estado de transição 2-carboxiarabinitol 1,5-bifosfato (CABP). Resíduos da extremidade N-terminal também participam do sítio ativo. Portanto, a estrutura ativa da holoenzima rubisco é composta por quatro dímeros (pares) de subunidade maior (PORTIS; PARRY, 2007; SPREITZER; SALVUCCI, 2002). Quatro pares de subunidade maior são flanqueados em cada extremidade por quatro subunidades menores, cada uma das quais interagindo com três subunidades grandes (PORTIS; PARRY, 2007; SPREITZER; SALVUCCI, 2002). Os quatro pares de subunidade maior são flanqueados em cada extremidade por quatro subunidades menores (PORTIS; PARRY, 2007; SPREITZER; SALVUCCI, 2002).

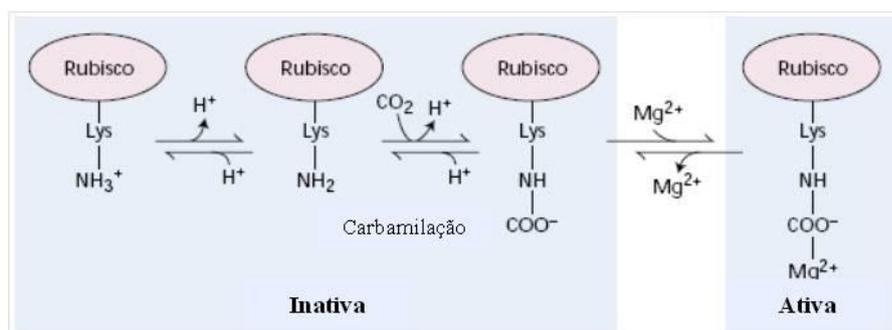
Figura 15 – Estrutura tridimensional da enzima funcional rubisco. A holoenzima é composta por oito subunidades maiores (azul) e oito subunidades menores (laranja). Ao centro se encontra localizado o sítio ativo entre as extremidades N-terminal e C-terminal de duas subunidades grandes.



Fonte: figura reproduzida de Spreitzer e Salvucci (2002).

A holoenzima rubisco encontra-se naturalmente em uma condição cataliticamente incompetente, ou desativada. A adição de carbamato, seguida de Mg^{+2} , que ocorre espontaneamente em pH ligeiramente alcalino, é necessária para a ativação da enzima (PORTIS; PARRY, 2007; SPREITZER; SALVUCCI, 2002). A rubisco carbamilada e ligada ao Mg^{+2} sofre algumas pequenas mudanças conformacionais na extremidade N-terminal, permitindo a ligação da ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) (PORTIS; PARRY, 2007; SPREITZER; SALVUCCI, 2002). A ligação de RuBP à enzima carbamilada gera mudanças mais drásticas na conformação da proteína e promove a retirada de dois H^+ do complexo, convertendo a RuBP em 2,3-enediol (enol- RuBP) (Figura18) (PORTIS; PARRY, 2007; SPREITZER; SALVUCCI, 2002). A rubisco no estado ativado pode sofrer a adição de CO_2 ou O_2 ao enol-RuBP, caracterizando a atividade carboxilase e oxigenase respectivamente (PORTIS; PARRY, 2007; SPREITZER; SALVUCCI, 2002). Os produtos resultantes da reação de carboxilação e oxigenação, 2-carboxi-3-cetoarabinitol-1,5-bifosfato ou 2-peroxi-3-cetoarabinitol-1,5-bifosfato, são então protonados e hidratados para produzir duas moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PG) ou uma molécula de 3-PG e uma molécula de 2-fosfoglicolato, respectivamente (PORTIS; PARRY, 2007; SPREITZER; SALVUCCI, 2002).

Figura 16 – Modelo do processo de ativação da rubisco. Primeiramente ocorre a formação de um complexo carbamato de Mg^{2+} no grupo ϵ -amino de uma lisina no sítio ativo da enzima. Dois prótons são liberados. O CO_2 de carbamilação é totalmente distinto do CO_2 que é assimilado na reação de carbamilação.



Fonte: figura adaptada de Taiz e Zeiger (2009).

A enzima ativase da rubisco não é uma enzima com atividade carbamilase, portanto não atua catalisando diretamente o processo de carbamilação necessário para a ativação da rubisco anteriormente descrito (CARMO-SILVA; SALVUCCI, 2011; FUKAYAMA *et al.*, 2012; PORTIS, 2003). A rubisco ativase é na realidade uma proteína da família AAA+ (ATPases relacionadas com diversas atividades celulares) e tem função na remoção dependente de ATP de vários fosfo-açúcares com função inibitória do sítio ativo da rubisco (CARMO-SILVA; SALVUCCI, 2011; FUKAYAMA *et al.*, 2012; PORTIS, 2003). A atividade da rubisco ativase é, portanto necessária para que ocorra a carbamilação espontânea da rubisco nas condições fisiológicas e, conseqüentemente assimilação fotossintética de CO_2 (CARMO-SILVA; SALVUCCI, 2011; FUKAYAMA *et al.*, 2012; PORTIS, 2003).

2.3.2 As etapas redutoras do ciclo de Calvin-Benson

A reação de assimilação de CO_2 atmosférico pela rubisco é a primeira etapa de uma série de reações do ciclo de Calvin-Benson (TAIZ; ZEIGER, 2009). Portanto, após a assimilação da molécula de CO_2 e conseqüente produção de duas moléculas de 3-PG, essa última será reduzida por ATP e NADP(H) essencialmente produzidos nas etapas fotoquímicas da fotossíntese para a produção de trioses-fosfato (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Cada molécula de 3-PG produzida é reduzida a 1,3-bifosfoglicerato (1,3-BPG) em uma reação catalisada pela enzima quinase do fosfoglicerato e envolve o gasto de uma molécula de ATP (BRINKMANN; MARTIN, 1996; HURTH *et al.*, 2007). A PGK é uma

proteína estromal de aproximadamente 35 KDa, ativamente regulada pela via de redução Fdx-Trx (sistema de redução de grupos tiol) e para sua atividade também é necessário o Mg^{+2} como cofator (BRINKMANN; MARTIN, 1996; HURTH *et al.*, 2007). A extremidade C-terminal da PGK ativada na presença de luz (Fdx-Trx) se liga ao substrato Mg-ATP, enquanto que a extremidade N-terminal se liga ao 3-PG, o que aciona mudanças conformacionais na proteína e a fosforilação do 3-PG e liberação do Mg-ADP (BRINKMANN; MARTIN, 1996; HURTH *et al.*, 2007).

As moléculas de 1,3-BPG produzidas por essa reação são mais uma vez reduzidas até a formação de uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato (G-3P) e uma molécula de diidroxiacetona, em reação catalisada pela desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato (G-3-PD) e com utilização de uma molécula de NADP(H) por cada 1,3-PG (HANCOCK *et al.*, 2005; PRICE *et al.*, 1995). A G-3-PD é uma proteína estromal e também é dependente da luz por meio do sistema de ativação Fdx-Trx (HANCOCK *et al.*, 2005; PRICE *et al.*, 1995). A enzima ativa é composta por duas subunidades A e B, com elevada similaridade de sequência de aminoácidos (HANCOCK *et al.*, 2005; PRICE *et al.*, 1995). A enzima ativa nos cloroplastos provavelmente pode existir em três configurações: A_2B_2 (160 KDa), A_4B_4 (300 KDa) e A_8B_8 (600 KDa), onde a primeira configuração é conhecida com a mais ativa (HANCOCK *et al.*, 2005; PRICE *et al.*, 1995).

O produto da redução do 1,3-BPG é a produção de trioses-fosfato que são importantes para a síntese de açúcares vitais para o vegetal como: glicose, frutose, sacarose e amido (CHO *et al.*, 2012). Entretanto a molécula de RuBP que é utilizada pela rubisco na assimilação do CO_2 atmosférico precisa ser regenerada. Haja vista essa necessidade de regeneração de RuBP, a planta dispõe de uma via metabólica específica e complexa para suprimento de substrato de ribulose pra a rubisco, a via regenerativa das pentoses (ZHOU; LAM; ZHANG, 2007; ZHU *et al.*, 2012).

2.3.3 As etapas regenerativas do ciclo de Calvin-Benson

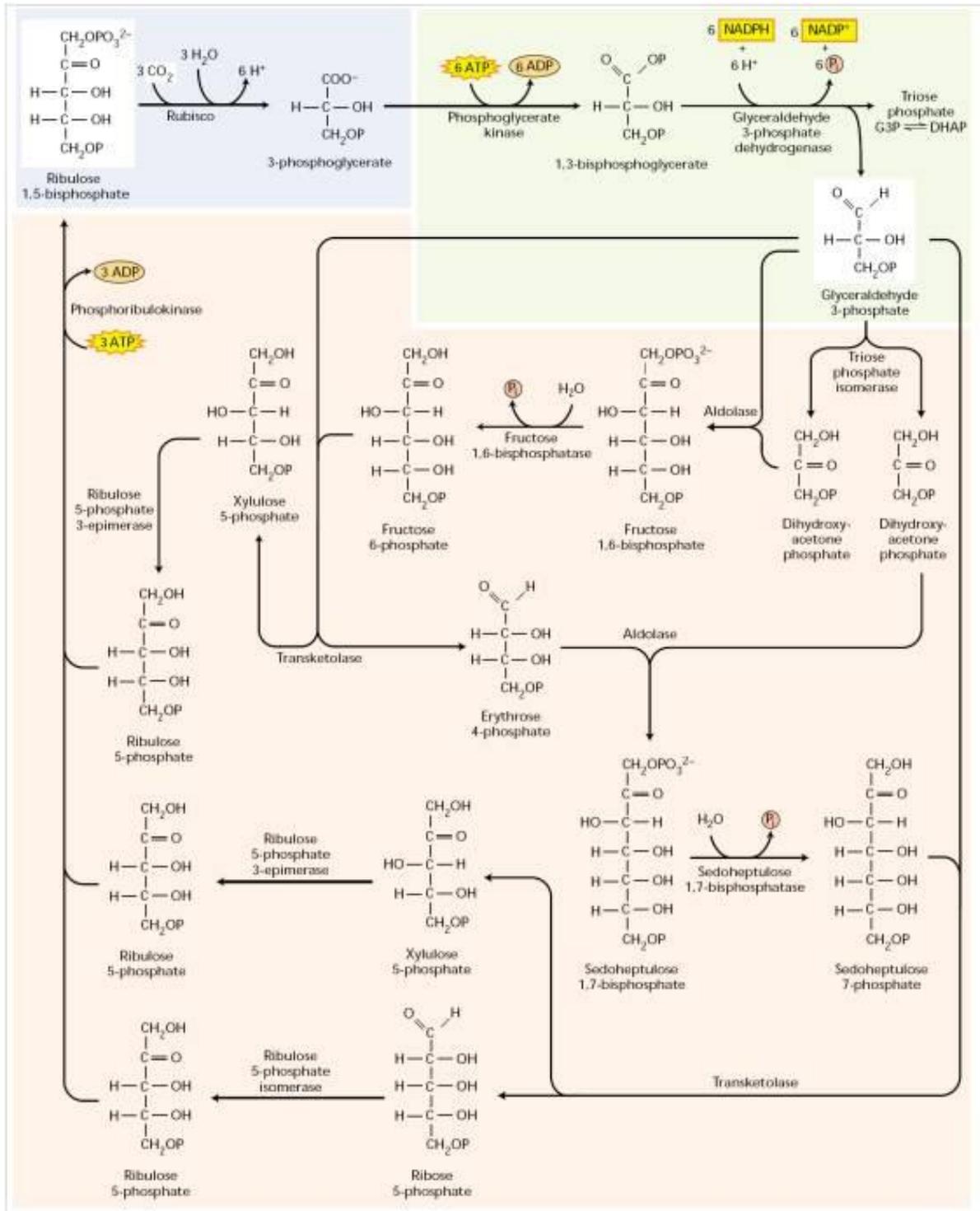
A via de regeneração da ribulose se inicia com a conversão de uma molécula de G-3-P em diidroxiacetona em uma reação catalisada pela enzima isomerase da triose-fosfato (TPI) (CHO *et al.*, 2012). A TPI é uma proteína com aproximadamente 30 KDa codificada por um único gene nuclear em *Oryza sativa*. A molécula de diidroxiacetona gerada é então

condensada a uma molécula de G-3-P produzindo frutose-1,6-bifosfato (1,6-FBP) em uma reação catalisada pela aldolase (FAN; ZHANG; ZHANG, 2009; UEMATSU *et al.*, 2012). A 1,6-FBP é então hidrolisada a frutose-6-fosfato (6-FBP) e a enzima transcetolase catalisa a transferência de uma unidade de dois carbonos da 6-FBP para uma molécula de G-3P, produzindo eritrose-4-fosfato (4 carbonos) e xilulose-5-fosfato (5 carbonos) (PERETÓ *et al.*, 1999; TAIZ; ZEIGER, 2009).

A enzima aldolase catalisa então a condensação de uma molécula de eritrose-4-fosfato com uma molécula de G-3-P, produzindo sedoheptulose-1,7-bifosfato (7 carbonos) (TAIZ; ZEIGER, 2009). Essa molécula de sete carbonos é então hidrolisada pela fosfatase da sedoheptulose-1,7-fosfato. A molécula resultante de sedoheptulose-7-fosfato perde dois carbonos por ação da transcetolase, transferindo-os para outra molécula de G-3-P, produzindo ribose-5-fosfato e xilulose-5-fosfato (DIETZ; PFANNSCHMIDT, 2011; PETERHANSEL; NIESSEN; KEBEISH, 2008). As moléculas de xilulose-5-fosfato produzidas na via são convertidas em ribulose-5-fosfato pela epimerase da ribulose-5-fosfato, enquanto que a ribose-5-fosfato sofre ação de uma isomerase para produção de uma terceira molécula de ribulose-5-fosfato. Finalmente, a enzima quinase da ribulose-5-fosfato catalisa a fosforilação das moléculas ribulose-5-fosfato para a regeneração completa da RuBP, utilizando poder redutor de moléculas de ATP. A RuBP pode se ligar novamente a enzima Rubisco e reiniciar o ciclo, como exibido na figura 17 (TAIZ; ZEIGER, 2009).

As enzimas do ciclo de Calvin-Benson, em especial Rubisco, G-3-PD, Seduheptulose-1,7-bifosfatase e PRK, necessitam da luz para passarem de um estado inativo para o estado ativo (BARAJAS-LÓPEZ *et al.*, 2011; RUELLAND; MIGINIAC-MASLOW, 1999). A conexão entre a energia luminosa captada na membrana dos tilacóides e a regulação das enzimas do ciclo de Calvin-Benson é feita por um sistema de redução de grupos tiol, baseado na via Fdx-Trx, como já foi mencionado anteriormente (BARAJAS-LÓPEZ *et al.*, 2011; RUELLAND; MIGINIAC-MASLOW, 1999). Portanto, ao funcionamento das vias metabólicas fotossintéticas é diretamente correlacionado com a quantidade de energia luminosa a qual a planta é exposta, tanto ao que tange às etapas iniciais da cadeia transportadora do fluxo linear de elétrons, como às etapas posteriores de assimilação de CO₂ e atividade redutora para produção de açúcares (BARAJAS-LÓPEZ *et al.*, 2011; RUELLAND; MIGINIAC-MASLOW, 1999).

Figura 17 – Modelo esquemático do ciclo de Calvin-Benson: A carboxilação de três moléculas de ribulose-1, 5 - bisfosfato leva à síntese líquida de uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato e a regeneração das três moléculas de material de partida.



Fonte: figura reproduzida de Taiz e Zeiger (2009).

2.3.4 O ciclo C2 (fotorespiração)

Como foi discutido acima, a Rubisco pode assimilar tanto o CO₂, produzindo duas moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PG) ou assimilar o O₂, produzindo então uma molécula de 3-PG e uma molécula de 2-fosfoglicolato (PORTIS; PARRY, 2007; SPREITZER; SALVUCCI, 2002). A atividade catalítica da rubisco utilizando o O₂ como substrato é cerca de 100 vezes menor do que utilizando o CO₂ como substrato, quando os dois gases são disponibilizados nas mesmas concentrações (PETERHANSEL; MAURINO, 2011). Portanto, a princípio o O₂ não representaria um fator tão negativo para a fotossíntese. Entretanto, a atmosfera da Terra evoluiu nos últimos bilhões de anos para um ambiente extremamente rico em O₂ (21%), o que fez da assimilação do O₂ uma grande competidora da reação de carboxilação necessária à fotossíntese (PETERHANSEL; MAURINO, 2011). Haja vista que a assimilação de O₂ pela rubisco produz uma molécula de 3-PG e uma de 2-fosfoglicolato, essa última não pode entrar na etapa redutora do ciclo de Calvin-Benson (página 45) como a primeira (PETERHANSEL; MAURINO, 2011). O resultado evolutivo foi o surgimento da via fotorespiratória, como melhor alternativa para lidar com o 2-fosfoglicolato.

Inicialmente o 2-fosfoglicolato produzido no cloroplasto é desfosforilado por ação da enzima fosfatase do 2-fosfoglicolato produzindo glicolato. Posteriormente, o glicolato migra do cloroplasto e alcança os peroxissomos, onde será convertido a glioxilato pela atividade da enzima oxidase do glicolato (GO). A atividade da GO tem consequências drásticas no balanço redox celular, uma vez que é formado H₂O₂ durante a oxidação do glicolato. Haja vista que o H₂O₂ pode facilmente deixar os peroxissomos e atingir outros compartimentos sub-celulares (SLESAK *et al.*, 2007), sua remoção é de extrema importância e nos peroxissomos esse papel é desempenhado principalmente pela catalase (PETERHANSEL; MAURINO, 2011). O glioxilato é então convertido à glicina, por meio de reação de amino-transferase envolvendo o glutamato e a serina e produzindo piruvato (PETERHANSEL; MAURINO, 2011). O piruvato é reduzido a glicerato, que retorna ao cloroplasto e é fosforilado pela PGK, produzindo 3 fosfoglicerato que pode participar normalmente da via redutora do ciclo de Calvin-Benson (figura 18) (PETERHANSEL; MAURINO, 2011).

Por outro lado, a glicina produzida no peroxissomo pela ação da amino-transferase segue para as mitocôndrias, onde será convertida em serina em reação catalisada pela descarboxilase da glicina, também denominada desidrogenase da glicina (GD) (BAUWE;

3. ESTRESSE DE ALTA LUZ

Os organismos fotossintetizantes evoluíram para conviver com um intrigante paradoxo acerca da energia luminosa na forma de fótons provinda pelo sol (LI *et al.*, 2009). Por um lado essa energia é extremamente indispensável para a assimilação do CO₂ e síntese de açúcares. Por outro, o acúmulo excessivo dessa mesma energia nas vias metabólicas da fotossíntese pode causar sérios danos e levar o organismo a morte (GOH; KO; KOH, 2012; LI *et al.*, 2009; ORT, 2001). Para sobreviver a tal dilema os organismos desenvolveram diversos mecanismos, associados com a síntese/degradação de proteínas chaves das vias metabólicas acima discutidas a fim de encontrar a melhor homeostase e sobreviver a situações ambientais extremas, principalmente aquelas enfrentadas por plantas de regiões tropicais (GOH; KO; KOH, 2012; LI *et al.*, 2009; ORT, 2001).

A definição exata de excesso de luz para uma planta varia dependendo das condições ambientais onde esse organismo vive, podendo atingir uma grande faixa de intensidades de irradiância luminosa, mesmo ao longo de um dia típico (LI *et al.*, 2009; ORT, 2001). Portanto, muitas vezes as plantas precisam lidar com quantidades de irradiância luminosa bem mais elevadas que o necessário para o funcionamento do seu fotossistema, caracterizando o estresse de luz (LI *et al.*, 2009; ORT, 2001). Essas condições de estresse de luz são de particular interesse para a agricultura de regiões tropicais, uma vez que as incidências luminosas podem chegar até 2400 $\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, embora esses valores variem ao longo do dia, das condições climáticas e da estação do ano (BERNACCHI; PIMENTEL; LONG, 2003).

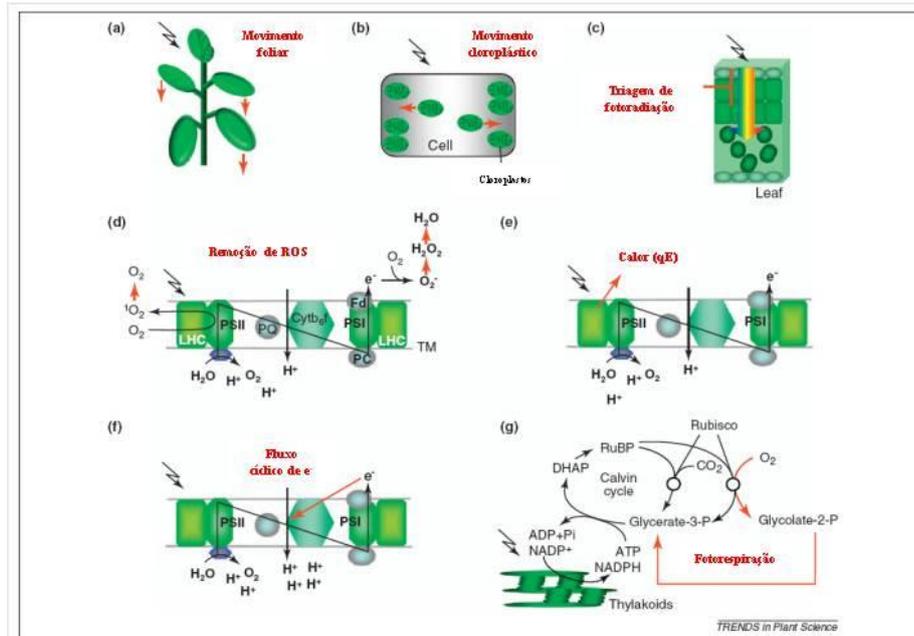
O arroz é uma espécie de origem tropical (África), portanto é considerada bem adaptada a condições de elevada incidência luminosa (SWEENEY; MCCOUCH, 2007). Entretanto, dados experimentais indicam que plantas de arroz com aproximadamente 35 dias de idade apresentam ponto de saturação da curva de luz ($P_N\text{-PPFD}$) em aproximadamente 1000 $\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, logo em condições tropicais de crescimento plantas de arroz podem ser submetidas à irradiâncias até três vezes maiores do que as necessárias para desempenhar sua plena atividade fotossintética (dados não publicados). Portanto, nessas condições a cadeia transportadora de elétrons dos tilacóides fica super-reduzida e a reação de Mehler se torna mais intensa (página 36). O produto da redução de O₂, o O₂⁻ é extremamente reativo e podem causar sérios danos (fotodano) as proteínas dos fotossistemas (GOH; KO; KOH, 2012; RAVEN, 2011; TIKKANEN *et al.*, 2008; TYYSTJARVI, 2008). Dependendo das

intensidades, assim como da duração do estresse de luz aplicado e da capacidade do organismo de se proteger do estresse provocado pela luz, o fotodano pode causar inibições irreversíveis na integridade da cadeia fotossintética de transporte de elétrons, caracterizando a fotoinibição (GOH; KO; KOH, 2012; MURATA *et al.*, 2007; RAVEN, 2011).

A fotoinibição é um fenômeno de redução da atividade fotossintética causada por uma série de reações que ocorrem principalmente no PSII, entretanto ainda pouco conhecidas (GOH; KO; KOH, 2012; RAVEN, 2011; TIKKANEN *et al.*, 2008; TYYSTJARVI, 2008). Nesse processo a atividade do complexo de evolução do oxigênio é perdida, seguido pela perda de atividade do restante do centro de reação (GOH; KO; KOH, 2012; MURATA *et al.*, 2007; RAVEN, 2011). O acúmulo de plastoquinonas reduzidas pode potencializar a ocorrência de reações de recombinação redox no PSII, levando a formação de P680 no estado tripleto, devido à combinação de P680* com plastoquinona reduzida (MUBARAKSHINA; IVANOV, 2010). A P680 no estado tripleto, por sua vez, pode reagir com o O₂, produzindo oxigênio singlete, uma ROS fortemente envolvida com o fotodano de PSII e potencialmente danosa ao cloroplasto (LIU *et al.*, 2004; MURATA *et al.*, 2007). A acumulação de oxigênio singlete e outras ROS contribuem para a inibição da síntese e reparo da proteína D1 (proteína crucial do PSII) caracterizando a fotoinibição (LIU *et al.*, 2004).

O PSII, de fato, é muito mais vulnerável aos efeitos da fotoinibição do que o PSI, uma vez que este conta com o fluxo cíclico de elétrons, um mecanismo que provavelmente desempenha papel crucial na defesa do PSI em condições de alta intensidade luminosa (ESSEMINE *et al.*, 2011). Entretanto, o PSII também dispõe de suas próprias vias de defesa para proteção contra estresse de alta luz (TAKAHASHI; BADGER, 2011). Os mecanismos de defesa (figura 19) contra a fotoinibição são exemplo da diversidade de adaptações que as plantas precisaram desenvolver para sobreviver em um ambiente de elevada exposição à energia luminosa (TAKAHASHI; BADGER, 2011). Exemplos de mecanismo foliares e cloroplásticos para minimizar a fotoinibição do PSII são: movimentos foliares, nos quais folhas se movem para minimizar a incidência de energia luminosa; movimentos de cloroplastos, no qual cloroplastos mudam sua posição na célula para reduzir a absorção de luz; triagem de fotoradiação, por exemplo, triagem UV por compostos fenólicos em células da epiderme; remoção enzimática e não enzimática de ROS; dissipação térmica de energia por meio do ciclo das zeaxantinas; fluxo cíclico de elétrons, como protetor do PSI e a atividade fotorespiratória (JIANG *et al.*, 2006; TAKAHASHI; BADGER, 2011).

Figura 19 – Mecanismos envolvidos na proteção contra fotoinibição em plantas. a) movimentos foliares, nos quais folhas se movem para minimizar a incidência de energia luminosa; b) movimentos de cloroplastos, no qual cloroplastos mudam sua posição na célula para reduzir a absorção de luz; c) triagem de fotoradiação, por exemplo, triagem UV por compostos fenólicos em células da epiderme; d) remoção enzimática e não enzimática de ROS; e) dissipação térmica de energia por meio do ciclo das zeaxantinas; f) Fluxo cíclico de elétrons, como protetor do PSI e g) atividade fotorespiratória.



Fonte: figura adaptada de Takahashi e Badger (2011).

A fotoinibição pode ser estimada em plantas vivas principalmente por parâmetros obtidos a partir da fluorescência da clorofila a, como a máxima eficiência quântica do PSII (F_v/F_m). O parâmetro F_v/F_m é calculado a partir de uma curva de indução fotossintética de plantas adaptadas ao escuro, na qual F_0 é a fluorescência inicial, F_m é a fluorescência máxima e F_v é diferença de $F_m - F_0$ (BAKER, 2008). Dois fatores principais estão relacionados com quedas nos valores de F_v/F_m que são: decréscimo na atividade do PSII e aumento na atividade da via de dissipação térmica das zeaxantinas (GOH; KO; KOH, 2012). A via das zeaxantinas é uma via de proteção foto-oxidativa que funciona como um escoamento do excesso de elétrons na cadeia fotoquímica. O principal parâmetro para sua estimativa *in vivo* é fornecido pelo *quenching* não fotoquímico (q_N), que guarda estreita relação com o NPQ (BAKER, 2008).

As medições da fluorescência da clorofila a podem ainda fornecer outros parâmetros extramente esclarecedores para a investigação do funcionamento da cadeia

fotoquímica *in vivo* que são: *quenching* fotoquímico (qP), eficiência quântica de fluorescência do PSII ($\Delta F/F_m'$), e taxa de transporte de elétrons do PSII (ETR) (BAKER, 2008). Esses parâmetros são obtidos com a utilização de um fluorímetro, mensurando a quantidade de fluorescência que uma folha emite quando exposta a luz fotossinteticamente ativa (PPFD). O qP é uma medida que nos permite aferir a quantidade de elétrons que é direcionado para as cadeias fotoquímicas. Juntamente com o $\Delta F/F_m'$ e o ETR o qP tende a decrescer abruptamente quando plantas são expostas a estresse de alta luz, uma vez que o pool de quinonas se torna totalmente reduzido e a energia não pode mais fluir através do PSII (ZENG *et al.*, 2010). Diferentemente, o Fv/Fm geralmente permanece pouco alterado, exceto por estresse mais drásticos. Essa natureza reflete a natureza diferencial dos parâmetros citados, uma vez que $\Delta F/F_m'$, ETR e qP são parâmetros instantâneos, mensurados em plantas expostas a PPFD, enquanto que Fv/Fm fornece uma avaliação do potencial da capacidade de regeneração do PSII quando submetido a um intervalo de escuro, ou seja capacidade de evitar a fotoinibição (GOH; KO; KOH, 2012).

O excesso de elétrons na PET causado pela exposição à alta luz acaba por aumentar a reação de redução do O₂ no PSI. Essa redução produz O₂⁻ e outras espécies reativas de oxigênio, que devem ser removidas por sistemas de dreno alternativo de elétrons, como o ciclo água-água ou pela via da Trx (ASADA, 2006). Entretanto, quando a quantidade de energia ultrapassa a capacidade de remoção dos sistemas de dreno alternativo, as ROS se acumulam e inibem o processo de re-síntese da proteína D1 do PSII (página 18), reduzindo o potencial de restauração do PSII após um período de escuro. Essa redução de potencial é representada justamente pela medida de Fv/Fm (BAKER, 2008). Entretanto, com a redução da atividade máxima do PSII os elétrons passam a seguir rotas alternativas ao fluxo linear PSII-PSI. O ciclo das xantinas envolve a produção de xantofila de-epoxidada a partir de xantofila epoxidada. A menor energia do estado excitado de xantofilas em relação às clorofilas permite que a xantofila epoxidada funcione como um acceptor de elétrons da clorofila *a* (RAVEN, 2011). Portanto, em ambientes de estresse de alta luz, as quedas de Fv/Fm geralmente são acompanhadas por incrementos na medida de NPQ, representando essa última maior atividade da epoxidase de xantofilas e dissipação térmica do excesso de elétrons (RAVEN, 2011).

Portanto, é de extrema importância para a sobrevivência das plantas em ambientes de elevada irradiância luminosa que o excesso de elétrons acumulados na PET seja desviado para rotas alternativas (RAVEN, 2011). Nesse contexto, estudos recentes têm apontado a

importância da via fotorespiratória como mecanismo de escoamento de excesso de elétrons. Classicamente, o ciclo C2 era considerado apenas uma via fútil, representando concorrência prejudicial ao ciclo C3 de assimilação de CO₂ (KANGASJÄRVI *et al.*, 2012). Entretanto, hoje é consenso entre a maioria dos autores que a fotorespiração desempenha papel muito importante como mecanismo de proteção contra fotoinibição (KANGASJÄRVI *et al.*, 2012). Geralmente, a indução na expressão de enzimas chaves nesse processo como GO, CAT e GS2 são fortes indicativos de um aumento na atividade fotorespiratória (HOSHIDA *et al.*, 2000). Plantas que foram manipuladas para a superexpressão de GS2 apresentam maior capacidade de prevenir a super-redução da PET (HOSHIDA *et al.*, 2000). Contrariamente, plantas deficientes em GO são mais suscetíveis a fotoinibição (YAMAGUCHI; NISHIMURA, 2000).

A necessidade de controlar o excesso de elétrons acumulados na PET. Por exemplo, sobre condições crescentes de luz, ocorre maior expressão de proteases do tipo serínica que degradam efetivamente as extremidades N-terminais de proteínas do LHCII (FORSBERG *et al.*, 2005). A dissociação do complexo LHCII está diretamente relacionada com a indução do NPQ, uma vez que provavelmente proteínas envolvidas com a reação de dissipação de calor se encontram apreendidas no interior do complexo (CP24 e CP29) (BETTERLE *et al.*, 2009). Plantas deficientes na expressão de CP29 apresentam maior sensibilidade à luz, e reduzida capacidade de estimulação do NPQ (DE BIANCHI *et al.*, 2011). Portanto, a síntese e a degradação das proteínas do LHC estão sobre constante regulação e são componentes cruciais para a intrincada via de sinalização em resposta ao estresse de elevada irradiância (CHENG; FLEMING, 2009).

Outras proteínas da cadeia fotossintética de transporte de elétrons dos tilacóides têm sido comumente associadas a processos regulatórios negativos em resposta a estresse de alta luz. Diversos estudos têm mostrado que as quantidades dessas proteínas são reduzidas em plantas submetidas a estresse de alta luz. Plantas de *Panax ginseng* submetidas apresentam forte repressão na expressão da subunidade PsbP após serem expostas a 1700 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, acompanhadas de indução nas cAPX (NAM *et al.*, 2003). resultados similares foram identificados quanto à expressão das proteínas PsbO e PsbP de *Chlamydomonas reinhardtii* e *A.thaliana*, quando submetidas à estresse de alta luz (FÖRSTER; MATHESIUS; POGSON, 2006; GIACOMELLI; RUDELLA; WIJK, 2006). A plastocianina também foi encontrada em menores quantidades por análise 2-DE de cloroplastos de *A.thaliana* submetidos a 1000 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, assim como a própria PsbO (PHEE *et al.*, 2004). Portanto, uma menor acumulação de proteínas envolvidas com a PET é relativamente comum em estudos

proteômicos envolvendo estresse de alta luz (FÖRSTER; MATHESIUS; POGSON, 2006; GIACOMELLI; RUDELLA; WIJK, 2006) e possivelmente faz parte de uma ampla e extremamente complexa rede de sinalização celular que evoluiu no sentido de limitar o acúmulo de elétrons nas membranas dos tilacóides e, desse modo, proteger o organismo de outros danos colaterais causados pelo desbalanço no equilíbrio redox (FÖRSTER; MATHESIUS; POGSON, 2006; GIACOMELLI; RUDELLA; WIJK, 2006).

Haja vista a tendência de proteínas envolvidas com a PET serem reguladas negativamente em resposta a alta luz (PHEE *et al.*, 2004), as proteínas relacionados com a proteção oxidativa, entretanto, seguem caminho oposto. A indução de cAPX de *A. thaliana* em resposta a alta luz já é bastante conhecida e documentada em trabalhos desde a década de 1990 (KARPINSKI, 1999; KARPINSKI *et al.*, 2009; KRUK; KARPINSKI, 2006). Trabalho mais recentes mostram que *Panax ginseng* submetidas a estresse de elevada irradiância apresentam indução similar na expressão das cAPX (NAM *et al.*, 2003). Adicionalmente, isoformas de Cu/Zn-SOD e Fe-SOD também foram encontradas em maior quantidade em análises proteômicas envolvendo plantas submetidas a estresse de alta irradiância (FÖRSTER; MATHESIUS; POGSON, 2006; GIACOMELLI; RUDELLA; WIJK, 2006). A regulação dessas proteínas é de extrema importância para a manutenção da homeostase redox em células vegetais durante o estresse de alta luz, uma vez que o acúmulo de ROS além de ser diretamente responsável pela fotoinibição pode representar risco em potencial para o funcionamento de diversos mecanismos celulares e levar o organismo à morte (ASADA, 2006; FOYER; NOCTOR, 2009).

A proteína rubisco é um dos principais alvos de oxidação em células vegetais que apresentam desbalanço oxidativo (MILLER *et al.*, 2007; RIZHSKY *et al.*, 2002). Conseqüentemente, a degradação da proteína rubisco é comumente exacerbada em resposta ao aumento de ROS, o que leva a uma imediata redução na taxa de assimilação de CO₂ e por consequência fotossíntese (LEE *et al.*, 2007; RIZHSKY *et al.*, 2002). Adicionalmente, a Rubisco e outras enzimas da via regeneradora de RuBP são efetivamente reguladas por um sistema dependente de Fdx-Trx, que interconecta perfeitamente as duas vias da fotossíntese e permite a planta regular todo o aparato fotossintético em função da quantidade de fótons que recebe e que gasta nos processo de síntese de trioses (MEYER *et al.*, 2009). *In vivo*, os parâmetros fornecidos por um analisador de gás infravermelho (IRGA) são extremamente úteis para determinar os efeitos da alta luz nos processos de assimilação de CO₂. A taxa de carboxilação máxima (V_{cmax}) e taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}) são

parâmetros que possibilitam estimar a atividade de assimilação de CO₂ da Rubisco e a quantidade de energia destinada a regeneração da RuBP, respectivamente e *in vivo* (YAMORI *et al.*, 2008).

Plantas submetidas à alta luz geralmente apresentam menores valores de V_cmax e J_{max} quando comparadas a plantas controle. As quedas desses parâmetros são comumente associadas às quedas nos valores de condutância estomática (g_s) que é um fenômeno conhecidamente regulado pelos níveis de ABA e de H₂O₂ (TAIZ; ZEIGER, 2009). Portanto, a regulação do metabolismo redox está intimamente ligada à regulação de todo o processo fotossintético. Essa regulação afeta desde a expressão de proteínas associadas à cadeia de transporte fotossintética de elétrons até processos de assimilação de CO₂ seja por modulação de atividade (Fdx-Trx) ou por maior degradação da Rubisco em virtude do desbalanço da homeostase redox (RIZHSKY *et al.*, 2002). Entretanto, haja vista a imensa importância da manutenção da homeostase redox em plantas submetidas a estresse de alta luminosidade, ainda muito pouco se sabe acerca dos reais papéis desempenhados pelas proteínas consideradas de proteção oxidativa, em especial as APX de citosol.

4. O SILENCIAMENTO DE CAPX

As APX são enzimas extremamente especializadas na remoção de H₂O₂, utilizando para tal o AsA como doador de elétrons (KOUSSEVITZKY *et al.*, 2008) e amplamente distribuídas pelos subcompartimentos celulares (TEIXEIRA *et al.*, 2006). São conhecidas isoformas de APX direcionadas aos cloroplastos, aos peroxissomos, às mitocôndria e ao citosol, todas com funções similares na remoção de H₂O₂ (TEIXEIRA *et al.*, 2004). Muito embora os maiores “sítios” de produção de H₂O₂ em células vegetais sejam peroxissomos seguidos pelos cloroplastos, em uma proporção de 2,5:1 (SLESACK *et al.*, 2007), estima-se que grande parte da atividade total das APX seja desempenhado pelas isoformas citosólicas (KOUSSEVITZKY *et al.*, 2008), uma vez que o H₂O₂ produzido nos cloroplastos e peroxissomos facilmente pode migrar por meio de aquaporinas e se acumular no citosol (MILLER; DICKINSON; CHANG, 2010).

Em situações de estresses abióticos, como alta luz, calor, salinidade e seca, a produção de H₂O₂ tende a ser exacerbada nas células vegetais (BONIFACIO *et al.*, 2011; MUNNS; TESTER, 2008; SANDA *et al.*, 2011). Esse acúmulo é uma consequência do

desbalanço entra a quantidade de energia disponível nos fotossistemas e a capacidade de utilização dessa energia pelo organismo, causando a produção de diversas ROS, entre as quais H_2O_2 (ASADA, 2006). Diversos estudos apontam a capacidade de organismos vegetais de induzir a expressão de APX diante de situações abióticas adversas, como as citadas acima (CHANG *et al.*, 2004; KAVITHA; VENKATARAMAN; PARIDA, 2008; MARUTA *et al.*, 2010; MURGIA *et al.*, 2004; YOSHIMURA *et al.*, 2000). A elevada luminosidade, por exemplo, é considerada capaz de exercer forte indução na expressão das cAPX em *A.thaliana* (KARPINSKI *et al.*, 2009), espinafre (YOSHIMURA *et al.*, 2000) e arroz (MORITA *et al.*, 1999).

Outros estudos envolvendo mutantes com deficiência na expressão de APX, por sua vez, mostram que a falta de uma ou mais isoformas dessa enzima pode ser extremamente prejudicial (KOUSSEVITZKY *et al.*, 2008; PNUELI *et al.*, 2003). Plantas de *A.thaliana* similarmente deficientes para a expressão das cAPX apresentaram maior oxidação de proteínas dos cloroplastos, especialmente rubisco (DAVLETOVA *et al.*, 2005; RIZHISKY *et al.*, 2002), sugerindo que a deficiência nas cAPX poderia estar sinalizando processos diretamente relacionados com a fotossíntese, o que poderia tornar essas plantas mais suscetíveis ao estresse de alta luz (DAVLETOVA *et al.*, 2005). Essas observações levaram a comunidade científica mundial a construir a hipótese de que a APX exerce grande importância na proteção oxidativa celular vegetal, e portanto muitos trabalhos foram construídos envolvendo a super-expressão dessas enzimas para fins de obtenção de plantas mais resistentes a condições diversas de estresse (LEE *et al.*, 2007; MURGIA *et al.*, 2004), entretanto conferindo algum pequeno aumento de resistência contra estresses abióticos a essas plantas.

Entretanto, resultados paradoxais têm sido encontrados em plantas de arroz e *A.thaliana* com silenciamento para isoformas de APX. Plantas de arroz duplamente silenciadas para as cAPX não apresentam grandes diferenças na morfologia geral (ROSA *et al.*, 2010) e quando submetidas a estresse de alta luz não apresentaram grandes aumentos nas concentrações de H_2O_2 e TBARS quando comparadas a plantas não transformadas (BONIFACIO *et al.*, 2011). Resposta similarmente intrigante foi observada quando plantas de tabaco foram duplamente silenciadas em APX 1 (citoplasmática) e catalase, exibindo uma resistência a estresses abióticos diversos até superior do que as plantas que não foram modificadas geneticamente (RIZHISKY *et al.*, 2002). Mais recentemente plantas de *A.thaliana* nocauteadas nos genes para expressão de APX 1 (citoplasmática) e APX 7 (tilacoidal) também não apresentaram uma maior sensibilidade a estresses abióticos quando comparadas

com plantas não transformadas. Essas respostas intrigantes tem levado os pesquisadores a formularem uma nova hipótese acerca dos mecanismos de proteção oxidativa em células vegetais, que sugere a existência de uma larga faixa de mecanismos alternativos, redundantes que podem ser acionados nessas plantas mutantes, consistindo num fenômeno de plasticidade genética e metabólica (BONIFACIO *et al.*, 2011; MILLER; SHULAEV; MITTLER, 2008; MILLER *et al.*, 2007; NICOTRA *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2010).

Exemplos desse fenômeno de plasticidade podem ser observados em estudos recentes que mostraram que as plantas de arroz deficientes em cAPX apresentam modulação positiva na expressão de diversos genes ligados a fotossíntese, o que poderia sugerir um mecanismo adaptativo compensatório para resistir ao estresse de alta luz na ausência de cAPX (RIBEIRO *et al.*, 2012). O H₂O₂ é uma molécula conhecida capaz de atuar na sinalização celular modulando a expressão de diversos genes (KLEIN *et al.*, 2012; SLESACK *et al.*, 2007; VANDERAUWERA *et al.*, 2011). Acredita-se, portanto, que uma acumulação inicial de H₂O₂ nessas plantas deficientes em uma ou mais isoforma de APX possa conferir algum tipo de habilidade de sinalização para a modulação da expressão de diversas proteínas, a nível de gene ou a nível de atividade enzimática, atuando em diversos e pouco conhecidos vias de resposta ao estresse abiótico (MILLER; SHULAEV; MITTLER, 2008; ROSA *et al.*, 2010), como foi observado na expressão de proteínas da fotossíntese em plantas de arroz (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Entretanto, a compreensão dos reais papéis das APX citosólicas em células vegetais ainda é muito limitado, principalmente ao que tange as consequências dessa mutação para a fotossíntese. Como a indução na expressão de proteínas relacionadas com fotossíntese pode influir na atividade fotossintética *in vivo* de plantas de arroz deficientes em cAPX? Seria possível um aumento inicial das quantidades de proteínas envolvidas com a fotossíntese e vias relacionadas conferiri algum tipo de resistência a plantas de arroz silenciadas em cAPX submetidas a estresse de alta luz? Quais mecanismos podem estar associados com a metabólica apresentada pelas plantas de arroz deficientes em APX? Seriam esses mecanismos compensatórios suficientes para garantir a sobrevivência dessas plantas na condição de estresse? Objetivando responder essas e outras perguntas, o corrente trabalho foi desenvolvido.

5. OBJETIVOS

- Estabelecer plantas de arroz silenciadas para expressão das isoformas citosólicas de APX;
- Conduzir experimento de alta luz com plantas mutantes e não-transformadas;
- Avaliar os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas;
- Avaliar a expressão de proteínas-chave ligadas à fotossíntese e fotorespiração por meio de 2-DE;
- Mensurar as atividades de enzimas ligadas à fotossíntese, fotorespiração e metabolismo redox nas plantas mutantes e não-transformadas;
- Quantificar o conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e antocianinas;
- Analisar a expressão dos mRNAs de interesse por meio de RT-PCR (Real time PCR);

6. BIBLIOGRAFIA

ALLAHVERDIYEVA, Y. *et al.* Insights into the function of PsbR protein in *Arabidopsis thaliana*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1767, n. 6, p. 677-85, jun. 2007.

ALRIC, J. *et al.* Spectral and redox characterization of the heme c_i of the cytochrome b₆f complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 44, p. 15860-5, nov. 2005.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-41, mai. 2002.

AMUNTS, A.; DRORY, O.; NELSON, N. A glimpse into the atomic structure of plant photosystem I. In: Fromme, P. **Photosynthetic Protein Complexes – A structural approach**. Weinheim: Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co, 2008. p. 65-75.

AMUNTS, A.; DRORY, O.; NELSON, N. The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. **Nature**, v. 447, n. 7140, p. 58-63, 3 mai. 2007.

ANTONKINE, M. L. *et al.* Synthesis and characterization of de novo designed peptides modelling the binding sites of [4Fe-4S] clusters in photosystem I. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1787, n. 8, p. 995-1008, ago. 2009.

APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES : Metabolism , Oxidative Stress , and Signal Transduction. **Annual review of plant biology**, v. 55, p. 373-399, jan. 2004.

ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. **Plant physiology**, v. 141, p. 391-396, jun. 2006.

ASADA, K. THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 50, p. 601-639, jun. 1999.

BAI, Y. *et al.* Structural and dynamic characterization of an unfolded state of poplar apo-plastocyanin formed under nondenaturing conditions. **Protein science**, v. 10, p. 1056-1066, mar. 2001.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual review of plant biology**, v. 59, p. 89-113, jan. 2008.

BANIULIS, D. *et al.* Review Structure – Function of the Cytochrome b 6 f Complex. **Photochemistry and photobiology**, v. 84, p. 1349-1358, jul. 2008.

BARAJAS-LÓPEZ, J. D. D. *et al.* Circadian regulation of chloroplastic f and m thioredoxins through control of the CCA1 transcription factor. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 6, p. 2039-51, mar. 2011.

BARAJAS-LÓPEZ, J. DE D. *et al.* Expression of the chloroplast thioredoxins f and m is linked to short-term changes in the sugar and thiol status in leaves of *Pisum sativum*. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 6, p. 2039-51, 12 jul. 2012.

BAUWE, H.; KOLUKISAOGLU, U. Genetic manipulation of glycine decarboxylation. **Journal of experimental botany**, v. 54, n. 387, p. 1523-35, jun. 2003.

BENZ, J. P. *et al.* A new concept for ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase binding to plant thylakoids. **Trends in plant science**, v. 15, n. 11, p. 608-13, nov. 2010.

BERNACCHI, C. J.; PIMENTEL, C.; LONG, S. P. In vivo temperature response functions of parameters required to model RuBP-limited photosynthesis. **Plant, cell and environment**, v. 26, p. 1419-1430, mar. 2003.

BETTERLE, N. *et al.* Light-induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for non-photochemical quenching induction. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 22, p. 15255-66, 29 mai. 2009.

BONDARAVA, N.; UN, S.; KRIEGER-LISZKAY, A. Manganese binding to the 23 kDa extrinsic protein of Photosystem II. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1767, n. 6, p. 583-8, jun. 2007.

BONIFACIO, A. *et al.* Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. **Plant, cell & environment**, v. 34, n. 10, p. 1705-22, out. 2011.

BRICKER, T. M. *et al.* Biochimica et Biophysica Acta The extrinsic proteins of Photosystem II. **BBA - Bioenergetics**, v. 1817, n. 1, p. 121-142, jul. 2012a.

BRICKER, T. M. *et al.* The extrinsic proteins of Photosystem II. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1817, n. 1, p. 121-42, jan. 2012b.

BRICKER, T. M.; FRANKEL, L. K. Auxiliary functions of the PsbO, PsbP and PsbQ proteins of higher plant Photosystem II: a critical analysis. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 104, n. 1-2, p. 165-78, fev. 2011.

BRICKER, T. M.; FRANKEL, L. K. The structure and function of the 33 kDa extrinsic protein of Photosystem II: A critical assessment. **Photosynthesis research**, v. 56, p. 157-173, jan. 1998.

BRINKMANN, H.; MARTIN, W. Higher-plant chloroplast and cytosolic 3-phosphoglycerate kinases: a case of endosymbiotic gene replacement. **Plant molecular biology**, v. 30, n. 1, p. 65-75, jan. 1996.

BUCHANAN, B. B.; BALMER, Y. Redox regulation: a broadening horizon. **Annual review of plant biology**, v. 56, p. 187-220, jan. 2005.

CARMO-SILVA, A E.; SALVUCCI, M. E. The activity of Rubisco's molecular chaperone, Rubisco activase, in leaf extracts. **Photosynthesis research**, v. 108, n. 2-3, p. 143-55, set. 2011.

CHANG, C. C.-C. *et al.* Induction of ASCORBATE PEROXIDASE 2 expression in wounded Arabidopsis leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 38, n. 3, p. 499-511, mai. 2004.

CHENG, Y.-C.; FLEMING, G. R. Dynamics of light harvesting in photosynthesis. **Annual review of physical chemistry**, v. 60, p. 241-62, jan. 2009.

CHIBANI, K. *et al.* Atypical thioredoxins in poplar: the glutathione-dependent thioredoxin-like 2.1 supports the activity of target enzymes possessing a single redox active cysteine. **Plant physiology**, v. 159, n. 2, p. 592-605, jun. 2012.

CHIBANI, K. *et al.* The chloroplastic thiol reducing systems: dual functions in the regulation of carbohydrate metabolism and regeneration of antioxidant enzymes, emphasis on the poplar redoxin equipment. **Photosynthesis research**, v. 104, n. 1, p. 75-99, abr. 2010.

CHO, M.-H. *et al.* Manipulation of triose phosphate/phosphate translocator and cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase, the key components in photosynthetic sucrose synthesis, enhances the source capacity of transgenic Arabidopsis plants. **Photosynthesis research**, v. 111, n. 3, p. 261-8, mar. 2012.

COGDELL, R.; GARDINER, A. The structure of purple bacterial antenna complexes. In: Fromme, P. **Photosynthetic Protein Complexes – A structural approach**. Weinheim: Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co, 2008. p. 325-335.

COHU, C. M. *et al.* Copper delivery by the copper chaperone for chloroplast and cytosolic copper/zinc-superoxide dismutases: regulation and unexpected phenotypes in an Arabidopsis mutant. **Molecular plant**, v. 2, n. 6, p. 1336-50, nov. 2009.

COMMET, A. *et al.* pH Optimum of the Photosystem II H₂O Oxidation Reaction: Effects of PsbO, the Manganese-Stabilizing Protein, Cl⁻ Retention, and Deprotonation of a Component Required for O₂ Evolution Activity. **Biochemistry**, v. 51, n. 18, p. 3808-18, 8 mai. 2012.

CRAMER, W. A. *et al.* Transmembrane traffic in the cytochrome b₆f complex. **Annual review of biochemistry**, v. 75, p. 769-90, jan. 2006.

CRAMER, W. A. *et al.* Cytochrome b₆ f Complex, Core Structure, Spectroscopy, and Function of Heme cn: n-Side Electron and Proton Transfer Reactions. In: Fromme, P. **Photosynthetic Protein Complexes – A structural approach**. Weinheim: Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co, 2008. p. 155-169.

CRAMER, W. A. *et al.* Structure of the cytochrome b 6 f complex : new prosthetic groups , Q-space , and the “hors d’oeuvres hypothesis” for assembly of the complex. **Photosynthesis research**, v. 85, p. 133-144, ago. 2005.

DAVLETOVA, S. *et al.* Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 Is a Central Component of the Reactive Oxygen Gene Network of Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 17, p. 268-281, jan. 2005.

DE BIANCHI, S. *et al.* Arabidopsis mutants deleted in the light-harvesting protein Lhcb4 have a disrupted photosystem II macrostructure and are defective in photoprotection. **The Plant cell**, v. 23, n. 7, p. 2659-79, jul. 2011.

DEKKER, J. P.; BOEKEMA, E. J. Supercomplexes of Photosystems I and II with External Antenna Complexes in Cyanobacteria and Plants. I In: Fromme, P. **Photosynthetic Protein Complexes – A structural approach**. Weinheim: Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co, 2008. p. 137-150.

DÍAZ-MORENO, I. *et al.* Structure of the complex between plastocyanin and cytochrome f from the cyanobacterium Nostoc sp. PCC 7119 as determined by paramagnetic NMR. The balance between electrostatic and hydrophobic interactions within the transient complex determines the relati. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 19, p. 18908-15, 13 mai. 2005.

DÍAZ-QUINTANA, A.; HERVÁS, M. Plastocyanin and cytochrome c6: The soluble electron carriers between the cytochrome b6f complex and photosystem I. In: Fromme, P. **Photosynthetic Protein Complexes – A structural approach**. Weinheim: Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co, 2008. p. 181-196.

DIETZ, K.-J. *et al.* The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. **Journal of experimental botany**, v. 57, n. 8, p. 1697-709, jan. 2006.

DIETZ, K.-J.; PFANNSCHMIDT, T. Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. **Plant physiology**, v. 155, n. 4, p. 1477-85, abr. 2011.

EDELMAN, M.; MATTOO, A. K. The D1 Protein: Past and Future Perspectives. In: Demmig-Adams, B.; Adams III, W. W. e Mattoo, A.K. **Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment**. Netherlands: Springer, 2006. p. 23-38.

ESSEMINE, J. *et al.* Abolition of photosystem I cyclic electron flow in *Arabidopsis thaliana* following thermal-stress. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 49, n. 3, p. 235-43, mar. 2011.

FAN, W.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y. Cloning and molecular characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene regulated by high-salinity and drought in *Sesuvium portulacastrum*. **Plant cell reports**, v. 28, n. 6, p. 975-84, jun. 2009.

FISCHER, N. *et al.* The PsaC subunit of photosystem I provides an essential lysine residue for fast electron transfer to ferredoxin. **The EMBO journal**, v. 17, n. 4, p. 849-58, fev. 1998.

FORSBERG, J. *et al.* Protease activities in the chloroplast capable of cleaving an LHCII N-terminal peptide. **Physiologia Plantarum**, v. 123, n. 1, p. 21-29, jan. 2005.

FÖRSTER, B.; MATHESIUS, U.; POGSON, B. J. Comparative proteomics of high light stress in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proteomics**, v. 6, n. 15, p. 4309-20, ago. 2006.

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant physiology**, v. 155, n. 1, p. 93-100, jan. 2011.

FOYER, H. C.; NOCTOR, G. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms : **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 4, p. 861-905, set. 2009.

FROMME, P.; GROTHJOHANN, I. Overview of photosynthesis. In: Fromme, P. **Photosynthetic Protein Complexes – A structural approach**. Weinheim: Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co, 2008. p. 1-18.

FROMME, R. Ferredoxin and Flavodoxin Mediated Electron Transfer in Photosystem I. In: Fromme, P. **Photosynthetic Protein Complexes – A structural approach**. Weinheim: Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co, 2008. p. 341-352.

FUKAYAMA, H. *et al.* Overexpression of rubisco activase decreases the photosynthetic CO₂ assimilation rate by reducing rubisco content in rice leaves. **Plant & cell physiology**, v. 53, n. 6, p. 976-86, jun. 2012.

GIACOMELLI, L.; RUDELLA, A.; WIJK, K. J. VAN. High Light Response of the Thylakoid Proteome in Arabidopsis Wild Type and the Ascorbate-Deficient Mutant *vtc2-2*. A Comparative Proteomics Study. **Plant physiology**, v. 141, p. 685-701, jun. 2006.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases. **Plant physiology**, v. 59, p. 315-318, out. 1977.

GOH, C.; KO, S.; KOH, S. Photosynthesis and Environments : Photoinhibition and Repair Mechanisms in Plants. **Journal of plant biology**, v. 55, p. 93-101, dez. 2012.

GROTJOHANN, I.; FROMME, P. Structure of cyanobacterial photosystem I. **Photosynthesis research**, v. 85, n. 1, p. 51-72, jan. 2005.

HAEHNEL, W.; HESSE, V.; PROPPER, A. Function transfer of a subunit from plastocyanin of photosystem i reaction to p700 center. **FEBS Letters**, v. 111, n. 1, p. 79-82, fev. 1980.

HANCOCK, J. T. *et al.* Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in Arabidopsis. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 43, n. 9, p. 828-35, set. 2005.

HANKE, G. T. *et al.* A screen for potential ferredoxin electron transfer partners uncovers new, redox dependent interactions. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1814, n. 2, p. 366-74, fev. 2011.

HASEGAWA, K.; ONO, T. Spin-exchange structures of S 2 -state Mn-cluster in photosynthetic oxygen-evolving complex. **RIKEN Review**, v. 24, n. 24, p. 62-63, set. 1999.

HEBBELMANN, I. *et al.* Multiple strategies to prevent oxidative stress in Arabidopsis plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 3, p. 1445-59, fev. 2012.

HIPPLER, M.; RATAJCZAK, R.; HAEHNEL, W. Identification of the plastocyanin binding subunit of photosystem I. **FEBS Letters**, v. 250, n. 2, p. 280-284, jul. 1989.

HIYAMA, T. Photosystem I: structures and functions. In: Pessaraki, M. **Handbook of Photosynthesis**, Flórida: Taylor & Francis Group, 2005. p. 169-192.

HOLZWARTH, A R. *et al.* Kinetics and mechanism of electron transfer in intact photosystem II and in the isolated reaction center: pheophytin is the primary electron acceptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 18, p. 6895-900, mai. 2006.

HORTON, P.; RUBAN, A. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. **Journal of experimental botany**, v. 56, n. 411, p. 365-73, jan. 2005.

HOSHIDA, H. *et al.* Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. **Plant molecular biology**, v. 43, n. 1, p. 103-11, mai. 2000.

HURTH, C. *et al.* Enzymatic activity of immobilized yeast phosphoglycerate kinase. **Biosensors & bioelectronics**, v. 22, n. 11, p. 2449-55, 15 mai. 2007.

IVANOV, A G. *et al.* Implications of alternative electron sinks in increased resistance of PSII and PSI photochemistry to high light stress in cold-acclimated *Arabidopsis thaliana*. **Photosynthesis research**, p. 191-206, jul. 2012.

JIANG, C.-D. *et al.* Leaf orientation, photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybean leaves against high irradiance in field. **Environmental and Experimental Botany**, v. 55, n. 1-2, p. 87-96, jan. 2006.

JOHNSON, M. P. *et al.* Photoprotective energy dissipation involves the reorganization of photosystem II light-harvesting complexes in the grana membranes of spinach chloroplasts. **The Plant cell**, v. 23, n. 4, p. 1468-79, abr. 2011.

KANGASJÄRVI, S. *et al.* Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. **The Biochemical journal**, v. 412, n. 2, p. 275-85, jun. 2008.

KANGASJÄRVI, S. *et al.* Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 4, p. 1619-36, fev. 2012.

KARPINSKI, S. Systemic Signaling and Acclimation in Response to Excess Excitation Energy in *Arabidopsis*. **Science**, v. 284, n. 5414, p. 654-657, abr. 1999.

KAVITHA, K.; VENKATARAMAN, G.; PARIDA, A. An oxidative and salinity stress induced peroxisomal ascorbate peroxidase from *Avicennia marina*: molecular and functional characterization. **Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 46, n. 8-9, p. 794-804, mai. 2008.

KERN, J.; RENGER, Æ. G. Photosystem II: Structure and mechanism of the water: plastoquinone oxidoreductase. **Photosynthetic research**, v. 94 p. 183-202, jul. 2007.

KLEIN, P. *et al.* The membrane-tethered transcription factor ANAC089 serves as redox-dependent suppressor of stromal ascorbate peroxidase gene expression. **Frontiers in plant science**, v. 3, n. November, p. 247, jan. 2012.

KLIEBENSTEIN, D. J.; MONDE, R. A; LAST, R. L. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. **Plant physiology**, v. 118, n. 2, p. 637-50, out. 1998.

KOURIL, R. *et al.* Structural characterization of a complex of photosystem I and light-harvesting complex II of *Arabidopsis thaliana*. **Biochemistry**, v. 44, n. 33, ago. 2005.

KOUSSEVITZKY, S. *et al.* Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 49, p. 34197-203, dez. 2008.

KRAMER, D. M.; EVANS, J. R. The importance of energy balance in improving photosynthetic productivity. **Plant physiology**, v. 155, n. 1, p. 70-8, jan. 2011.

KRUK, J.; KARPINSKI, S. An HPLC-based method of estimation of the total redox state of plastoquinone in chloroplasts, the size of the photochemically active plastoquinone-pool and its redox state in thylakoids of *Arabidopsis*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1757, n. 12, p. 1669-75, dez. 2006.

LEE, S.-H. *et al.* Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. **Journal of plant physiology**, v. 164, n. 12, p. 1626-38, dez. 2007.

LI, Z. *et al.* Sensing and responding to excess light. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 239-60, jan. 2009.

LIU, H.; FRANKEL, L. K.; BRICKER, T. M. Functional analysis of photosystem II in a PsbO-1-deficient mutant in *Arabidopsis thaliana*. **Biochemistry**, v. 46, n. 25, p. 7607-13, jun. 2007.

LIU, K. *et al.* Superoxide, Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Radical in D1/D2/cytochrome b-559 Photosystem II Reaction Center Complex. **Photosynthesis research**, v. 81, n. 1, p. 41-7, jan. 2004.

LIU, Z.; CHANG, W. Structure of the Light-•Harvesting Complex II. In: Fromme, P. **Photosynthetic Protein Complexes – A structural approach**. Weinheim: Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co, 2008. p. 217-238.

LODEYRO, A. F. *et al.* The importance of flavodoxin for environmental stress tolerance in photosynthetic microorganisms and transgenic plants. Mechanism, evolution and biotechnological potential. **FEBS letters**, v. 586, n. 18, p. 2917-24, ago. 2012.

LOLL, B. *et al.* Thermostability and Ca²⁺ binding properties of wild type and heterologously expressed PsbO protein from cyanobacterial photosystem II. **Biochemistry**, v. 44, n. 12, p. 4691-8, mar. 2005.

MARUTA, T. *et al.* *Arabidopsis* chloroplastic ascorbate peroxidase isoenzymes play a dual role in photoprotection and gene regulation under photooxidative stress. **Plant & cell physiology**, v. 51, n. 2, p. 190-200, fev. 2010.

MCCARRICK, R.; BRITT, R. Current Models and Mechanism of Water Splitting. In: Fromme, P. **Photosynthetic Protein Complexes – A structural approach**. Weinheim: Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co, 2008. p. 107-129.

MEYER, Y. *et al.* Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. **Annual review of genetics**, v. 43, p. 335-67, jan. 2009.

MILLER, E. W.; DICKINSON, B. C.; CHANG, C. J. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 36, p. 15681-6, set. 2010.

MILLER, G. *et al.* Double Mutants Deficient in Cytosolic and Thylakoid Ascorbate Peroxidase Reveal a Complex Mode of Interaction between Reactive Oxygen Species , Plant Development , and Response to Abiotic Stresses. **Plant physiology**, v. 144, p. 1777-1785, ago. 2007.

MILLER, G.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. **Physiologia plantarum**, v. 133, n. 3, p. 481-9, jul. 2008.

MIQYASS, M.; VAN GORKOM, H. J.; YOCUM, C. F. The PSII calcium site revisited. **Photosynthesis research**, v. 92, n. 3, p. 275-87, jun. 2007.

MITTLER, R.; FENG, X.; COHEN, M. Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. **The Plant cell**, v. 10, n. 3, p. 461-73, mar. 1998.

MORITA, S. *et al.* Induction of Rice Cytosolic Ascorbate Peroxidase mRNA by Oxidative Stress; the Involvement of Hydrogen Peroxide in Oxidative Stress Signalling. **Plant and Cell Physiology**, v. 40, n. 4, p. 417-422, jan. 1999.

MUBARAKSHINA, M. M.; IVANOV, B. N. The production and scavenging of reactive oxygen species in the plastoquinone pool of chloroplast thylakoid membranes. **Physiologia plantarum**, v. 140, n. 2, p. 103-10, out. 2010.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual review of plant biology**, v. 59, p. 651-681, jan. 2008.

MURATA, N. *et al.* Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1767, n. 6, p. 414-21, jun. 2007.

MURCHIE, E. H.; NIYOGI, K. K. Manipulation of Photoprotection to Improve Plant photosynthesis. **Plant physiology**, v. 155, p. 86-92, jan. 2011.

MURGIA, I. *et al.* Arabidopsis thaliana plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 38, n. 6, p. 940-53, jun. 2004.

MYOUGA, F. *et al.* A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 20, n. 11, p. 3148-62, nov. 2008.

NAM, M. H. *et al.* Proteome analysis of the responses of Panax ginseng C. A. Meyer leaves to high light: use of electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry and expressed sequence tag data. **Proteomics**, v. 3, n. 12, p. 2351-67, dez. 2003.

NELSON, N.; YOCUM, C. F. Structure and function of photosystems I and II. **Annual review of plant biology**, v. 57, p. 521-65, jan. 2006.

NICOTRA, A B. *et al.* Plant phenotypic plasticity in a changing climate. **Trends in plant science**, v. 15, n. 12, p. 684-92, dez. 2010.

NOGUCHI, K.; YOSHIDA, K. Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. **Mitochondrion**, v. 8, n. 1, p. 87-99, jan. 2008.

ORT, D. R. When there is too much light regulate thermal dissipation of excess. **Plant physiology**, v. 125, p. 29-32, jan. 2001.

PARRY, M. A. J. Rubisco Activity: Effects of Drought Stress. **Annals of Botany**, v. 89, n. 7, p. 833-839, jun. 2002.

PAULSEN, H. INVITED REVIEW CHLOROPHYLL & -BINDING PROTEINS. **Photochemistry and photobiology**, v. 62, n. 3, p. 367-382, abr. 1995.

PEERS, G.; PRICE, N. M. Copper-containing plastocyanin used for electron transport by an oceanic diatom. **Nature**, v. 441, n. 7091, p. 341-4, maio. 2006.

PERETÓ, J. G. *et al.* Comparative biochemistry of CO₂ fixation and the evolution of autotrophy. **International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 3-10, mar. 1999.

PETERHANSEL, C.; MAURINO, V. G. Photorespiration redesigned. **Plant physiology**, v. 155, n. 1, p. 49-55, jan. 2011.

PETERHANSEL, C.; NIESSEN, M.; KEBEISH, R. M. Review Metabolic Engineering Towards the Enhancement of Photosynthesis. **Photochemistry and Photobiology**, p. 1317-1323, jan. 2008.

PHEE, B.-K. *et al.* Proteomic analysis of the response of Arabidopsis chloroplast proteins to high light stress. **Proteomics**, v. 4, n. 11, p. 3560-8, nov. 2004.

PILON, M.; RAVET, K.; TAPKEN, W. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1807, n. 8, p. 989-98, ago. 2011.

PNUELI, L. *et al.* Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (APX1)-deficient Arabidopsis plants. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 34, n. 2, p. 187-203, abr. 2003.

POPELKOVÁ, H.; YOCUM, C. F. Current status of the role of Cl(-) ion in the oxygen-evolving complex. **Photosynthesis research**, v. 93, n. 1-3, p. 111-21, jan. 2007.

PORTIS, A. R. Rubisco activase - Rubisco's catalytic chaperone. **Photosynthesis research**, v. 75, n. 1, p. 11-27, jan. 2003.

PORTIS, A. R.; PARRY, M. A. J. Discoveries in Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. **Photosynthesis research**, v. 94, n. 1, p. 121-43, out. 2007.

PRICE, G. D. *et al.* Specific reduction of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity by antisense RNA reduces CO₂ assimilation via a reduction in ribulose bisphosphate regeneration in transgenic tobacco plants. **Planta**, v. 195 p. 369-378, mai. 1995.

RAVEN, J. A. The cost of photoinhibition. **Physiologia plantarum**, v. 142, n. 1, p. 87-104, mai. 2011.

RIBEIRO, C. W. *et al.* Modulation of genes related to specific metabolic pathways in response to cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants. **Plant biology (Stuttgart, Germany)**, p. 1-12, jun. 2012.

RIZHSKY, L. *et al.* Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 32, n. 3, p. 329-42, nov. 2002.

ROOSE, J. L.; WEGENER, K. M.; PAKRASI, H. B. The extrinsic proteins of Photosystem II. **Photosynthesis research**, v. 92, n. 3, p. 369-87, jun. 2007.

ROSA, S. B. *et al.* Cytosolic APX knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. **Phytochemistry**, v. 71, n. 5-6, p. 548-58, abr. 2010.

ROUHIER, N.; JACQUOT, J.-P. Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes. **Photosynthesis research**, v. 74, n. 3, p. 259-68, jan. 2002.

RUELLAND, E.; MIGINIAC-MASLOW, M. Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? **Trends in plant science**, v. 4, n. 4, p. 136-141, abr. 1999.

SANDA, S. *et al.* Responses of the photosynthetic electron transport system to excess light energy caused by water deficit in wild watermelon. **Physiologia plantarum**, v. 142, n. 3, p. 247-64, jul. 2011.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. **Plant cell reports**, v. 26, n. 11, p. 2027-38, nov. 2007.

SHEN, J.; HENMI, T.; KAMIYA, N. Structure and function of photosystem II. In: Fromme, P. **Photosynthetic Protein Complexes – A structural approach**. Weinheim: Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co, 2008. p. 83-101.

SJÖDIN, M. *et al.* The mechanism for proton-coupled electron transfer from tyrosine in a model complex and comparisons with Y(Z) oxidation in photosystem II. **Philosophical**

transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, v. 357, n. 1426, p. 1471-9; discussion 1478-9, 1511, out. 2002.

SLESÁK, I. *et al.* The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. **Acta biochimica Polonica**, v. 54, n. 1, p. 39-50, jan. 2007.

SPREITZER, R. J.; SALVUCCI, M. E. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. **Annual review of plant biology**, v. 53, p. 449-75, jan. 2002.

STOCKHAUS, J. *et al.* Anti-sense RNA efficiently inhibits formation of the 10 kd polypeptide of photosystem II in transgenic potato plants: analysis of the role of the 10 kd protein. **The EMBO journal**, v. 9, n. 9, p. 3013-21, set. 1990.

SUSUKI, N. *et al.* Enhanced seed production under prolonged heat stress conditions in *Arabidopsis thaliana* plants deficient in cytosolic ascorbate peroxidase 2. **Journal of experimental botany**, jan. 2013.

SWEENEY, M.; MCCOUCH, S. The complex history of the domestication of rice. **Annals of botany**, v. 100, n. 5, p. 951-7, nov. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Photosynthesis: carbon reactions. In: Taiz, L. e Zeiger, E. **Plant physiology**. São Paulo: Artmed, 2009, p. 145-170.

TAKAHASHI, S.; BADGER, M. R. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. **Trends in plant science**, v. 16, n. 1, p. 53-60, jan. 2011.

TEIXEIRA, F. K. *et al.* Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. **Journal of molecular evolution**, v. 59, n. 6, p. 761-70, dez. 2004.

TEIXEIRA, F. K. *et al.* Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. **Planta**, v. 224, n. 2, p. 300-14, jul. 2006.

TIKKANEN, M. *et al.* Core protein phosphorylation facilitates the repair of photodamaged photosystem II at high light. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1777, n. 11, p. 1432-7, nov. 2008.

TYYSTJARVI, E. Photoinhibition of Photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese *cluster*. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, n. 3-4, p. 361-376, fev. 2008.

UEMATSU, K. *et al.* Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 8, p. 3001-9, mai. 2012.

UMENA, Y. *et al.* Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. **Nature**, v. 473, n. 7345, p. 55-60, 5 mai. 2011.

VANDERAUWERA, S. *et al.* Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 4, p. 1711-6, 25 jan. 2011.

VERNON, L. Spectrophotometric Determination of Chlorophylls and Pheophytins in Plant Extracts-Corrections. **Analytical Chemistry**, v. 32, n. 11, p. 1414-1414, out. 1960.

WHITNEY, S. M.; HOUTZ, R. L.; ALONSO, H. Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO₂-sequestering enzyme, Rubisco. **Plant physiology**, v. 155, n. 1, p. 27-35, jan. 2011.

YAMAGUCHI, K.; NISHIMURA, M. Reduction to below threshold levels of glycolate oxidase activities in transgenic tobacco enhances photoinhibition during irradiation. **Plant & cell physiology**, v. 41, n. 12, p. 1397-406, dez. 2000.

YAMORI, W. *et al.* The role of electron transport in determining the temperature dependence of the photosynthetic rate in spinach leaves grown at contrasting temperatures. **Plant & cell physiology**, v. 49, n. 4, p. 583-91, abr. 2008.

YI, X. *et al.* The manganese-stabilizing protein is required for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy in higher plants. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 16, p. 16170-4, abr. 2005.

YOCUM, C. The calcium and chloride requirements of the O₂ evolving complex. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, n. 3-4, p. 296-305, fev. 2008.

YOSHIMURA, K. *et al.* Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. **Plant physiology**, v. 123, n. 1, p. 223-34, mai. 2000.

YOUNG, S. Crystal structure of spinach plastocyanin. **Protein science**, v. 7, p. 2099-2105, jun. 1998.

ZANETTI, G.; MERATI, G. Interaction between photosystem I and ferredoxin. Identification by chemical cross-linking of the polypeptide which binds ferredoxin. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 169, n. 1, p. 143-6, nov. 1987.

ZENG, X.-Q. *et al.* Protective effect of supplemental anthocyanins on Arabidopsis leaves under high light. **Physiologia plantarum**, v. 138, n. 2, p. 215-25, fev. 2010.

ZHOU, Y.; LAM, H. M.; ZHANG, J. Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice. **Journal of experimental botany**, v. 58, n. 5, p. 1207-17, jan. 2007.

ZHU, C. *et al.* The temporal and species dynamics of photosynthetic acclimation in flag leaves of rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticum aestivum*) under elevated carbon dioxide. **Physiologia plantarum**, jan. 2012.

ZIGMANTAS, D. *et al.* Two-dimensional electronic spectroscopy of the B800-B820 light-harvesting complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 34, p. 12672-7, ago. 2006.

Capitulo II – Manuscrito

Cytosolic APX knockdown rice plants sustain photosynthesis by regulation of protein expression related to photochemistry, Calvin cycle and photorespiration

Fabício E. L. Carvalho^a, Carolina W. Ribeiro^b, Márcio O. Martins^a, Aurenivia Bonifacio^a, Charley C. Staats^c, Cláudia M. B. Andrade^c, João V. Cerqueira^a, Márcia Margis-Pinheiro^b and Joaquim A. G. Silveira^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^bDepartamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^cCentro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence

*Corresponding author,
e-mail: silveira@ufc.br

Received 26 October 2013;
revised 27 November 2013

doi:10.1111/ppl.12143

The biochemical mechanisms underlying the involvement of cytosolic ascorbate peroxidases (cAPXs) in photosynthesis are still unknown. In this study, rice plants doubly silenced in these genes (APX1/2) were exposed to moderate light (ML) and high light (HL) to assess the role of cAPXs in photosynthetic efficiency. APX1/2 mutants that were exposed to ML overexpressed seven and five proteins involved in photochemical activity and photorespiration, respectively. These plants also increased the pheophytin and chlorophyll levels, but the amount of five proteins that are important for Calvin cycle did not change. These responses in mutants were associated with Rubisco carboxylation rate, photosystem II (PSII) activity and potential photosynthesis, which were similar to non-transformed plants. The upregulation of photochemical proteins may be part of a compensatory mechanism for APX1/2 deficiency but apparently the finer-control for photosynthesis efficiency is dependent on Calvin cycle proteins. Conversely, under HL the mutants employed a different strategy, triggering downregulation of proteins related to photochemical activity, Calvin cycle and decreasing the levels of photosynthetic pigments. These changes were associated to strong impairment in PSII activity and Rubisco carboxylation. The upregulation of some photorespiratory proteins was maintained under that stressful condition and this response may have contributed to photoprotection in rice plants deficient in cAPXs. The data reveal that the two cAPXs are not essential for photosynthesis in rice or, alternatively, the deficient plants are able to trigger compensatory mechanisms to photosynthetic acclimation under ML and HL conditions. These mechanisms involve differential regulation in protein expression related to photochemistry, Calvin cycle and photorespiration.

Abbreviations – APX1/2, cytosolic APX double silenced rice plants; cAPX, cytosolic ascorbate peroxidases; CEF, cyclic electron flux; CSD2, Cu/Zn-SOD; ETR, actual flux of electrons from the PSII; FNR, ferredoxin NADP(H) oxidoreductase; G3PD, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GLDC, glycine decarboxylase; GO, glycolate oxidase; GS, glutamine synthetase; HL, high light; Lhcb1, chlorophyll *a/b* binding protein type 1; ML, moderate light; NPQ, non-photochemical quenching; NT, non-transformed rice plants; PGK, phosphoglycerate kinase; PSII, photosystem II; qP, photochemical quenching; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; RLS, Rubisco larger subunit; RuBP, ribulose-1,5-biphosphate.

Cytosolic APX knockdown rice plants sustain photosynthesis by regulation of protein expression related to photochemical activity, Calvin cycle and photorespiration

Fabrício E. L. Carvalho¹; Carolina W. Ribeiro²; Márcio O. Martins¹; Aurenivia Bonifacio¹; Charley C. Staats³; Cláudia M. B. Andrade³; João V. Cerqueira¹; Márcia Margis-Pinheiro²; Joaquim A. G. Silveira^{1*}

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, CE, Brasil.

²Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

³Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

Carvalho, FEL: fabricioeulalio@hotmail.com;

Ribeiro, CW: xuwerner@gmail.com;

Martins, MO: momartins@yahoo.com.br;

Bonifacio, A: bonifacio.a@live.com;

Staats, CC: staats@cbiot.ufrgs.br;

Andrade, CMB: aclau@terra.com.br;

Cerqueira, JVA: joavictorufc@gmail.com;

Margis-Pinheiro: marcia.margis@ufrgs.br;

*Corresponding author (silveira@ufc.br) Tel/Fax: 55 085-33669821/33669789

Abstract – The biochemical mechanisms underlying the involvement of cytosolic APXs in photosynthesis are still unknown. In this study, rice plants doubly silenced in these genes (APX1/2) were exposed to moderate light (ML) and high light (HL) to assess the role of cAPXs in photosynthetic efficiency. APX1/2 mutants that were exposed to ML overexpressed seven and five proteins involved in photochemical activity and photorespiration, respectively. These plants also increased the pheophytin and chlorophyll levels, but the amount of five proteins that are important for Calvin cycle did not change. These responses in mutants were associated with Rubisco carboxylation rate, PSII activity and potential photosynthesis, which were similar to non-transformed plants. The upregulation of photochemical proteins may be part of a compensatory mechanism for APX1/2 deficiency but apparently the finer-control for photosynthesis efficiency is dependent on Calvin cycle proteins. Conversely, under HL the mutants employed a different strategy, triggering downregulation of proteins related to photochemical activity, Calvin cycle and decreasing the levels of photosynthetic pigments. These changes were associated to strong impairment in PSII activity and Rubisco carboxylation. The upregulation of some photorespiratory proteins was maintained under that stressful condition and this response may have contributed to photo-protection in rice plants deficient in cAPXs. The data reveal that the two cytosolic APXs are not essential for photosynthesis in rice or, alternatively, the deficient plants are able to trigger compensatory mechanisms to photosynthetic acclimation under ML and HL conditions. These mechanisms involve differential regulation in protein expression related to photochemical, Calvin cycle and photorespiration.

Key words: hydrogen peroxide, light intensity, photochemical activity, redox metabolism, *Oryza sativa*.

Abbreviations

APX1/2, cytosolic APX double silenced rice plants; cAPX, cytosolic ascorbate peroxidases; ETR, actual flux of electrons from the PSII; FNR, ferredoxin NADP(H) oxireductase ; Fv/Fm, maximum quantum yield of PSII; G3PD, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GLDC, glycine decarboxylase; GO, glycolate oxidase ; GS, glutamine synthetase; gs, stomatal conductance; Jmax, electron transport rate directed to RuBP regeneration; Lhcb1, chlorophyll a/b binding protein type 1; NPQ, non-photochemical quenching; NT, non-transformed rice plants; OEC, oxygen evolution complex; PGK, phosphoglycerate kinase; PNmax (CO₂), maximum photosynthesis from PN-Ci curve; PNmax (light), maximum photosynthesis from PN-PPFD curve; PQ, plastoquinone; PRK, phosphoribulokinase; qP, photochemical quenching; RuBP, ribulose-1,5-biphosphate; Vcmax, maximum carboxylation rate of rubisco; $\Delta F/F_m'$, actual quantum yield of PSII.

Introduction

Excess light is a serious problem for crop productivity, particularly in tropical regions in which it is frequently associated with other abiotic stresses, such as heat and drought, greatly potentiating the harmful effects on crop productivity (Mittler 2006). High irradiance is capable of causing strong effects on PSII, inducing photodamage, singlet oxygen formation and photoinhibition (Krieger-Liszkay et al. 2008). Plants use several synchronized protective mechanisms to avoid photosystem II (PSII) inactivation and photoinhibition due to high light (HL) stress (Takahashi and Badger 2011). The main mechanisms that contribute to photoinhibition include the restriction of electron transport from water via the disruption of the oxygen-evolving complex (OEC), the inhibition of D1 protein synthesis by reactive oxygen species (ROS) and alterations in the plastoquinone (PQ) redox state (for a review, see Takahashi and Badger 2011).

PSII is a major photosynthetic target of HL-induced photodamage. Photosynthetic efficiency requires a coordinated balance between Calvin cycle reactions and electron flow in the photosynthetic electron transport (PET) chain. Imbalances between these processes might induce ROS accumulation in chloroplasts, aggravating photodamage and photo-oxidative stress (Goh et al. 2012). The typical enzymes involved in the maintenance of chloroplast- H_2O_2 homeostasis are thylakoid and stromal APX isoforms, yet several recent lines of experimental evidence have suggested that cytosolic APX is most important for maintaining adequate chloroplastic H_2O_2 levels for signaling, oxidative protection and photosynthetic activity (Miller et al. 2007). Furthermore, some authors (Miller et al. 2007, Maruta et al. 2010) have questioned whether chloroplast APXs has an effective role as H_2O_2 scavengers.

Hydrogen peroxide is a powerful signaling molecule for several important biological processes in plants, including abiotic and biotic defense responses (Slesak et al. 2007). A deficiency in cytosolic APXs results in increased H_2O_2 concentrations in virtually all plant cell compartments, particularly in the chloroplasts and cytosol (Davletova et al. 2005). Some studies with cytosolic APX1-deficient (APX1-KO) *Arabidopsis* exposed to high light have shown that photosynthesis is strongly suppressed and that the oxidation of chloroplast proteins is increased in parallel with H_2O_2 accumulation (Davletova et al. 2005, Koussevitzky et al. 2008). Unfortunately, most of the reported works involving cytosolic APX-deficient mutants have utilized simplified approaches to examine photosynthesis. Accordingly, biochemical studies involving a coordination of photochemical and CO_2 assimilation phases are needed to understand the physiological role of cytosolic APXs and H_2O_2 in photosynthesis.

The plant response to environmental factors involves changes in several metabolic and gene networks, such as the antioxidant defense pathways, which are associated to phenotypic plasticity (Miller et al. 2007; Nicotra et al. 2010). Several studies utilizing transcriptomic and proteomic approaches have demonstrated that mutants deficient in, lacking or over-expressing cytosolic APXs

exhibit strong changes in the expression of several other genes and/or proteins that are not functionally associated with redox metabolism (Rizhsky et al. 2002, Miller et al. 2007, Vanderauwera et al. 2011, Ribeiro et al. 2012). The molecular and genetic mechanisms that control such alterations and their metabolic and physiological consequences in APX mutants are unknown (Suzuki et al. 2013). Therefore, it seems uncertain whether all the responses displayed by mutant plants are due to cytosolic APX deficiency and increased H₂O₂ or to other uncontrolled metabolic factors.

The protective role of cytosolic APX1 in the chloroplasts and its involvement in photosynthesis, which have been demonstrated in *Arabidopsis* plants (Pnueli et al. 2003, Davletova et al. 2005), has not been confirmed in rice silenced for both cytosolic APXs (Bonifacio et al. 2011). The evaluation of the expression of key proteins involved in photosystems and the Calvin cycle in cytosolic APX deficiency is necessary to elucidate the role of cytosolic APX in photosynthesis. Furthermore, recent contradictory results in *Arabidopsis* involving single and double APX KOs have reinforced the supposition that the classical antioxidant defense system might not be sufficient to explain metabolic processes involving wide metabolic networks (Suzuki et al. 2013). Indeed, the inactivation of a specific reaction by APX and CAT gene knockout might activate unknown compensatory reactions (Rizhsky et al. 2002, Vanderauwera et al. 2011) that, paradoxically, can induce a more effective acclimation to oxidative stress.

Previously was demonstrated that rice deficient in both cytosolic APX isoforms (APX1/2) exhibits strong alterations in redox homeostasis (Rosa et al. 2010), in proteomic and transcript profiles (Ribeiro et al. 2012) and an effective compensatory mechanism represented by the overexpression of other peroxidases (Bonifacio et al. 2011). These results and others (Rizhsky et al. 2002, Miller et al. 2007, Suzuki et al. 2013) suggest that plants have developed extensive ROS gene network plasticity. Previously was proposed that cytosolic APX deficiency in rice plants induces increases H₂O₂ that, in turn, could trigger important changes in the modulation of several genes and proteins. Considering that increased H₂O₂ concentrations can trigger several changes in chloroplast gene expression, it is plausible to argue that changes in expression of important photosynthesis-related proteins in APX1/2 mutants could compensate for cytosolic APX deficiency in terms of sustaining of the photosynthesis.

In this study was tested the hypothesis that cytosolic APX knockdown in rice is able to trigger distinct compensatory mechanisms involving expression of proteins related to photochemical, Calvin cycle and photorespiration. Our results were unexpected, since the rice plants deficient in both cytosolic APXs exhibited photosynthetic efficiency similar to untransformed plants as in normal growth condition as well as under high light. The obtained data suggest that rice APX 1/2 mutants are able to sustain normal photosynthesis under moderate light by over-regulation of important photochemical proteins and increase in the photosynthetic pigment levels. In high light, mutants utilize an opposite strategy, triggering down-regulation of photochemical proteins and decreasing photosynthetic pigments in order to avoid excess energy. Notably, under HL conditions mutants stimulate overexpression and stimulate the activity of some important enzymes involved with

photorespiration. The involvement of proteins related to photochemical, Calvin cycle and photorespiration in compensation for cytosolic APX deficiency under moderate and high light is discussed.

Materials and Methods

Construct of plant vectors, plant transformation and plant growth conditions

Non-transformed and transgenic rice (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) plants, knockdown for *Osapx1* (LOC_Os03g17690) and *Osapx2* (LOC_Os07g49400) genes, were obtained as previously described by Rosa *et al.* (2010). The line APX1/2-5, at the F3 generation, was used in the present study as a representative mutant of the double-silenced lines of APX1/2. These plants have exhibited a similar response in terms of APX1/2 transcript amounts and activity in the F1, F2 and F3 generations (Bonifacio *et al.* 2011). Rice seeds from non-transformed (NT) and transgenic lines at the F3 generation were germinated in Germitest[®] paper under controlled conditions (25 °C mean temperature, 80% relative humidity, 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetic photons flux density, PPFD, and 12-h photoperiod). Eight days after germination, the rice seedlings were transferred to plastic 3-L pots filled with ½ strength Hoagland-Arnon's nutritive solution (Hoagland and Arnon 1950). The pH was adjusted to 6.0±0.5 every two days, and the nutrient solution was completely changed weekly. The seedlings were previously grown for 30 days in a greenhouse under natural conditions and with the following conditions: day/night mean temperature of 29 °C/24 °C, mean relative humidity of 68%, and a photoperiod of 12 h. The light intensity inside the greenhouse varied as a typical day from 6:00h a.m. to 6:00h p.m., reaching an average of 820 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of maximum PPFD at noon.

Light intensity treatments

Two groups (APX1/2 mutants and non-transformed plants) with 38-day-old were transferred to a growth chamber with controlled conditions (27 °C±3/24 °C ±1 (day/night), 65%±5 humidity, PPFD of 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 12-h photoperiod). The plants were acclimated to these conditions for 48 h. For the high light (HL) treatment, a group of plants were exposed to a continuous radiation of 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD for 24 h. The light was achieved by a combination of a set of sodium high-pressure 400W lamps (OSRAM PLANTASTAR®, Germany) and fluorescent 60W lamps (Phillips®, USA). For the moderate light treatment (ML), the plants were kept in the same growth chamber conditions under light of 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD and 12h photoperiod. This ML-treatment was used as control or normal growth condition.

Determination of photosynthetic efficiency, chlorophyll *a* fluorescence and photosynthetic pigments

The CO₂ assimilation rate (A) and stomatal conductance (g_s) were measured in fully expanded leaves from both non-transformed and cytosolic APX knockdown rice plants with a portable infrared gas analyzer system, equipped with a LED source and a leaf chamber (IRGA LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, USA). The internal parameters in the IRGA chamber during gas exchange measurements were: 1000 μmol m⁻² s⁻¹ PPFD, 1.0±0.2 kPa VPD, 38 Pa CO₂ and temperature 28 °C. The A was measured in response to changes in PPFD and intercellular CO₂ partial pressure (C_i). Each one of these conditions was separately controlled inside the IRGA leaf chamber. The A-PPFD and A-C_i fitting curves were determined according to models proposed by Lieth and Reynolds (1987) and Sharkey et al. (2007), respectively. The following parameters associated with photosynthetic efficiency were determined: Maximum Rubisco carboxylation rate (V_{cmax}), maximum rate of photosynthetic electron transport (J_{max}) and CO₂ quantum efficiency. The potential photosynthesis (A_{pot}) was determined under saturating conditions of light (1000 μmol m⁻² s⁻¹ PPFD) and CO₂ (600 μmol mol⁻¹).

In vivo chlorophyll *a* fluorescence was measured using a LI-6400-40 Fluorometer (LI-COR, Lincoln, USA) coupled with the IRGA equipment. The actinic light utilized to measurement of both gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence was 1000 PPFD. The fluorescence parameters were measured by the saturation pulse method (Schreiber et al. 1994) in leaves exposed to light and 30 min-dark-adapted conditions. The intensity and duration of the saturation light pulse were 8000 μmol m⁻² s⁻¹ and 0.7 seconds, respectively. The amount of blue light was set up to 10% of the PPFD to maximize stomatal aperture (Flexas et al. 2007). The following parameters were assessed: Maximum quantum yield of PSII [F_v/F_m = (F_m-F_o)/F_m] was measured in 30 min-dark-adapted conditions, the effective quantum yield of PSII [ΔF/F_m' = (F_m'- F_s)/F_m'] was measured in leaves exposed to actinic light of 1000 μmol m⁻² s⁻¹ PPFD. The photochemical quenching coefficient was calculated by [qP = (F_m'- F_s)/(F_m'-F_o')], the non-photochemical quenching coefficient was calculated by [NPQ = (F_m-F_m')/F_m'] and the actual flux of electrons from the PSII was calculated by [ETR = (ΔF/F_m' x PPFD x 0.5 x 0.84)]. To evaluate the ETR, 0.5 was used as the fraction of excitation energy distributed to PSII, and 0.84 was used as the fraction of incoming light absorbed by the leaves. The F_m and F_o parameters correspond to maximum and minimum fluorescence of dark-adapted leaves, respectively; F_m' and F_s are the maximum and steady state fluorescence in the light-adapted leaves, respectively, and F_o' is the minimum fluorescence after the far-red illumination of the previously light-exposed leaves (Genty et al. 1989, Schreiber et al. 1994, Flexas et al. 2007). A same fully expanded leaf was utilized for both photochemical and gas exchange measurements. Leaf chlorophylls and carotenoid contents were determined after extraction in ethanol and were measured spectrophotometrically at 665 and 649 nm. The content of pigments was calculated using the equations proposed by Lichtenthaler and Wellburn (1983). Anthocyanin content was measured as described by Gitelson et al. (2001), after extraction in 0.1% methanol-HCl and the pigment content was calculated using the absorption coefficient of 30 mM⁻¹ cm⁻¹. The pheophytin content was determined according the Vernon (1966) method.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Real-time PCR experiments were carried out using cDNA synthesized from total RNA purified with Trizol (Invitrogen®) as previously described (Rosa et al. 2010). Primer pairs to amplify the *Osfdh3* gene (LOC_Os02g57040), the rice 40S ribosomal protein S27a gene (LOC_Os01_g22490) and the *Osfal* gene (LOC_Os03g08020) were used as internal controls to normalize the amount of mRNA present in each sample. All qRT-PCR reactions were performed with an Applied Biosystems StepOne plus Real-Time PCR system (Foster City, CA, USA) using SYBR-green intercalating dye fluorescence detection.

Leaf total soluble extract

The total soluble extract was obtained from fresh leaf samples that were ground to a fine powder in liquid N₂ with a mortar and pestle and extracted with ice-cold 100 mM K-phosphate buffer, pH 6.8, containing 0.1 mM EDTA and 2 mM ascorbic acid. The protein content was measured by the Bradford (1976) method using bovine serum albumin as the standard.

Western blotting

The total soluble extract was utilized for immunoblotting of APX 1 and APX 2 isoforms. The SDS-PAGE electrophoresis was performed with equal amounts of protein (20 µg) per lane. The denatured proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (Towbin et al. 1979), and polypeptide detection was performed using specific polyclonal antibodies against the two cytosolic APX proteins (Agrisera Co., Sweden) according to the manufacturer's instructions.

Enzymatic activity assays

The activities of APX (EC 1.11.1.1), SOD (EC 1.15.1.1), CAT (EC 1.11.1.6), glycolate oxidase (GO; EC 1.1.3.15) and glutamine synthetase 2 (GS; EC 6.3.1.2) were assayed in the total soluble extract. The activities of SOD isoforms in native PAGE gel were determined in total soluble fraction after inhibition with specific inhibitors, KCN and H₂O₂. APX activity was assayed following ascorbate oxidation by a decrease in absorbance at 290 nm (Amako et al. 1994), with minor modifications. The enzyme activity was measured by the linear decrease in absorbance at 290 nm, over a 120 s time interval at 25 °C. To avoid an interference of type III peroxidase activity, two parallel determinations were performed: (A) in the absence and (B) in the presence of pCMB, a specific APX inhibitor (Amako et al. 1994). The APX activity was calculated by the difference between A – B and was expressed as µmol AsA mg protein⁻¹ min⁻¹. CAT activity was measured following the oxidation of H₂O₂ at 240 nm over a 300 s interval at 25 °C in the presence of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 20 mM H₂O₂ (Havir and McHale 1987). CAT activity

was calculated according to the molar extinction coefficient of H_2O_2 ($36 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) and expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$. SOD activity was determined by the inhibition of blue formazan production via NBT photoreduction. The reaction was started with illumination (30-W fluorescent lamp) at 25°C for 6 min, and the absorbance was measured at 540 nm (Giannopolitis and Ries 1977). One SOD activity unit (UA) was defined as the amount of enzyme required to inhibit 50% of NBT photoreduction, and the activity was expressed as $\text{UA mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Beauchamp and Fridovich 1971). The determination and identification of SOD isoform activities in native PAGE gels was performed according (Beauchamp and Fridovich 1971). Identification of the SOD isoforms was performed by differential inhibition method utilizing H_2O_2 and KCN as inhibitors. The isoforms Cu/Zn-SOD and Fe-SOD are inhibited by 5 mM H_2O_2 ; Fe-SOD isoform is resistant to inhibition by 2 mM KCN and Mn-SOD isoform is resistant to both H_2O_2 and KCN inhibitors. GO activity was assayed by the formation of the glyoxylate-phenylhydrazine complex at 324 nm (Baker and Tolbert 1966). Enzyme activity was calculated using the molar extinction coefficient of the glyoxylate-phenylhydrazine complex ($17 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) and expressed as $\text{nmol Glyoxylate}^{-1} \text{ mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Chloroplastic GS (EC 6.3.1.2) activity was assayed according to described by Lutts et al. (1999). This measurement is based on the inhibition of chloroplastic GS2 activity with 1 mM glycosamine-6-phosphate inhibitor. GS2 activity was calculated by difference between total GS activity and GS1 activity after GS2 inhibition. Total GS activity was determined by the hydroxamate biosynthetic method. GS2 activity was expressed as $\text{nmol GGH mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Rubisco activity was measured spectrophotometrically via the rate of NADH oxidation at 340 nm (Reid et al. 1997). The assay medium consisted of 100 mM bicine (pH 8.0), 25 mM KHCO_3 , 20 mM MgCl_2 , 3.5 mM ATP, 5 mM phosphocreatine, 80 nkat G3PD, 80 nkat 3-phosphoglyceric phosphokinase, 80 nkat creatine phosphokinase and 0.25 mM NADH. For the determination of the initial Rubisco activity, the extract was added to 900 μL of assay mixture, and the reaction was initiated with the addition of 0.5 mM RuBP. Initial Rubisco activity was expressed as $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$.

Proteomic analysis

The protein extraction for 2-DE analysis and isoelectric focusing and second dimension electrophoresis were performed as previously described by Ribeiro et al. (2012). The relative abundance was defined as the ratio between the volume of each spot and the volume obtained in a reference spot (NT control). The amount of each protein was obtained from the average of three gels independent. The criterion to selection of the spots was based in a previous study (Ribeiro et al., 2012). All proteins related to photosynthesis (photochemical and Calvin cycle) and photorespiration processes were selected. The selected spots from 2-DE gels were subjected to statistical analysis from three independent replicates, each replicate represented by an individual plant, according description below. The processing of spots and mass spectrometry analysis was similar to that detailed by Pinto et al. (2009).

Statistical analysis

The experiments were conducted in a 2 X 2 factorial design with 2 genotypes X 2 light regimes. An individual pot containing three plants represented each statistical replicate. All measurements (*in vivo* photosynthesis, biochemical, proteomics and RT-PCR) were performed with at least three replicates from independent pots. The data were analyzed by ANOVA and the means were compared by Tukey's test ($p < 0.05$).

Results

Characterization of the *Osapx1* and *Osapx2* gene expression and APX activity in APX1/2 mutants and NT plants exposed to ML and HL conditions

Rice mutants with double silencing for cytosolic APXs (APX1/2) did not exhibit obvious changes in their phenotype, as indicated by normal growth, morphology and development. The RT-PCR and western blotting results confirmed that an almost complete silencing of both *Osapx1* and *Osapx2* genes occurred in the APX1/2 mutants. These results are reinforced by leaf APX activity in total soluble fraction, which decreased 60% in comparison to NT plants. HL did not change the APX 1 and APX 2 expression (transcript and protein levels) and APX activity in mutants. Conversely, in NT plants, HL induced a prominent increase in the protein amounts of both APX1 and APX2 and greatly stimulated APX activity. These results were not correlated to the cytosolic APX steady-state transcript levels measured by RT-PCR (Fig. S1 – supporting information). The APX1 and APX2 protein amounts measured by western blotting were closely correlated to the respective protein spot intensities calculated from 2-DE profile (Fig. S2, Tab. S1).

Knockdown of cytosolic APXs differently affected the expression of photochemical- and Calvin cycle-related proteins, while HL stress induced their down-regulation

The double silencing of cytosolic APXs and high light triggered prominent changes in the protein expression, especially in photosynthesis related-proteins. Sixteen from a total of 52 characterized proteins were chosen in this study with basis in their importance for photosynthesis and photorespiration processes. APX1/2 mutants grown under ML exhibited upregulation of important photochemical-related proteins and had the content of some photosynthetic pigments increased compared with NT plants. The pheophytin content in silenced mutants under ML was enhanced but it decreased significantly in response to HL while in NT plants it did not change (Fig. 1A). The amount of Lhcb1 protein also was significantly higher in silenced plants under ML but HL induced strong

decrease in the content of this protein in both mutant and NT plants (Fig. 1B). PSII extrinsic proteins PsbO (33 kDa), PsbP (23 kDa) and PsbR (10 kDa) were also increased in APX 1/2 under ML (particularly PsbR), but HL induced a strong down-regulation in the expression of these proteins in both silenced and NT plants (Fig. 2A-C). Plastocyanin, ferredoxin 1 and ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase (FNR) exhibited expression patterns in mutants that were similar to those exhibited by PSII proteins under both light conditions (Fig. 2D-E). The levels of Rubisco activase and Rubisco larger subunit (RLS) were similar in both plants under ML conditions, and decreased in both APX1/2 and NT under HL stress. Rubisco activity showed a similar trend to that noticed for RLS levels in both mutants and NT plants under ML, but its activity did not change under HL (Fig. 3A-C). The trend exhibited by RLS revealed by immunoblotting was similar to the results noticed for proteomic analysis (data not shown). Glyceraldehyde-3P-dehydrogenase (G3PD) was upregulated in mutants under both light conditions (Fig. 3D). The expression of sedoheptulose-1,7-biphosphatase and phosphoribulokinase (ribulose-5-phosphohatekinase) was similar in both plant types under ML and they were similarly down-regulated by HL (Fig. 3D-C). In summary, photochemical-related proteins were up regulated in APX1/2 under ML (control) compared with NT and they were strongly down regulated by HL in both genotypes. Conversely, the Calvin cycle proteins were not up regulated in mutants under ML but the levels of these proteins were similarly down regulated by HL in both plants types.

APX1/2 mutants up-regulated and stimulated activity of some photorespiration-related proteins under HL stress

The contents of the photorespiration-related proteins phosphoglycerate kinase (PGK), glycine decarboxylase (GLDC) and chloroplastic-glutamine synthetase (GS), showed similar patterns among silenced and NT plants under both ML and HL: the proteins were up-regulated in mutants in comparison to NT plants. High light induced significant decrease in the levels of GLDC in NT plants but did not change in silenced mutants. Chloroplastic GS was upregulated in silenced plants and did not change in NT plants under HL compared with normal growth condition (Fig. 4A-C). GS2 activity (chloroplast isoform) was strongly stimulated in mutants under and remained unalterable under HL, whereas it was greatly stimulated in NT plants under HL compared with ML (Fig. 5A). Glycolate oxidase (GO) activity was higher in mutants compared to NT plants under ML but it was inhibited under HL in both genotypes and its activity remained higher in mutants under this condition (Fig. 5B). The CAT A transcript level (Fig. 5C) and total CAT activity (Fig. 5D) were increased in silenced mutants under ML compared with the NT plants. In HL, the CAT A transcript amount was strongly increased in mutants compared with NT plants and CAT activity was slightly increased in NT plants but maintained unaltered in silenced mutants compared to the ML conditions. The content of chloroplast Cu/Zn-SOD (CSD2) protein was strongly upregulated in silenced mutants under ML compared to NT plants (Fig. 6A). Conversely, HL induced a prominent upregulation of Cu/Zn-SOD

only in NT plants, whereas the silenced mutants showed unaltered levels under HL compared with ML (Fig. 6A). The total soluble SOD activity (Fig. 6B) was induced in APX1/2 under ML compared with the NT plants. HL induced a significant decrease in SOD activity only in mutant plants. The activity in gel of the Cu/Zn-SOD isoform (Fig. S4) was closely correlated to proteomic data, indicating that activity of this isoform was associated with expression of the chloroplastic isoform. Anthocyanin showed a contrasting response between APX1/2 and NT plants under the two light intensities. Mutants exhibited higher content under ML, which was decreased by HL stress while NT plants exhibited an opposite response (Table 1). In summary, the APX1/2 silenced mutants displayed over-regulation of important proteins under both light intensities but these acclimation changes were important remarkably in response to high light.

***In vivo* photochemical and gas exchange parameters were not altered by silencing and similarly decreased by effect of HL in both APX 1/2 and NT plants**

Silenced mutants showed higher total chlorophyll content compared to NT plants under ML, but HL caused a significant decrease in the content of these pigments only in mutants (Table 1). The chlorophyll a/b ratios were higher in mutants in both light intensities in comparison with NT plants. HL caused different effects on the chlorophyll a/b ratios in the studied plants, that is, reduction in NT plants and increase in mutants, compared with ML. The double-silenced mutants showed lower carotenoid content under both light regimes compared with NT plants (Table 1). HL caused drastic and similar alterations in the PSII activity in both silenced and NT plants in comparison with ML. HL stress caused a strong and similar decrease (49%) in the maximum quantum yield (F_v/F_m), in both silenced and NT plants. That decrease reached 0.36 units, indicating that HL stress induced photoinhibition in both studied plants. HL also induced a large decrease (60%) in the actual quantum yield ($\Delta F/F_m'$). Photochemical quenching (qP), similar to $\Delta F/F_m'$, decreased significantly and similarly in both rice genotypes in response to HL stress. Non-photochemistry quenching (NPQ) was similar in the silenced and NT plants under ML conditions; however, HL caused a significant increase on this parameter (100%), which was slightly higher in silenced mutants. Under ML, both genotypes showed similar PSII activity parameters (Table 2).

The photosynthesis versus light intensity curves (ranging from zero to 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of PPFD) evidenced that NT and mutants showed similar response to increases in the PPFD levels, as under ML as well as in HL (Fig. S5). The photosynthetic parameters obtained from these curves were effectively similar in the two studied plants such as CO_2 quantum efficiency coefficient (CO_2 assimilate per quantum energy) – (Table 2) and light compensation point (data not shown). The curves of photosynthesis versus intercellular CO_2 concentrations ($A - C_i$), ranging from zero to 140 Pa, showed similar responses between the two studied plants for each light intensity (Fig. S6). The photosynthesis potential (A_{pot}), determined under saturating conditions of light and CO_2 , also was

similar in mutant and NT plants in both light regimes (Table 2). Similarly, V_{cmax} – a parameter associated to Rubisco activity, was similar in the silenced mutants and NT plants under ML and HL and high light induced a prominent decrease in this parameter in both plants. J_{max} – a parameter associated to electron transport to Rubisco regeneration, showed a trend similar to that noticed for V_{cmax} in both studied plants under both ML and HL. Stomatal conductance (g_s) changed similarly between the studied plants under both light intensities but HL caused a strong decrease of 73% in both plants (Table 2). Altogether, the results indicate that expression of photochemical related-proteins, especially under normal growth conditions, was not closely correlated to *in vivo* PSII activity. In opposition, the expression of Calvin cycle-related proteins and Rubisco activity were well correlated to gas exchange parameters in mutants and NT plants mainly under normal growth conditions.

Discussion

The data obtained in this study are unexpected as they differ greatly of those reported for Arabidopsis plants (Pnueli et al., 2003; Davletova et al., 2005), which reinforce previous work that have evidenced that cytosolic APXs are not essential to photosynthesis in rice (Bonifacio et al., 2011). In addition, our results strongly demonstrate that rice plants silenced in both APX1 and APX2 display different photosynthetic acclimation mechanisms to cope with moderate and high light. Possibly, these mechanisms are part of an overall metabolic strategy to compensation for deficiency of those two important enzymes involved in redox homeostasis. Under moderate light, the mutants triggered upregulation of essential proteins related to photochemical activity and photorespiration but not changed Calvin cycle related-proteins. The mutants also displayed increased levels of pheophytin and chlorophylls *a* and *b* compared to NT plants. Interestingly, APX1/2 plants exhibited similar *in vivo* PSII activity and photosynthetic CO₂ assimilation efficiency compared to NT plants, evidencing that the silencing could have triggered a compensatory mechanism for deficiency in APX1/2. Remarkably, silenced plants displayed an opposite strategy to cope with high light intensity. Fundamentally, this strategy was established from strong down-regulation and/or degradation of photochemical-related proteins, photosynthetic pigments, Calvin cycle related-proteins and enhancement or maintaining of the level and/or activity of photorespiration related-proteins.

The data in the literature concerning the role of cAPXs in photosynthesis are insufficient, as they are based in incomplete characterization of photosynthetic efficiency. Moreover, the few published studies are concentrated on mutants in model plants such as Arabidopsis APX1-KO (Pnueli et al. 2003) and tobacco APX1-KO (Rizhsky et al. 2002). In both these studies, the mutants exhibited impairment in CO₂ assimilation under normal growth conditions. However, comprehensive studies concerning the PSII activity are lacking and, therefore, the relationships between cAPX activity and photosynthesis are poorly understood. A lack of APX1 in Arabidopsis induces H₂O₂ accumulation,

oxidative damage and impairment in photosynthetic CO₂ assimilation, suggesting that activity of that enzyme is important for photosynthesis (Davletova et al. 2005), although the mechanisms are unknown. In this current study we performed, by the first time, a complete characterization of the photosynthesis in genetic mutants deficient in both cytosolic APXs.

Under moderate light, the APX1/2 mutants exhibited a prominent increase in the expression of Lhcb1, which is critical for light harvesting in PSII. These results suggest that Lhcb1 protein might be part of a compensatory mechanism to enhancement of light capture and photosynthesis. Conversely, the prominent decreases in the protein amount under HL suggest that low levels of Lhcb1 could contribute to photo-protection as reported by de Bianchi et al. (2011). Other important photochemical proteins such as OEC-extrinsic proteins, plastocyanin, ferredoxin 1, FNR and photosynthetic pigments exhibited response similar to that noticed for Lhcb1. Interestingly, the expression of Calvin cycle related-proteins was not altered in rice mutants, suggesting that photochemical proteins could be more important to a compensatory mechanism for APX deficiency. The *in vivo* measurements of PSII activity and CO₂ assimilation efficiency have evidenced that deficiency in both APXs is not essential to photosynthesis in rice plants (Bonifacio et al., 2011). Thus, if a compensatory mechanism indeed occurred in silenced mutants, it is enough effective to these plants display a phenotype similar to NT. However, it should not be ruled out the possibility that cAPXs are not involved in photosynthesis and, thus, the overexpression of photochemical related-proteins in mutants was rather a casual effect.

Plastocyanin, ferredoxin 1 and FNR proteins are crucial to photosynthetic activity because they are involved in photosynthetic electron transport (Benz et al. 2010). In normal growth conditions ferredoxin 1 is essential for photochemical efficiency and under HL it contribute to dissipate excess energy by cyclic electron flux (CEF), contributing to restrict photoinhibition (Blanco et al. 2013). Moreover, CEF is involved in alternative proton gradient formation (a mechanism of excess energy dissipation through heat) in PSI, resulting in increased qE (energy quenching) and ATP synthesis (Blanco et al. 2013). The FNR protein expression in mutants under ML conditions was similar to that noticed for other photochemical proteins. This protein accomplish an important link between the electron transfer from PSI to NADP⁺ and it can also act as a donor to important alternative sinks, such as photorespiration and Halliwell-Foyer cycle, especially under HL stress, when the CO₂ assimilation is drastically affected (Benz et al. 2010).

Although the mutants had over-regulated important proteins related to photochemical reactions under ML this response did not improve the *in vivo* PSII activity. This apparent discrepancy between higher protein expression and similar *in vivo* PSII activity could indicate that other photochemical proteins not evaluated here could exert a fine-tuning on the *in vivo* activity. Moreover, the activity of Calvin cycle proteins could induce limitation on photochemical activity, as that cycle is the main photosynthetic sink for the photochemical products, ATP and NADPH (Yamori et al. 2008, Joliot and Johnson 2011). Several reports have evidenced that the Calvin cycle reactions, especially the Rubisco carboxylation and RuBP regeneration rates, are crucial to PSII activity (Yamori et al.

2008). On the other hand, the data obtained here show a close correlation between *in vivo* Rubisco activity (V_{cmax}), photosynthesis and amounts of Calvin cycle related-proteins. These data reinforce that reactions of this cycle are more limiting than the photochemistry reactions to *in vivo* photosynthesis in mutants.

Rice mutants displayed an opposite strategy to cope with high light in comparison with that previously noticed for moderate light. HL induced strong down-regulation of proteins related to photochemical activity, Calvin cycle, which was associated with intense decrease in the levels of photosynthetic pigments. This strategy is typically related to reduction in the capacity for light harvesting and thus, contributing to photo-protection (Takahashi and Badger 2011). Most importantly, these plants exhibited enhanced levels and/or activity of some important proteins involved in photorespiration. That strategy is typically related to reduced capacity for light harvesting, excess energy dissipation in photosystems and photo-protection. Photorespiration is an essential process involved in photo-protection of C3 plants subjected to high light stress (Takahashi and Badger 2011). In this current study the mutants displayed high activities of CAT, GO and GS2, high levels of CAT A transcripts and high amount of the GS2, GLDC and PGK proteins under HL. These results suggest that high expression of these proteins could be important to photo-protection but as was argued previously, the possibility of the expression of these proteins is not correlated with the photorespiratory activity should not be ruled out. Indeed, photorespiration is a complex process and methodologies for its quantification are fragile and debated (Busch 2013).

The photosynthetic efficiency data obtained in this study demonstrate clearly that the deficiency of both cytosolic APXs is apparently not important to photosynthesis in rice plants exposed to normal growth condition and high light, as observed previously (Bonifacio et al., 2011). These results reinforce that the silenced mutants displayed deep changes in metabolic pathways and gene expression as previously reported to plants grown under low light conditions (Ribeiro et al., 2012). These data are very intriguing because cytosolic APXs are involved in the control of the H_2O_2 levels in other cellular compartments, particularly in chloroplasts (Davletova et al., 2005) and also because this ROS is crucial to signaling of important events in chloroplasts including photosynthesis (Foyer and Noctor 2009). As the activities of PSII and Calvin cycle were essentially similar in silenced mutants and NT plants exposed to normal growth condition and high light stress, we can argue that, if indeed the cytosolic APXs are involved in photosynthesis, a compensatory mechanism should have been displayed. Actually, our data support this hypothesis, evidencing that a lack or deficiency in the cytosolic APXs can alter the expression of several genes not directly linked to activity of these enzymes.

These observations mentioned above lead to two important points, which should be highlighted here: (1) the importance of the cytosolic APXs to photosynthesis and/or the ability to trigger an effective compensatory mechanism by modulation in the protein expression could be species-dependent and (2) Despite the cytosolic APXs silencing have repressed almost fully the

expression of APX1 and APX2 genes in the rice mutants, these plants displayed deep changes in the protein expression profile. Thus, our data suggest caution before elaborating a conclusion from the obtained experimental data, as in this current study as well as in others utilizing genetic mutants because these plants can display modifications in the expression of other genes. Indeed, recently Liu et al., (2013) reported unexpected and intriguing results with *Arabidopsis* knockout mutants in ferredoxin 2, a protein crucial to photosynthetic electron transport. When the mutants were exposed to high light for an extended period, they exhibited better photosynthetic acclimation than wild type plants. Several other published studies with genetic mutants also have showed complex and unexpected results. Unfortunately, these results have not been adequately discussed particularly in physiological terms.

In conclusion, the data obtained in this study reveal that deficiency in both cytosolic APXs under normal growth conditions triggers complex responses associated to overexpression of photochemical related-proteins and enhancement in the levels of photosynthetic pigments, which together could be involved in a compensatory mechanism for APX deficiency. However, despite these changes the *in vivo* activity of PSII did not improve. We suggest that these metabolic changes might have contributed, to some extent, to generate an APX1/2 phenotype similar to non-transformed plants. In high light, the rice mutants also exhibited intriguing metabolic responses, which could be associated with the maintaining of photosynthesis similar to NT plants. It is suggested that the up-regulation of some photorespiratory-related proteins could have contributed to a compensatory mechanism for excess energy dissipation. However, further studies are need for a complete elucidation of the intricate mechanisms involving cytosolic APXs, H₂O₂ signaling and photosynthesis. Understanding these relationships is crucial to improve plant productivity, especially under adverse conditions.

Acknowledgements

We thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) for financial support.

References

Amako K, Chen GX, Asada K (1994) Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant cell physiol* 35, 497–504

- Baker AL, Tolbert NE (1966) Glycolate oxidase (ferredoxin containing form). *Methods enzymol* 9, 339–340
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase, improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytic biochem* 287, 276–287
- Benz JP, Lintala M, Soll J, Mulo P, Bölder B (2010) A new concept for ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase binding to plant thylakoids. *Trends plant sci* 15, 608–613
- Blanco NE, Ceccoli RD, Vía MVD, Voss I, Segretin ME, Bravo-Almonacid FF, Melzer M, Hajirezaei M-R, Scheibe R, Hanke GT (2013) Expression of the Minor Isoform Pea Ferredoxin in Tobacco Alters Photosynthetic Electron Partitioning and Enhances Cyclic Electron Flow. *Plant physiol* 161, 866–879
- Bonifacio A, Martins MO, Ribeiro CW, Fontenele A V, Carvalho FEL, Margis-Pinheiro M, Silveira JAG (2011) Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. *Plant cell env* 34, 1705–1722
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic biochem* 722, 248–254
- Busch FA (2012) Current methods for estimating the rate of photorespiration in leaves. *Plant biol* 15, 648–655
- Cuello J, Quiles MJ (2007) Fractionation of thylakoid membranes into grana and stroma thylakoids. In, Carpentier R, ed. *Photosynthesis Research Protocols (Methods in Molecular Biology)*. Humana Press, USA, pp 1–9
- Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R (2005) Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 Is a Central Component of the Reactive Oxygen Gene Network of Arabidopsis. *Plant cell* 17, 268–281
- de Bianchi S, Betterle N, Kouril R, Cazzaniga S, Boekema E, Bassi R, Dall'Osto L (2011) Arabidopsis mutants deleted in the light-harvesting protein Lhcb4 have a disrupted photosystem II macrostructure and are defective in photoprotection. *Plant cell* 23, 2659–2679
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H (2007) Mesophyll conductance to CO₂, current knowledge and future prospects. *Plant cell env* 31, 602–621
- Foyer HC, Noctor G (2009) Redox Regulation in Photosynthetic Organisms. *Antioxid redox sign* 11, 861–905

- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim biophys acta* 990, 87–92
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide Dismutases. *Plant physiol* 59, 315–318
- Gitelson AA, Merzlyak MN, Chivkunova OB (2001) Optical properties and nondestructive estimation of anthocyanin content in plant leaves. *Photochem photobiol* 74, 38–45
- Goh C, Ko S, Koh S (2012) Photosynthesis and Environments, Photoinhibition and Repair Mechanisms in Plants. *J plant biol* 55, 93–101
- Havir E, McHale N (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant physiol* 84, 450–455
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) *The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil*. California Agricultural Experiment Station, Berkeley, CA, USA pp 32
- Joliot P, Johnson GN (2011) Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants. *Proc natl acad sci USA* 108, 13317–13322
- Koussevitzky S, Suzuki N, Huntington S, Armijo L, Sha W, Cortes D, Shulaev V, Mittler R (2008) Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *J biol chem* 283, 34197–34203
- Krieger-Liszkay A, Fufezan C, Trebst A (2008) Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynth res* 98, 551–564
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem soc trans* 11, 591–592
- Lieth JH, Reynolds JF (1987) The Nonrectangular Hyperbola as a Photosynthetic Light Response Model, Geometrical Interpretation and Estimation of the Parameter θ . *Photosynthetica* 21, 363–366
- Liu J, Wang P, Liu B, Feng D, Zhang J, Su J, Zhang Y, Wang J-F, Wang HB (2013) A deficiency in chloroplastic ferredoxin 2 facilitates effective photosynthetic capacity during long-term high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* (Accepted article - DOI: 10.1111/tpj.12341)
- Lutts S, Majerus V, Kinet J (1999) NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiol Plant* 105, 450–458

- Maruta T, Tanouchi A, Tamoi M, Yabuta Y, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S (2010) Arabidopsis chloroplastic ascorbate peroxidase isoenzymes play a dual role in photoprotection and gene regulation under photooxidative stress. *Plant cell physiol* 51, 190–200
- Miller G, Suzuki N, Rizhsky L, Hegie A, Koussevitzky S, Mittler R (2007) Double Mutants Deficient in Cytosolic and Thylakoid Ascorbate Peroxidase Reveal a Complex Mode of Interaction between Reactive Oxygen Species, Plant Development, and Response to Abiotic Stresses *Plant physiol* 144, 1777–1785
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends plant sci* 11, 15–19
- Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson a M, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P, Purugganan MD, Richards CL, Valladares F, et al. (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends plant sci* 15, 684–692
- Pinto PM, Klein CS, Zaha A, Ferreira HB (2009) Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome sci* 7, 45–56.
- Pnueli L, Liang H, Rozenberg M, Mittler R (2003) Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient Arabidopsis plants. *Plant j* 34, 187–203
- Reid CD, Tissue DT, Fiscus EL, Strain BR (1997) Comparison of spectrophotometric and radioisotopic methods for the assay of Rubisco in ozone-treated plants. *Physiol plant* 101, 398–404
- Ribeiro CW, Carvalho FEL, Rosa SB, Alves-Ferreira M, Andrade CMB, Ribeiro-Alves M, Silveira JAG, Margis R, Margis-Pinheiro M (2012) Modulation of genes related to specific metabolic pathways in response to cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants. *Plant biol* 14, 944–955
- Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermeil S, Inzé D, Mittler R (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant j* 32, 329–342

- Rosa SB, Caverzan A, Teixeira FK, Lazzarotto F, Silveira JAG, Ferreira-Silva SL, Abreu-Neto J, Margis R, Margis-Pinheiro M (2010) Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. *Phytochem* 71, 548–558
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1994) Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In, Schulze, E.D., Caldwell, M.M. (Ed.). *Ecophysiology of photosynthesis*. Springer, Berlin, pp 49–70
- Sharkey TD, Bernacchi JD, Farquhar GD, Singsaas EL (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant cell env* 30, 1035-40
- Slesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Miszalski Z (2007) The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Acta biochim pol* 54, 39–50
- Suzuki N, Miller G, Sejima H, Harper J, Mittler R (2013) Enhanced seed production under prolonged heat stress conditions in *Arabidopsis thaliana* plants deficient in cytosolic ascorbate peroxidase 2. *J exp bot* 64, 253–263
- Takahashi S, Badger MR (2011) Photoprotection in plants, a new light on photosystem II damage. *Trends plant sci* 16, 53–60
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, procedure and some applications. *Biotechnol* 24, 145–149.
- Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Van de Cotte B, Morsa S, Ravanat J-L, Hegie A, Triantaphylidès C, Shulaev V, Van Montagu MCE, et al. (2011) Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. *Proc natl acad sci USA* 108, 1711–1716
- Vernon L (1960) Spectrophotometric Determination of Chlorophylls and Pheophytins in Plant Extracts-Corrections. *Analytic chem* 32, 1414–1414
- Yamori W, Noguchi K, Kashino Y, Terashima I (2008) The role of electron transport in determining the temperature dependence of the photosynthetic rate in spinach leaves grown at contrasting temperatures. *Plant cell physiol* 49, 583–591
- Yangcang X, Jing W (2003) The Relation Between Photorespiration and Active Oxygen Species Accumulation in Wheat Seedlings. *J plant physiol mol bio* 29: 92-96

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Appendix S1: Representative 2-DE maps of rice leaf proteins from non-transformed and APX1/2 knockdown rice exposed to moderate light and to high light.

Appendix S2: Characterization by MS/MS of 54 rice leaf proteins from non-transformed and APX1/2 knockdown plants exposed to moderate light and to high light.

Appendix S3. Transcript amounts of (A, B) Osapx1 and Osapx2 and (C) total APX activity and (D) western blot of APX 1 and APX 2 in leaves of non-transformed (NT) (□) and cytosolic APX1/2 knockdown rice (■) exposed to high light (HL) and moderate light (ML), control. Lowercase letters represent significant differences between different genotypes, within a same treatment, whereas different capital letters represent significant differences between treatments, within a same genotype, by Tukey's test ($p \leq 0.05$). The means were obtained from three independent replicates (three plants).

Appendix S4. *In gel* activity of SOD isoforms in leaves of NT and APX1/2 exposed to HL and ML (control). The total protein amount loaded in each lane was equal to 10 μg . Different SOD isoforms were identified by inhibition assays with H_2O_2 and KCN, as described in methodology.

Appendix S5. Light curves (A-PPFD), measured on leaves from (o) non transformed rice and (●) silenced for the expression of cytosolic APX (APX1/2s), cultured for five days under 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of the PPFD (circles) or under 2,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (squares) of the incident light for 24 hours.

Appendix S6. A-Ci curves, measured on leaves from (o) non transformed rice and (●) silenced for the expression of cytosolic APX (APX1/2s), cultured for five days under 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of the PPFD (circles) or under 2,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (squares) of the incident light for 24 hours.

Figure legends

Figure 1. (A) Pheophytin content and (B) relative expression Lhcb1 (chlorophyll a-b binding protein-type I) in leaves of NT (□) and APX1/2 (■) exposed to HL and ML. Lowercase letters represent significant differences between different genotypes, within a same treatment, whereas different capital letters represent significant differences between treatments, within a same genotype, by Tukey's test ($p \leq 0.05$). The means were obtained from three independent replicates (three plants). The S.C. of Lhcb1 was 28%.

Figure 2. Relative abundance of photosystem II and photosynthetic electron transport chain proteins. (A) 33 kDa OEC (oxygen evolution complex), (B) 23 kDa OEC, (C) 10 kDa OEC, (D) plastocyanin, (E) Ferredoxin I and (F) Ferredoxin NADP(H)-oxireductase in leaves of NT (□) and APX1/2 (■) exposed to HL and ML (control). Details are showed in Figure 1. The S.C. of 33 kDa, 23 kDa, 10 kDa, plastocyanin, Ferredoxin I and Ferredoxin NADP(H)-oxireductase was 60%, 42%, 22% 46%, 10% and 35%, respectively.

Figure 3. Relative abundance of proteins associated with photosynthesis. (A) rubisco activase, (B) rubisco large chain, (C) initial activity of rubisco, (D) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, (E) sedoheptulose-1,7-biphosphatase and (F) phosphoribulokinase in leaves of NT (□) and APX1/2 (■) exposed to HL and ML (control). Details are showed in Figure 1. The S.C. of rubisco activase, rubisco large chain, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, sedoheptulose-1,7-biphosphatase and phosphoribulokinase was 45%, 40%, 30%, 26% and 42%, respectively.

Figure 4. Relative abundance of proteins associated with photorespiratory activity. (A) phosphoglycerate kinase, (B) glycine decarboxylase and (C) chloroplastic glutamine synthetase in leaves of NT (□) and APX1/2 (■) exposed to HL and ML (control). Details are showed in Figure 1. The S.C. of phosphoglycerate kinase, glycine dehydrogenase and chloroplastic glutamine synthetase was 41%, 7% and 48%, respectively.

Figure 5. Photorespiration-related enzymes activities of (A) GS, (B) GO and catalase (C) transcripts amount and (D) activity in leaves of NT (□) and APX1/2 (■) exposed to HL and ML (control). Details are showed in Figure 1.

Figure 6. (A) Relative protein abundance of chloroplastic Cu/Zn–SOD, (B) ChlSOD activity in leaves of NT (□) and APX1/2 (■) exposed to HL and ML (control). Details are showed in Figure 1. The S.C. of chloroplastic Cu/Zn – SOD was 23%.

Table 1. Contents of photosynthetic pigments and anthocyanin in leaves of cytosolic APX1/2 knockdown and NT rice plants. Capital letters represent significant differences between treatments and lowercase letters represent differences among genotypes analyzed by Tukey's test, with significance ≤ 0.05 .

		Chl a (mg g ⁻¹ FW)	Chl b (mg g ⁻¹ FW)	Chl a/b	Carotenoid (mg g ⁻¹ FW)	Anthocyanin (mg g ⁻¹ FW)
NT	ML	2.21Ab	0.58Ab	3.78Ab	0.69Aa	0.56Ab
	HL	2.17Aa	0.61Aa	3.52Bb	0.74Aa	0.64Aa
APX1/2	ML	2.89Aa	0.74Aa	3.91Ba	0.54Ab	0.79Aa
	HL	2.20Ba	0.54Ba	4.11Aa	0.55Ab	0.58Ba

Table 2. Photochemical parameters of chlorophyll *a* fluorescence, photosynthetic efficiency parameters and stomatal conductance in APX1/2 and NT rice plants. Capital letters represent significant differences between treatments and lowercase letters represent differences among genotypes analyzed by Tukey's test, significance ≤ 0.05 .

Chlorophyll <i>a</i> fluorescence parameters						
		Fv/Fm	$\Delta F/Fm'$	qP	NPQ	ETR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
NT	ML	0.73Aa	0.21Aa	0.77 Aa	0.96Ba	45.41Aa
	HL	0.38Ba	0.09Ba	0.42Ba	2.07Ab	7.84Ba
APX1/2	ML	0.75Aa	0.25Aa	0.86Aa	1.14Ba	52.9Aa
	HL	0.36Ba	0.08Ba	0.44Ba	2.25Aa	7.32Ba
Gas exchange parameters						
		A_{pot} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	$V_{\text{c}_{\text{max}}}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	J_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	α ($\text{mol CO}_2 \text{ mol photons}^{-1}$)
NT	ML	36.52Aa	174Aa	175Aa	0.55Aa	0.071Aa
	HL	5.31Ba	49Ba	54Ba	0.13Ba	0.042Ba
APX1/2	ML	33.43Aa	180Aa	168Aa	0.42Aa	0.070Aa
	HL	5.12Ba	51Ba	43Ba	0.12Ba	0.039Ba

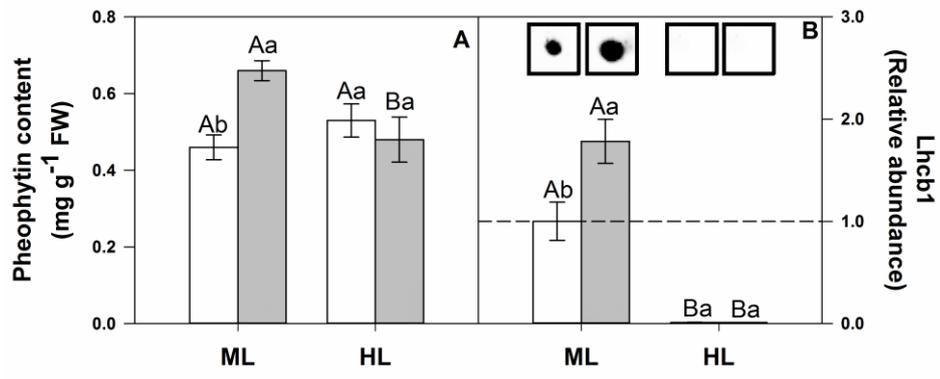


Figure 1.

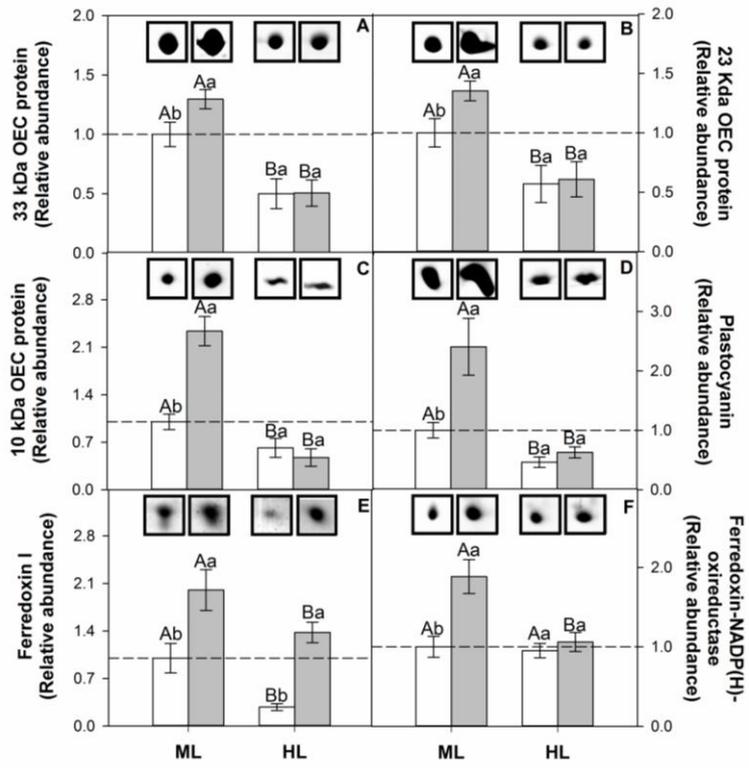


Figure 2.

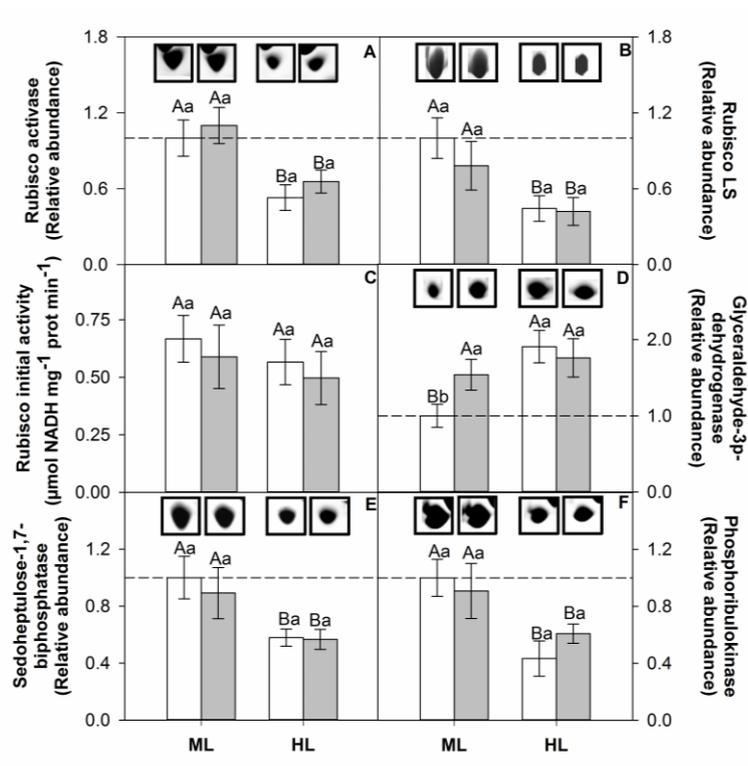


Figure 3.

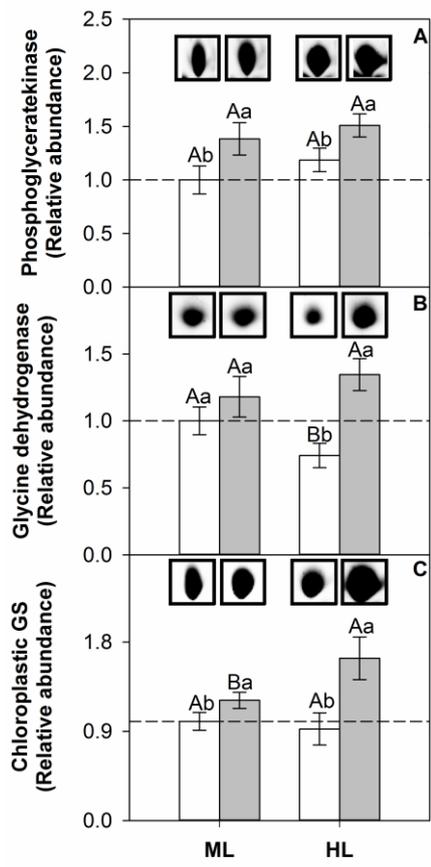


Figure 4.

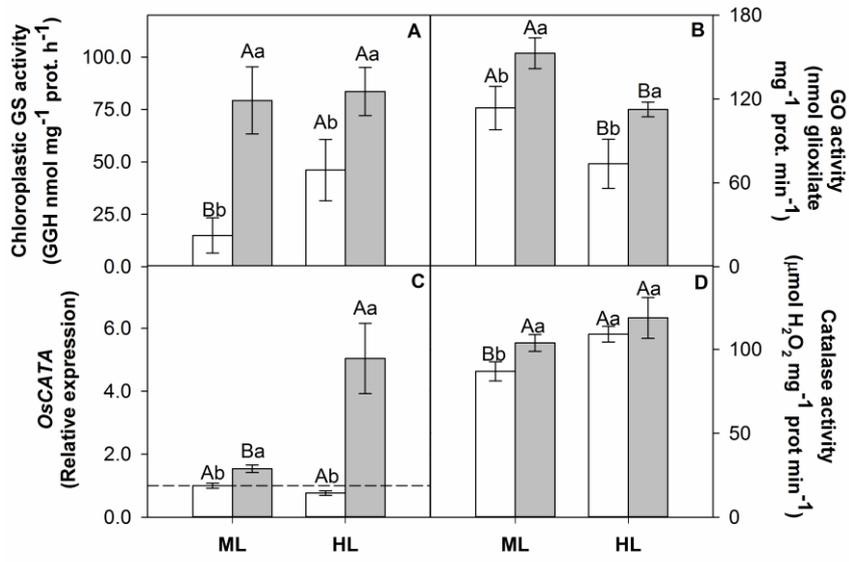


Figure 5.

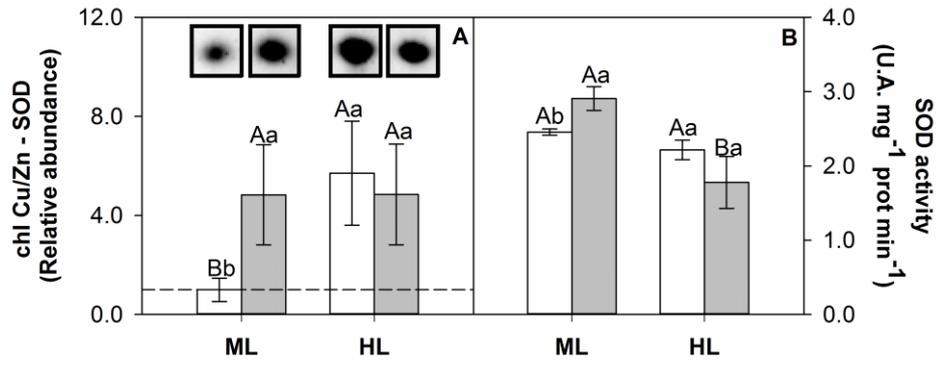
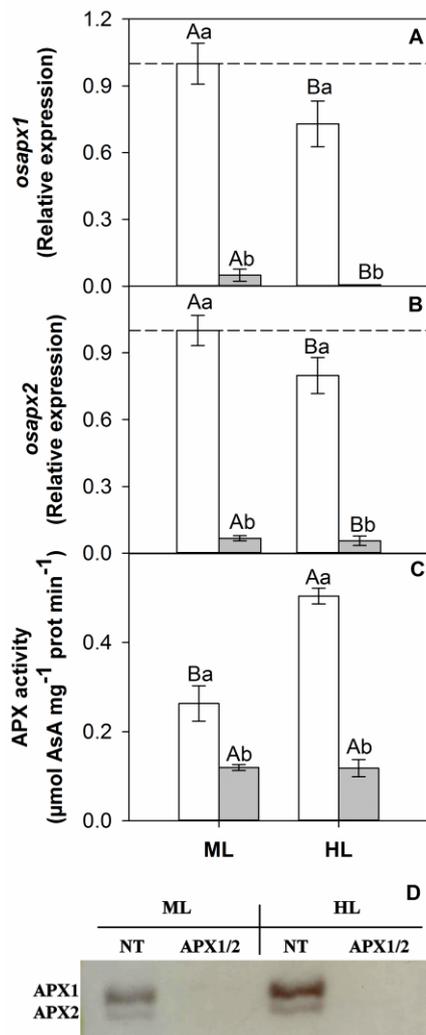
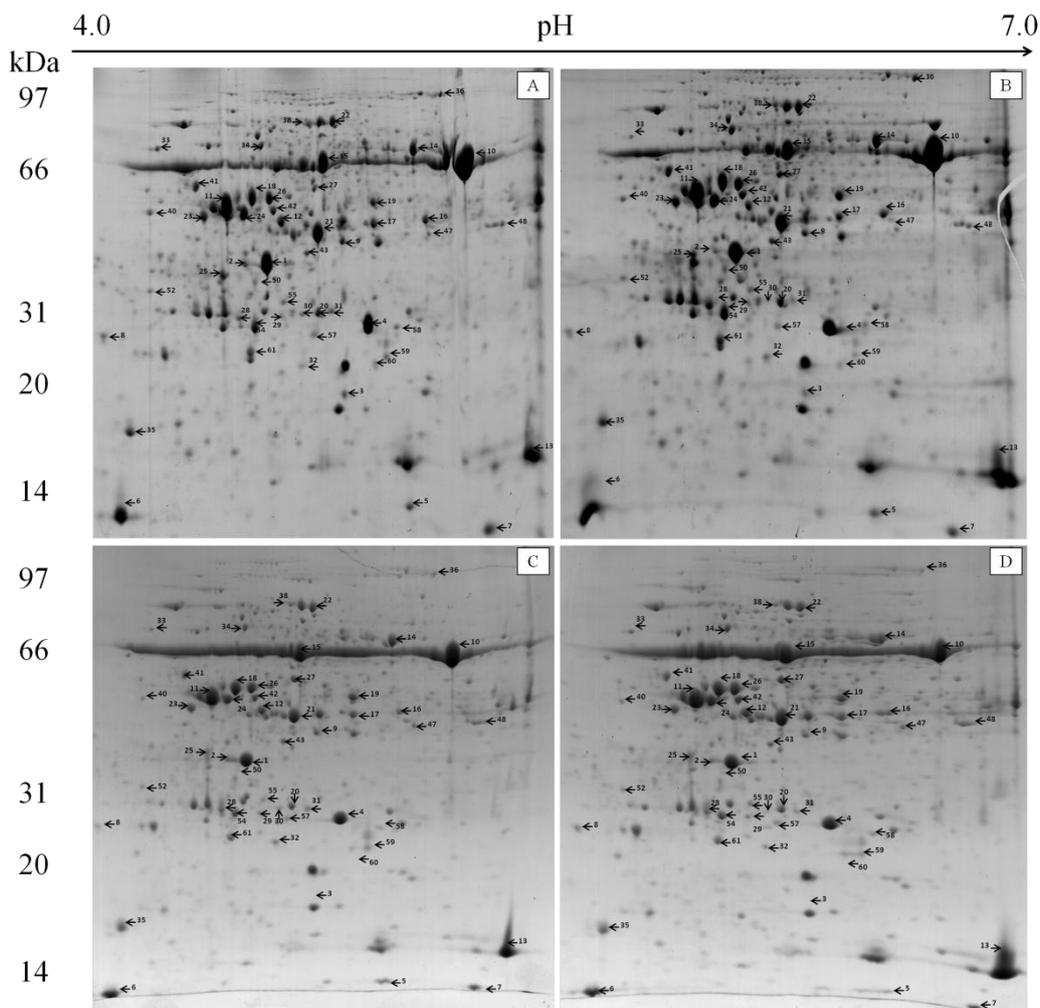


Figure 6.



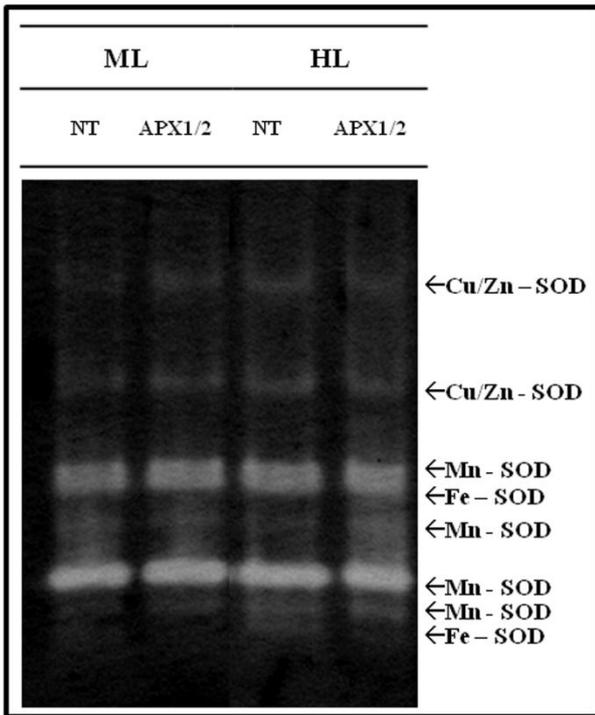
Appendix S1. Transcript amounts of (A, B) *Osapx1* and *Osapx2* and (C) total APX activity and (D) western blot of APX 1 and APX 2 in leaves of non-transformed (NT) (□) and cytosolic APX1/2 knockdown rice (■) exposed to high light (HL) and moderate light (ML), control. Lowercase letters represent significant differences between different genotypes, within a same treatment, whereas different capital letters represent significant differences between treatments, within a same genotype, by Tukey's test ($p \leq 0.05$). The means were obtained from three independent replicates (three plants).



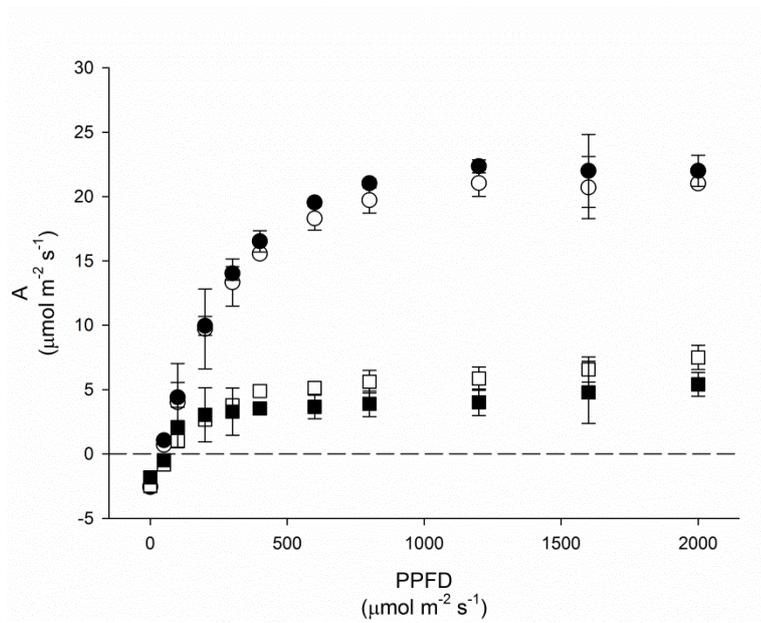
Appendix S2. Representative 2-DE maps of rice leaf proteins from non-transformed (A and C) and APX1/2 knockdown rice (B and D) exposed to moderate light (A and B) and to high light (C and D). Aliquots of 500 μ g of proteins were loaded into pH 4–7 IPG strips (13 cm, linear). SDS-PAGE was performed with 12.5% gels and the spots were visualized by CBR staining. Arrows indicate differentially accumulated protein spots. The gels are representative of three independent runs.

Appendix S2: Characterization by MS/MS of 54 rice leaf proteins from non-transformed and APX1/2 knockdown plants exposed to moderate light and to high light. The up- (↑) or down-regulation (↓) indicate significant changes in the volume of spots analyzed by Tukey's test, with significance ≤ 0.05.

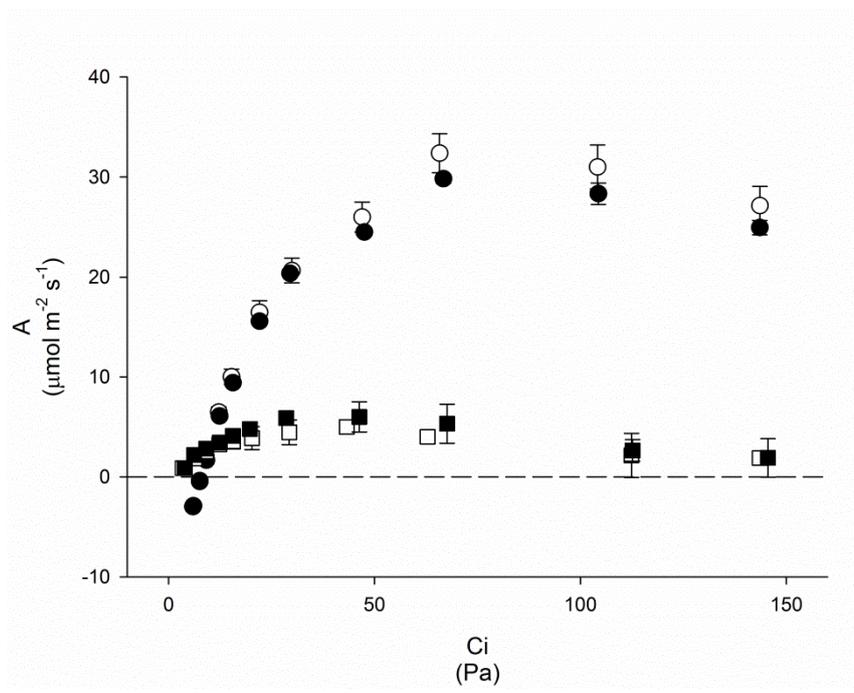
Landmark	Protein Score	Access. number	Sequence Coverage	Peptides Match	Protein	pI		MM		Change in relation to NT-ML		
						Obs	Theo	Obs	Theo	APX1/2-ML	NT-HL	APX1/2-HL
Photosynthesis-related proteins												
48	220	gi 75147522	13%	3(2)	Thylakoid formation protein 1, chloroplastic	6.1	9.0	29.0	32.3	=	↓	↓
50	409	gi 152013384	28%	6(5)	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	5.1	5.6	30.0	28.5	↑	↓	↓
52	49	gi 152013384	8%	1(1)	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	4.6	5.6	29.0	28.5	=	↓	↓
1	1256	gi 115436780	60%	84(34)	Putative 33kda oxygen evolving protein of photosystem II	5.2	6.1	36.5	35.0	↑	↓	↓
2	264	gi 739292	31%	10(3)	Oxygen-evolving complex protein I	5.0	5.1	37.5	26.6	=	=	↓
3	93	gi 1398999	21%	5(2)	23 kda polypeptide of photosystem II	5.6	9.0	24.0	27.0	↓	↓	↓
4	734	gi 115470529	42%	33(16)	Probable photosystem II oxygen-evolving complex protein 2	5.8	8.0	28.0	27.0	↑	↓	↓
5	120	gi 1835731	22%	7(2)	Photosystem II 10 kda polypeptide	6.0	9.0	12.8	12.0	↑	↓	↓
6	207	gi 115465862	46%	7(3)	Plastocyanin, chloroplastic	4.3	5.6	13.0	15.6	↑	↓	↓
7	487	gi 11466848	85%	42(11)	Photosystem I subunit VII	6.6	6.5	11.8	9.4	=	↓	↓
8	30	gi 122234597	10%	13(4)	Ferredoxin-1, chloroplastic	4.0	4.4	24.8	15.2	↑	↓	=
9	433	gi 41052915	35%	18(8)	Putative ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase	6.1	8.0	46.3	41.0	↑	=	=
14	635	gi 11466784	31%	23(12)	ATP synthase alpha subunit	6.1	6.0	60.0	55.6	↑	↓	↓
15	907	gi 11466794	45%	20(17)	ATP synthase CF1 beta subunit	5.5	5.5	55.3	54.0	=	=	↑
16	326	gi 115472339	27%	13(5)	ATP synthase gamma chain	6.1	8.6	44.0	40.0	↑	↓	↓
10	710	gi 11466795	40%	41(11)	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	6.4	6.2	55.8	53.0	=	↓	↓
38	104	gi 148839606	11%	4(3)	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	5.4	6.2	80.0	53.4	=	↓	↓
11	1376	gi 8918361	52%	40(32)	Rubisco activase, chloroplast precursor, putative, expressed	4.9	5.8	47.0	47.0	↑	=	=
12	1143	gi 8918361	50%	55(22)	Rubisco activase small isoform precursor	5.3	5.8	44.5	48.0	↓	↓	↓
40	1194	gi 109940135	45%	28(22)	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	4.6	5.4	43.0	51.8	=	↓	↓
43	301	gi 109940135	15%	4(4)	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	5.4	5.4	35.0	51.8	=	↓	=
13	238	gi 347451	46%	8(5)	Ribulose biphosphate carboxylase small chain	6.8	8.0	15.3	12.2	↑	↓	↑
57	130	gi 158513174	23%	4(2)	Ribulose biphosphate carboxylase small chain	5.4	9.0	25.0	19.9	=	↓	↓
58	589	gi 158513174	52%	17(12)	Ribulose biphosphate carboxylase small chain	5.4	9.0	26.0	19.9	=	↓	↓
18	508	gi 125552851	41%	9(6)	Phosphoglycerate kinase	5.1	6.8	48.8	30.5	↑	=	↑
19	410	gi 115450493	30%	25(7)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplast, putative, expressed	5.8	6.2	41.5	47.5	↑	↑	↑
20	953	gi 115434516	82%	46(23)	Triosephosphate isomerase, cytosolic	5.5	5.4	30.5	27.0	↑	↓	=
22	1067	gi 28190676	40%	37(16)	Putative transketolase	5.5	6.1	78.3	80.0	↑	=	=
23	281	gi 27804768	26%	13(4)	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase precursor	4.8	5.8	46.0	42.7	=	↓	↓
24	425	gi 115448091	42%	42(9)	Phosphoribulokinase	5.0	5.6	46.0	45.1	=	↓	↓
Photorespiration-related proteins												
26	918	gi 19387272	48%	54(24)	Putative precursor chloroplastic glutamine synthetase	5.2	6.2	48.5	49.7	↑	=	↑
35	128	gi 51090904	7%	1(1)	Putative, glycine dehydrogenase	6.8	6.4	11.0	11.0	↑	=	↑
36	382	gi 115482934	52%	17(12)	Putative glycine cleavage system H protein	4.7	4.9	17.0	17.0	↑	↓	↓
Carbon metabolism-related proteins												
17	502	gi 110289264	70%	34(6)	Malate dehydrogenase, cytoplasmic, putative, expressed	5.8	5.8	43.5	36.0	=	↓	=
21	532	gi 108864048	32%	10(7)	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplast precursor, putative, expressed	5.5	6.1	41.3	42.0	↑	↓	↓
42	182	gi 152032435	21%	5(3)	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic	5.2	5.6	43.0	37.5	↑	↓	↓
Stress response-related proteins												
32	134	gi 42408425	23%	9(2)	Putative superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplast precursor	5.3	5.8	24.3	20.0	↑	↑	↑
54	545	gi 109940169	43%	8(6)	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	5.1	6.5	27.0	25.0	↑	↓	↓
30	549	gi 115452337	63%	20(7)	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic	5.5	5.4	30.5	27.5	↓	↑	↓
31	55	gi 1321661	26%	4(0)	Putative L-ascorbate peroxidase 2, cytosolic	5.1	30.0	30.8	30.0	↓	↑	=
47	208	gi 75327965	32%	7(5)	Thioredoxin-like protein CDSP32, chloroplastic	6.2	6.3	37.0	32.5	=	=	↑
60	236	gi 11135471	31%	10(4)	Thioredoxin M5, chloroplastic	5.8	8.2	23.0	18.9	=	↓	↓
59	664	gi 75139348	44%	12(10)	Peroxiredoxin-2E-2, chloroplastic	5.9	6.2	24.0	23.3	=	=	↓
61	124	gi 75139348	9%	1(1)	Peroxiredoxin-2E-2, chloroplastic	7.5	6.2	24.0	23.3	=	↓	↓
33	1354	gi 222631026	43%	58(23)	Belongs to the heat shock protein 70 family.	4.7	5.1	81.3	74.0	↓	↓	↓
34	588	gi 115466004	37%	23(7)	Putative chaperonin 60 beta	5.1	5.6	66.5	64.0	↑	↓	=
29	190	gi 115483088	27%	6(3)	Gluatona S transferase	4.5	5.3	30.0	24.8	↑	=	↑
Others												
25	668	gi 46805452	46%	35(10)	Putative inorganic pyrophosphatase	4.9	5.8	36.5	31.0	↑	↓	↓
27	879	gi 218191089	53%	40(15)	Elongation factor Tu	5.5	6.2	50.8	50.0	↑	↑	↑
28	603	gi 19068149	48%	33(10)	Drought-induced S-like ribonuclease	5.0	4.5	30.3	30.0	↑	↑	↑
41	216	gi 75261432	17%	5(4)	Succinyl-coa ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	4.8	6.0	50.0	45.4	↑	↓	↓
55	160	gi 75225548	15%	2(1)	Germin-like protein 1	5.3	6.0	28.0	22.0	=	↓	=



Appendix S4. *In gel* activity of superoxide dismutase (SOD) isoforms in leaves from NT and APX1/2 rice plants exposed to ML (control) and HL conditions. The total protein amount loaded in each lane was equal to 10 μ g. Different SOD isoforms were identified by inhibition assays, wherein the Cu/Zn-SOD and Fe-SOD isoforms are inhibited by 5 mM H_2O_2 ; Fe-SOD isoform is resistant to inhibition by 2 mM KCN and Mn-SOD isoform is resistant to both H_2O_2 and KCN inhibitors.



Appendix S5. Light curves (A-PPFD), measured on leaves from (o) non transformed rice and (●) silenced for the expression of cytosolic APX (APX1/2s), cultured for five days under 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of the PPFD (circles) or under 2,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (squares) of the incident light for 24 hours.



Appendix S6. A-C_i curves, measured on leaves from (o) non transformed rice and (●) silenced for the expression of cytosolic APX (APX1/2s), cultured for five days under 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of the PPFD (circles) or under 2,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (squares) of the incident light for 24 hours.

**Artigos publicados
(período 2010-2013)**

RESEARCH PAPER

Modulation of genes related to specific metabolic pathways in response to cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants

C. W. Ribeiro^{1,2}, F. E. L. Carvalho³, S. B. Rosa^{1,2}, M. Alves-Ferreira⁴, C. M. B. Andrade¹, M. Ribeiro-Alves⁵, J. A. G. Silveira³, R. Margis¹ & M. Margis-Pinheiro²

¹ Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, Brazil

⁴ Department of Genetics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁵ Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Keywords:

Ascorbate peroxidase; gene regulation; hydrogen peroxide; microarray; proteomics; rice.

Correspondence

M. Margis-Pinheiro, Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500-43312 – 204, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS Brazil.
E-mail: marcia.margis@ufrgs.br

Editor

T. Elzenga

Received: 14 February 2012; Accepted: 15 February 2012

doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00587.x

ABSTRACT

As a central component of the hydrogen peroxide detoxifying system in plant cells, ascorbate peroxidases (APX) play an essential role in the control of intracellular reactive oxygen species (ROS) levels. To characterise the function of cytosolic APX isoforms (*OsAPX1* and *OsAPX2*) in the mechanisms of plant defence, *OsAPX1/2* knockdown rice plants were previously obtained. *OsAPX1/2* knockdown plants (*APx1/2s*) exhibited a normal phenotype and development, even though they showed a global reduction of APX activity and increased hydrogen peroxide accumulation. To understand how rice plants compensate for the deficiency of cytosolic APX, expression and proteomic analyses were performed to characterise the global expression pattern of the *APx1/2s* mutant line compared with non-transformed plants. Our results strongly suggest that deficiencies in cytosolic APX isoforms markedly alter expression of genes associated with several key metabolic pathways, especially of genes involved in photosynthesis and antioxidant defence. These metabolic changes are compensatory because central physiological processes such as photosynthesis and growth were similar to non-transformed rice plants. Our analyses showed modulation of groups of genes and proteins related to specific metabolic pathways. Among the differentially expressed genes, the largest number corresponded to those with catalytic activity. Genes related to oxidative stress, carbohydrate metabolism, photosynthesis and transcription factor-encoding genes were also modulated. These results represent an important step toward understanding of the role played by cytosolic APX isoforms and hydrogen peroxide in the regulation of metabolism by redox modulation in monocots.

INTRODUCTION

Since the introduction of molecular oxygen into the environment through the emergence of photosynthetic organisms, reactive oxygen species (ROS) have been the uninvited companions of aerobic life (Halliwell 2006). Through a variety of reactions, molecular oxygen produces superoxide (O_2^-), which in turn leads to the formation of hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radicals (OH^\cdot) and other molecules. ROS are also produced continuously as by-products of various metabolic pathways and are localised in different cellular compartments such as chloroplasts, mitochondria and peroxisomes (Del Rio *et al.* 2006; Navrot *et al.* 2007). Hydrogen peroxide is continually generated from various sources during normal metabolism *via* the Mehler reaction in chloroplasts, electron transport in mitochondria and photorespiration in peroxisomes (Neill *et al.* 2002a), but hydrogen peroxide can

also be generated by specific enzymes. Studies have demonstrated that plasma membrane (PM)-located respiratory burst oxidase homologue (Rboh) enzymes, similar to the respiratory burst oxidase of mammalian neutrophil cells, are an essential ROS-producing system during the early stages of plant-microbe interactions (Torres *et al.* 2002; Apel & Hirt 2004). Accumulation of ROS affects many cellular functions, causing damage to proteins, lipids, carbohydrates and DNA and can result in cell death (Foyer & Noctor 2005).

Hydrogen peroxide, one of the most important ROS, is a toxic cellular metabolite, but also functions as a signalling molecule that mediates responses to various stimuli in both plant and animal cells. Therefore, hydrogen peroxide plays a dual role in plants, at low concentrations acting as a signalling molecule involved in acclimation and triggering tolerance to various biotic and abiotic stresses, and leading to cell death at high concentrations (Neill *et al.* 2002b; Quan *et al.*

Involvement of *ASR* genes in aluminium tolerance mechanisms in rice

RAFAEL AUGUSTO ARENHART^{1,2}, JULIO CÉSAR DE LIMA¹, MARCELO PEDRON¹, FABRICIO E. L. CARVALHO³, JOAQUIM ALBENISIO GOMES DA SILVEIRA³, SILVIA BARCELOS ROSA^{1,2}, ANDREIA CAVERZAN¹, CLAUDIA M. B. ANDRADE², MARIANA SCHÜNEMANN¹, ROGÉRIO MARGIS^{1,2} & MÁRCIA MARGIS-PINHEIRO^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular and ²Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre and ³Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

ABSTRACT

Among cereal crops, rice is considered the most tolerant to aluminium (Al). However, variability among rice genotypes leads to remarkable differences in the degree of Al tolerance for distinct cultivars. A number of studies have demonstrated that rice plants achieve Al tolerance through an unknown mechanism that is independent of root tip Al exclusion. We have analysed expression changes of the rice *ASR* gene family as a function of Al treatment. The gene *ASR5* was differentially regulated in the Al-tolerant rice ssp. Japonica cv. Nipponbare. However, *ASR5* expression did not respond to Al exposure in Indica cv. Taim rice roots, which are highly Al sensitive. Transgenic plants carrying RNAi constructs that targeted the *ASR* genes were obtained, and increased Al susceptibility was observed in T1 plants. Embryogenic calli of transgenic rice carrying an *ASR5*-green fluorescent protein fusion revealed that *ASR5* was localized in both the nucleus and cytoplasm. Using a proteomic approach to compare non-transformed and *ASR*-RNAi plants, a total of 41 proteins with contrasting expression patterns were identified. We suggest that the *ASR5* protein acts as a transcription factor to regulate the expression of different genes that collectively protect rice cells from Al-induced stress responses.

Key-words: abiotic stress; aluminium; *ASR* gene family; RNAi.

INTRODUCTION

Aluminium (Al) is the most abundant metal, accounting for approximately 7% of Earth's mass. Regardless of its abundance, Al is not considered an essential nutrient; however, it can occasionally stimulate plant growth or induce other desirable effects when present at low concentrations (Foy 1983). Most Al is chelated by ligands or is present in non-toxic forms, such as aluminosilicates or precipitates. Al-induced toxicity can occur through solubilization of Al in soils under highly acidic conditions (pH below 5.0)

Correspondence: M. Margis-Pinheiro. Fax: +55 51 3308 9823; e-mail: marcia.margis@ufrgs.br

(Famoso *et al.* 2010). It has been estimated that approximately 50% of arable land is negatively impacted by Al toxicity that results from acidic soil (Panda, Baluska & Matsumoto 2009). Al toxicity is considered a primary limiting factor in regard to agricultural productivity (Matsumoto 2000) because it inhibits root growth and mineral absorption (Liu & Luan 2001), leading to a stunted root system that negatively impacts the uptake of water and nutrients. There are many potential cellular locations that could be damaged through interaction with Al, including the cell wall, the surface of the plasma membrane, the cytoskeleton and the nucleus (Panda *et al.* 2009). For example, it has been demonstrated that Al binds strongly to the cell wall of root epidermal and cortical cells (Delhaize, Ryan & Randall 1993). However, some plants are able to tolerate toxic levels of Al in acidic soils. These plants have evolved mechanisms to detoxify Al that is both present internally and externally (Kochian, Pineros & Hoekenga 2005). To achieve internal detoxification, plants accumulate Al inside vacuoles, where it is chelated with organic acids (OA), such as citrate and oxalate (Ma 2007). In contrast, the majority of Al-tolerant plants exclude Al from the root tip by releasing OA at sites of high Al concentration; examples of these acids include malate, citrate and oxalate (Ma, Ryan & Delhaize 2001; Kochian, Hoekenga & Pineros 2004). In species such as sorghum and wheat, the OA–Al complex prevents Al from entering the cell (Sasaki *et al.* 2004; Magalhaes *et al.* 2007), which reduces the concentration and potential toxicity of Al at the growing root tip (Ma *et al.* 2001).

Rice is considered the most Al-tolerant crop (Fageria 1989; Duncan & Baligar 1990); however, there is variability among different rice genotypes, resulting in widely varied tolerance levels among different cultivars (Ferreira 1995). In two independent studies, Ma *et al.* (2002) and Yang *et al.* (2008) observed no OA exudation and increased Al accumulation in the root apex of Al-susceptible rice strains relative to Al-tolerant strains. These results demonstrate that rice plants achieve high levels of Al tolerance through a novel mechanism that does not involve root tip Al exclusion (Famoso *et al.* 2010).

Although genetic studies in rice have identified more than 10 quantitative trait loci for Al tolerance, the

Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress

AURENIVIA BONIFACIO¹, MARCIO O. MARTINS¹, CAROLINA W. RIBEIRO^{3,4}, ADILTON V. FONTENELE¹, FABRICIO E. L. CARVALHO³, MÁRCIA MARGIS-PINHEIRO^{3,4} & JOAQUIM A. G. SILVEIRA^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará and ²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTsal/CNPq), Ceará, Brasil and ³Centro de Biotecnologia and ⁴Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

ABSTRACT

Current studies, particularly in *Arabidopsis*, have demonstrated that mutants deficient in cytosolic ascorbate peroxidases (APXs) are susceptible to the oxidative damage induced by abiotic stress. In contrast, we demonstrate here that rice mutants double silenced for cytosolic APXs (APx1/2s) up-regulated other peroxidases, making the mutants able to cope with abiotic stress, such as salt, heat, high light and methyl viologen, similar to non-transformed (NT) plants. The APx1/2s mutants exhibited an altered redox homeostasis, as indicated by increased levels of H₂O₂ and ascorbate and glutathione redox states. Both mutant and NT plants exhibited similar photosynthesis (CO₂ assimilation and photochemical efficiency) under both normal and stress conditions. Overall, the antioxidative compensatory mechanism displayed by the mutants was associated with increased expression of *OsGpx* genes, which resulted in higher glutathione peroxidase (GPX) activity in the cytosolic and chloroplastic fractions. The transcript levels of *OsCatA* and *OsCatB* and the activities of catalase (CAT) and guaiacol peroxidase (GPOD; type III peroxidases) were also up-regulated. None of the six studied isoforms of *OsApx* were up-regulated under normal growth conditions. Therefore, the deficiency in cytosolic APXs was effectively compensated for by up-regulation of other peroxidases. We propose that signalling mechanisms triggered in rice mutants could be distinct from those proposed for *Arabidopsis*.

Key-words: *Oryza sativa*; antioxidative metabolism; hydrogen peroxide; oxidative stress; redox homeostasis; signalling.

INTRODUCTION

Salinity, high temperature and other abiotic stresses can cause photo-oxidative damage by creating an imbalance between the photosynthetic assimilation of CO₂ and

photochemical activity by increasing the production of reactive oxygen species (ROS) in chloroplasts (Forman, Maiorino & Ursini 2010). The main ROS that overaccumulate are the superoxide radical (O₂^{•-}), produced by the Mehler reaction, and hydrogen peroxide (H₂O₂), synthesized by superoxide dismutase (SOD; Foyer & Noctor 2003). Additionally, the photorespiration pathway may be enhanced in C3 plants when carboxylation reactions in the chloroplast are impaired by the effects of abiotic stresses, causing increased ROS production to occur (especially H₂O₂) (Foyer & Noctor 2000; Foyer *et al.* 2009). The H₂O₂ produced inside the peroxisomes can then be moved to the chloroplasts, mitochondria and cytosol via aquaporin-mediated transport across membranes (Mittler *et al.* 2004; Møller, Jensen & Hansson 2007).

H₂O₂ homeostasis is maintained by several redundant enzymatic pathways that involve peroxidases and other antioxidative enzymatic and non-enzymatic components (Møller *et al.* 2007). Hydrogen peroxide scavenging in plants is essential for cellular protection and cellular signalling (Mittler 2002). Plants contain at least five different enzymes capable of rapid and efficient H₂O₂ removal. These enzymes belong to the following five distinct gene families: ascorbate peroxidases (*Apx*), catalases (*Cat*), glutathione peroxidases (*Gpx*), peroxiredoxins (*Prx*) and type III peroxidases (Mittler & Poulos 2005). The latter are also referred to as phenol peroxidases [guaiacol peroxidases (GPODs)], which are typically involved in the H₂O₂ scavenging in processes associated with growth and development (Cavalcanti *et al.* 2004).

The ascorbate peroxidase (APX) enzyme isoforms (nine genes in *Arabidopsis* and eight in rice) are distributed in almost every compartment of the plant cell (Shigeoka *et al.* 2002; Teixeira *et al.* 2004) and participate in the removal of H₂O₂ as part of the ascorbate-glutathione or Asada–Halliwell–Foyer pathway (Mittler & Poulos 2005). Soluble isoforms of APX can be found in the cytosol, mitochondria and chloroplast stroma, whereas membrane-bound isoforms are found in the peroxisomes and chloroplast thylakoids (Teixeira *et al.* 2006). The expression of the *Apx* genes

Correspondence: J. A. G. Silveira. e-mail: silveira@ufc.br



Contents lists available at ScienceDirect

Scientia Horticulturae

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scihorti

Physiological alterations modulated by rootstock and scion combination in cashew under salinity

S.L. Ferreira-Silva^a, E.N. Silva^a, F.E.L. Carvalho^a, C.S. de Lima^a, F.A.L. Alves^b, J.A.G. Silveira^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTsal/CNPq), Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, CEP 60451-970, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA, Estação Experimental de Arcoverde, Arcoverde, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 May 2010

Received in revised form 8 September 2010

Accepted 9 September 2010

Keywords:

Anacardium occidentale

Grafting

Inorganic and organic solutes

Transpiration

ABSTRACT

In this study we evaluated the influence of rootstocks and scions on physiological disturbances that are induced by salinity in cashew (*Anacardium occidentale*) plantlets. Two cashew genotypes, CCP 09 and BRS 226, were utilized as rootstocks and scions, resulting in four scion/rootstock combinations by reciprocal grafting. The plantlets were irrigated in absence (control) or in presence of 50 or 200 mM NaCl for 15 days under greenhouse conditions. The plantlets with BRS 226 as rootstocks demonstrated higher transpiration and greater accumulations of Na⁺ and Cl⁻, proline and free amino acids in leaves compared to plantlets that having CCP 09 as rootstocks. The K⁺ content in roots and leaves of all four combinations was not influenced by salinity or by different scion/rootstock combinations. The self-grafting of the BRS 226 genotype showed the highest stability for chlorophyll and Rubisco, exhibiting the highest tolerance to salinity. The scion genotype did not affect any of the studied physiological parameters. The studied physiological disturbances induced by salinity in cashew plantlets were more influenced by rootstock than by scion and these changes were also dependent on compatibility between scion and rootstock.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Soil salinity is a major environmental factor limiting agricultural productivity worldwide. About 7% of the world's land area and 20% of the irrigated land are affected by soil salinity (Yamaguchi and Blumwald, 2005). Soils are classified as saline when the electric conductivity (EC) is 4 dS m⁻¹ or more, which is equivalent to approximately 40 mM NaCl, which is able to generate an osmotic pressure of approximately 0.2 MPa (Munns and Tester, 2008). This definition of salinity derives from the EC that significantly reduces the yield of most crops. The hyperosmolarity decreases the osmotic potential of soil solution and restricts water uptake by plant roots; also, this frequently causes a significant increase in the stomatal resistance and reduction of CO₂ photosynthetic assimilation (Meloni et al., 2003).

High concentrations of salt ions in root medium, mainly Na⁺ and Cl⁻, can affect the absorption of some essential elements (Apse and Blumwald, 2007), which compromises the acquisition and use of these nutrients (Grattan and Grieve, 1999). The increase in Na⁺ content in the leaves can affect biochemical and physiological processes that are K⁺-dependent, such as stomatal opening, photo-

synthesis, respiration and protein synthesis. Moreover, high levels of Cl⁻ can interfere in NO₃⁻ uptake and cause cell toxicity (White and Broadley, 2001). These disruptions induced by high salinity may cause ionic toxicity, as evidenced by changes in the K⁺/Na⁺, Ca²⁺/Na⁺ and NO₃⁻/Cl⁻ ratios, that alter ionic homeostasis (Grattan and Grieve, 1999; Apse and Blumwald, 2007).

Several strategies have been used to reduce the impacts of salinity on the agricultural income. These strategies include correction of the soil salinity, which is considered expensive and temporary (Dasgan et al., 2002), as well as breeding for resistant genotypes, which is considered laborious and complex due to the polygenic nature of salt resistance (Ashraf and Foolad, 2007). Given these difficulties, the understanding and use of physiological parameters associated with plant resistance can consist of immediate and viable approaches to reduce the impacts of salinity on crops. Among the well-known mechanisms of resistance, the exclusion of leaf Na⁺ and Cl⁻ is essential to characterize resistant genotypes (Ashraf and Ahmad, 2000).

The mechanisms associated with the exclusion of Na⁺ and Cl⁻ ions from leaves involve both the uptake selectivity in roots and resistance to transferring these ions to the shoot (Maathuis and Amtmann, 1999). These mechanisms minimize ionic toxicity in leaf tissues and are essential for developing resistance to salt stress in some rootstocks of citrus (García-Sánchez et al., 2002), rose (Wahome et al., 2001), grape (Paranychiyanakis and Angelakis,

* Corresponding author. Tel.: +55 85 3366 9821; fax: +55 85 3366 9821.
E-mail address: silveira@ufc.br (J.A.G. Silveira).



Aclimação ao estresse salino em plantas de arroz induzida pelo pré-tratamento com H₂O₂

**Fabrizio E. L. Carvalho¹, Ana K. M. Lobo¹, Aurenivia Bonifacio¹, Marcio O. Martins¹,
Milton C. Lima Neto¹ & Joaquim A. G. Silveira¹**

RESUMO

Estudou-se o efeito da aplicação exógena de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na aclimação ao estresse salino com base nas alterações fotossintéticas, indicadores de estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidativas em folhas de plantas de arroz. Utilizaram-se duas diferentes concentrações de H₂O₂ (1 e 10 µM) para o pré-tratamento, concentrações essas aplicadas na solução nutritiva dois dias antes da indução do estresse salino (100 mM de NaCl). A limitação fotossintética e estomática resultante da exposição ao NaCl foi amenizada quando as plantas foram pré-tratadas com 1 µM de H₂O₂. Plantas expostas ao pré-tratamento com H₂O₂ e expostas ao NaCl apresentaram dano de membrana menor quando comparadas com as plantas submetidas ao NaCl isoladamente. O conteúdo de TBARS e H₂O₂ foi reduzido sensivelmente nas plantas pré-tratadas com 1 µM de H₂O₂ e expostas ao NaCl em relação às que não foram pré-tratadas. O sistema antioxidativo enzimático nas plantas expostas ao NaCl foi induzido principalmente quando ocorreu o pré-tratamento com 1 µM de H₂O₂. Os dados sugerem que exposição prévia ao H₂O₂ pode resultar numa aclimação mais efetiva as condições de estresse salino.

Palavras-chave: peróxido de hidrogênio, estresse oxidativo, salinidade

Salt stress acclimation in rice plants induced by H₂O₂ pretreatment

ABSTRACT

The effect of exogenous application of hydrogen peroxide (H₂O₂) in the acclimation to salt stress was studied on the basis of photosynthetic changes, indicators of oxidative stress and activity of antioxidant enzymes in leaves of rice plants. Two different concentrations of the H₂O₂ (1 and 10 µM) were used for the pre-treatment, these concentrations were applied in the nutrient solution two days before the induction of salt stress (100 mM NaCl). The photosynthetic and stomatal limitations after exposure to NaCl were alleviated when the plants were pretreated with 1 µM H₂O₂. Plants pretreated with H₂O₂ and submitted to salt stress showed membrane damage lower in compared to plants exposed to NaCl alone. TBARS and H₂O₂ content was reduced appreciable in plants pretreated with 1 µM H₂O₂ and exposed to NaCl in relation to not pretreated. The enzymatic antioxidative system in plants exposed to NaCl was mainly induced when there was the 1 µM H₂O₂ pretreatment. Data suggest that an anticipated exposure to H₂O₂ may result in more effective acclimation to salt stress.

Key words: hydrogen peroxide, oxidative stress, salinity