



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**ATIVIDADE FOTOQUÍMICA E PROTEÇÃO OXIDATIVA EM MUDAS DE
CAJUEIRO EXPOSTAS A SECA E LUMINOSIDADE ELEVADA**

CRISTINA SILVA DE LIMA

FORTALEZA – CE

2013

CRISTINA SILVA DE LIMA

**ATIVIDADE FOTOQUÍMICA E PROTEÇÃO OXIDATIVA EM MUDAS DE
CAJUEIRO EXPOSTAS A SECA E LUMINOSIDADE ELEVADA**

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em
Bioquímica.

Orientador:

Prof. Dr. **JOAQUIM ALBENÍSIO GOMES DA SILVEIRA**

Co-orientador:

Prof. Dr. **SÉRGIO LUIZ FERREIRA DA SILVA**

FORTALEZA
2013

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

-
- L697a Lima, Cristina Silva de.
 Atividade fotoquímica e proteção oxidativa em mudas de cajueiro expostas à seca e luminosidade elevada / Cristina Silva de Lima. – 2013.
 146 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (Doutorado) – 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 Albenisio Gomes da Silveira.
 Coorientação: Prof. Dr. Sérgio Luiz Ferreira da Silva.
1. Fotoquímica. 2. Proteção oxidativa. 3. Cajueiro. I. Título.

CDD 574.192

ATIVIDADE FOTOQUÍMICA E PROTEÇÃO OXIDATIVA EM MUDAS DE CAJUEIRO EXPOSTAS A SECA E LUMINOSIDADE ELEVADA

Tese de Doutorado apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, área de concentração Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra a disposição dos interessados na Biblioteca desta Universidade.

Aprovada em: 15/04/13

Crustina Silva de Lima

mmim

Joaquim Albenisio Gomes da Silveira, Dr.

UFC/DBBM - Orientador

BANCA EXAMINADORA

Silva

Dr. Sergio Luiz Ferreira-Silva

Universidade Federal Rural do Pernambuco (UFRPE)

Evandro Nascimento da Silva

Dr. Evandro Nascimento da Silva

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Cláudia Marilande Ceccatto

Dra. Vânia Marilande Ceccatto

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Marlos Alves Bezerra

Dr. Marlos Alves Bezerra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

AGRADECIMENTOS

-A DEUS, por iluminar os meus caminhos e me fortalecer diante de todas as decisões as quais tenho que tomar ao longo da minha vida;

-Prof Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira por ser um supervisor excelente. Obrigado por todo o suporte técnico para elaboração deste trabalho, mas acima de tudo pela orientação, aconselhamento em momentos cruciais, e inestimável contribuição para minha formação profissional!

- Prof Dr. Sérgio Luiz Ferreira da Silva por ser meu mestre e supervisor, obrigado por todas as lições e conselhos através dos anos, pelo apoio incondicional e engajamento na elaboração desta tese desde o início até o presente momento!

- Prof Dr. Evandro Nascimento da Silva por todas as discussões, conselhos e pela grande amizade e durante todos os anos de convivência no laboratório.

- Profs Drs. Marlos Bezerra e Vânia Ceccatto pela sua disponibilidade para atuarem como conselheiros colaboradores para esta tese, pelas considerações e valiosas contribuições .

- Aos professores do departamento de Bioquímica da UFC, pelos exemplos de profissionalismo e contribuição para a minha formação profissional;

- Aos colegas Milton e Adilton pelo esforço coletivo (análises no IRGA e no DUAL PAM) e pelos últimos comentários sobre essa tese!

-A amiga Tathiana pela grande amizade, conselhos úteis, discussões e pela ajuda na formatação desta tese.

- Todos os numerosos membros passados e presentes do Laboratório de Metabolismo de Plantas da Universidade Federal do Ceará pelos conselhos, discussões, palestras, seminários, organização do laboratório e muitos momentos compartilhados!

- A todos os funcionários do departamento de Bioquímica, pela atenção e dedicação em atender da melhor forma possível as necessidades dos estudantes;

- Aos amigos de pós graduação: Rafael, Cynthia, Aldênia, Jamylla, Jordânia e Juliana pelos momentos de descontrações provindos da grande e sincera amizade.

- Acima de tudo eu sou profundamente grata aos meus pais e irmãos pelo apoio insubstituível e incansável, bem como por permitirem a minha educação.

- A todas as pessoas que direta e indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

A todos meus sinceros agradecimentos.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio financeiro das seguintes instituições:

- Universidade Federal do Ceará - UFC
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
- Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa – FUNCAP
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade - INCTSal

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1 - Cloroplasto e organização do tilacóide.....	21
Figura 2 - Reações da fotossíntese	22
Figura 3 - A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na maquinaria fotossintética na membrana do tilacóide	26
Figura 4 - Rota da fotorrespiração.....	30
Figura 5 - Modelo da organização estrutural da cadeia fotossintética nas configurações de transporte de elétrons linear e cíclico	31
Figura 6 - Mecanismos de produção de EROs e danos ao fotosistema II (PSII) pela fotoinibição do lado aceptor e doador	33
Figura 7 - Modelo para a reparação de D1	34

Capítulo II

Figura 1 – Plantas de cajueiro cultivadas sob condições controle (irrigada) e estressante (suspensão da rega) e expostas a uma luz baixa e a uma luz alta em casa de vegetação	56
Figura 2 – Respostas da assimilação de CO ₂ (A) a concentração de CO ₂ intercelular (Ci) de mudas de cajueiro crescidas em condições controle ou submetidas a seca e expostas a uma luz baixa e a uma luz alta	61
Figura 3 - Fotossíntese (A), condutância estomática (B) e transpiração (C) de plantas de cajueiro submetidas aos estresses isolados e combinados de seca e luminosidade elevada.....	63
Figura 4 - Parâmetros de fluorescência da clorofila a: Eficiência quântica potencial do fotosistema II (A), eficiência quântica efetiva.....	65
Figura 5 - Determinações do conteúdo de peróxido de hidrogênio (A) e peroxidação lipídica (B) em plantas de cajueiro submetidas aos estresses isolados e combinados de seca e luminosidade elevada.....	66
Figura 6 – Detecção in situ de peróxido de hidrogênio (A) e de superóxido (B) em folhas de cajueiro expostas aos estresses de seca e alta luminosidade.....	67
Figura 7 - Determinações das atividades enzimáticas de catalase (A), peroxidase do ascorbato (B) e superóxido dismutase (C), de plantas de cajueiro submetidas aos estresses isolados e combinados de seca e alta luminosidade.	68

Capítulo III

- Figura 1** - Desenho experimental utilizado para a exposição das mudas aos efeitos dos estresses de seca e de luminosidade 82
- Figura 2** - As mudas foram expostas a combinação dos estresses de seca e luminosidade elevada, seguido do tratamento de recuperação do estresse luz 83
- Figura 3** - Mudanças eficiência quântica potencial do fotossistema II (Fv/Fm) em mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas ou de estresse hídrico. 89
- Figura 4** - Parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: taxa aparente de transporte de elétrons (A), eficiência quântica efetiva do fotossistema II (B) e coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência (C) de mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas (círculo branco) ou suspensão de rega (círculo preto)..... 90
- Figura 5** - Medidas eficiência quântica potencial do fotossistema II (A), da taxa aparente de transporte de elétrons (B), da eficiência quântica efetiva do fotossistema II (C) e dos coeficientes de extinção fotoquímica (D) e não fotoquímica (E) em mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas (barras brancas) ou de seca (barras pretas)..... 92
- Figura 6** - Mudanças no conteúdo de peróxido de hidrogênio e na intensidade da peroxidação lipídica em folhas de mudas de cajueiro 93
- Figura 7** - Mudanças nos conteúdos de peróxido de hidrogênio e da intensidade da peroxidação de lipídios em folhas de mudas de cajueiro após a recuperação do estresse de luminosidade elevada 93
- Figura 8** - Atividade da enzima catalase (A e B), em folhas de mudas de previamente cajueiro cultivadas sob condições irrigadas (círculo branco) ou sob suspensão da rega (círculo preto) 94
- Figura 9** - Aspectos morfológicos de mudas de cajueiro expostas aos estresses de seca e de luminosidade elevada 95
- Figura 10** - Mudanças do conteúdo relativo de água e do dano de membrana 96
- Figura 11** - Mudanças nos conteúdos de clorofilas *a*, *b* e totais e razão clorofilas *a/b*, e nos conteúdos dos pigmentos carotenóides e antocianinas em mudas de cajueiro 97
- Figura 12** - Conteúdo de glioxilato em mudas de previamente cajueiro cultivadas sob condições irrigadas (círculo branco) ou sob suspensão da rega (círculo preto)..... 98

Capítulo IV

Figura 1 - Desenho experimental utilizado para a exposição das mudas aos efeitos dos estresses de seca e de luminosidade.	112
Figura 2 - Mudanças na fotossíntese líquida, transpiração, condutância estomática e pressão parcial intercelular de CO ₂ em mudas de cajueiro	120
Figura 3 - Eficiência quântica potencial do fotossistema II (A e B) e fluorescência máxima no escuro (C e D) das mudas de cajueiro	121
Figura 4 – Fluorescência mínima (A e B) e fluorescência máxima no escuro (C e D) das mudas de cajueiro	122
Figura 5 - Coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência (A e B) e coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência (C e D) das mudas de cajueiro.....	123
Figura 6 - Taxa aparente de transporte de elétrons (A e B) e eficiência quântica efetiva do fotossistema II (C e D) de mudas de cajueiro.....	124
Figura 7 - <i>Western blot</i> da Rubisco proteína D1 e da plastocianina em mudas de cajueiro cultivadas	125
Figura 8 - Cinética da fluorescência da clorofila <i>a</i> em folhas de mudas de cajueiro..	127
Figura 9 - Parâmetros de regulação do PSI de mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas ou sob suspensão de rega.....	129
Figura 10 - Detecção <i>in situ</i> da formação do radical superóxido em folhas de mudas de cajueiro	130
Figura 11 - Detecção <i>in situ</i> da formação do radical peróxido em folhas de mudas de cajueiro	131
Figura 12 – Atividade da dismutase do superóxido (A) e peroxidase do ascorbato (B) em mudas de cajueiro	132
Figura 13 - <i>Western blot</i> da catalase (A) e determinações das atividades enzimáticas da catalase em gel (B) e <i>in vitro</i> (C) em mudas de cajueiro	133
Figura 14 - Medidas de indicadores da atividade de fotorrespiração	134

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1- Processos de fotoproteção e o tempo de ocorrência..... **27**

Capítulo III

Tabela 1- Análise da fluorescência da clorofila *a* **127**

ATIVIDADE FOTOQUÍMICA E PROTEÇÃO OXIDATIVA EM MUDAS DE CAJUEIRO EXPOSTAS A SECA E LUMINOSIDADE ELEVADA

Autor: Cristina Silva de Lima

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

RESUMO

No presente estudo foram caracterizados mecanismos bioquímicos e fisiológicos decorrentes da fotoinibição e que atuam na modulação da atividade fotoquímica e da proteção oxidativa, auxiliando na redução de danos fotooxidativos, em resposta aos estresses de seca e luminosidade elevada em cajueiro. As mudas foram obtidas a partir de sementes e cultivadas em substrato composto pela mistura de areia e vermiculita (proporção 1:1) em sacos plásticos, com volume de 2 L. O estresse hídrico foi aplicado pela suspensão da rega (± 20 dias) em condições de casa de vegetação. Para a exposição aos tratamentos de luminosidade e de recuperação ao efeito da luz, as plantas foram acondicionadas em câmara com condições controladas de umidade relativa ($60\% \pm 5$) e temperatura ($30^{\circ}\text{C} \pm 2$). As plantas submetidas ao estresse hídrico apresentaram uma intensa redução da fotossíntese quando expostas ao excesso de luz (combinação de seca com luminosidade elevada), se comparadas com aquelas irrigadas. Essa maior sensibilidade da fixação de CO_2 ao excesso de luz nas plantas sob seca foi relacionada com uma maior intensidade de danos no aparato fotoquímico, conforme indicado pelas medidas de eficiência quântica efetiva e taxa aparente de transporte de elétrons. A redução da atividade fotossintética, em resposta ao excesso de luz, foi atribuída em parte ao processo de fotoinibição ocorrido nessas condições, conforme demonstrado pela drástica redução da eficiência quântica potencial máxima do PSII (dada pela relação F_v/F_m). Os resultados sugerem também que a intensa fotoinibição, desencadeada pelo excesso de luz, pode ter auxiliado na fotoproteção, pois nessas condições não ocorreu danos oxidativos, conforme indicado pela ausência de mudanças no conteúdo de H_2O_2 e na peroxidação lipídica (conteúdo de TBARS). Essa proteção fotoquímica, atribuída a fotoinibição nesse estudo, é reforçada devido a não ocorrência de dissipação do excesso de energia por meio do quenching não fotoquímico (NPQ), pois esse mecanismo não apresentou mudanças significativas após longos períodos de exposição ao excesso de luz. No entanto, a dissipação de energia por meio do NPQ em respostas a curtos períodos de exposição ao excesso de luz, aqui observado, indica que

quando a atividade do PSII está normal esse mecanismo é essencial para a proteção fotoquímica. O papel da fotoinibição para a proteção fotooxidativa pode ser atribuído ao efeito desse processo na redução da atividade dos PSII e consequente menor atividade fotoquímica, o que resultaria na menor transferência de elétrons. Essa sugestão é ainda reiterada no presente estudo com base na redução do conteúdo da proteína D1, um dos principais componentes estrutural e funcional do PSII, e da plastocianina (PC), outro importante carreador de elétrons. A modulação do conteúdo dessas proteínas pode ter contribuído para restringir a formação de EROs e consequente danos oxidativos sob condições indutoras de estresse fotooxidativos, como a seca associada com luminosidades elevadas, nessa espécie.

Palavras-chave: Estresses abióticos, estresse fotooxidativo, fotoquímica, fotoproteção, *Anacardium occidentale*

PHOTOCHEMICAL ACTIVITY AND OXIDATIVE PROTECTION IN CASHEW SEEDLINGS EXPOSED TO DROUGHT AND HIGH LIGHT

Author: Cristina Silva de Lima

Adviser: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

ABSTRACT

In this study were characterized biochemical and physiological mechanisms arising from photoinhibition that act in the modulation of photochemical activity and oxidative protection, helping to reduce photo oxidative damage in response to drought and high light stresses in cashew plants. The seedlings were obtained from seeds and grown in substrates by mixing sand and vermiculite (ratio 1:1) in plastic bags, with a volume of 2 liters. Drought stress was imposed by withholding the water supply to the plants (± 20 days) in greenhouse conditions. For exposure to light treatments and recovery to the light effect, the plants were placed in a chamber with controlled conditions of relative humidity ($60\% \pm 5$) and temperature ($30^{\circ}\text{C} \pm 2$). The plants subjected to drought stress showed a marked decrease in photosynthesis when exposed to excess light (combination of drought with high luminosity), compared with those irrigated. This higher sensitivity of CO_2 fixation to excess light on plants under drought was associated with a higher intensity of damage to the photochemical apparatus, as indicated by measures of effective quantum efficiency and apparent electron transport rate. The data show that the reduction of photosynthetic activity in response to excess light, has been attributed in part to process photoinhibition occurred under these conditions as shown by a drastic reduction in potential maximum quantum efficiency of PSII (given by Fv/Fm ratio). The results also suggest that the intense photoinhibition, triggered by excess light, may have assisted in photoprotection, because under these conditions there was no oxidative damage, as indicated by the absence of changes in H_2O_2 content and lipid peroxidation (TBARS content). This photochemistry protection, assigned to photoinhibition in this study, is enhanced due to non-occurrence of dissipation of excess energy through non-photochemical quenching (NPQ), because this mechanism did not show significant changes after long periods of exposure to excessive light. However, the energy dissipation through NPQ in response to short time of exposure to excessive light, observed here indicates that when the PSII activity is normal this mechanism is essential to the protection photochemistry. The role of photoinhibition for photo oxidative protection can be attributed to the effect of this

process on reducing the activity of PSII and consequent lower photochemical activity, resulting in lower electron transfer. This suggestion is also reiterated in this study based on the reduction of the content of D1 protein, a major component of structural and functional PSII, and plastocyanin (PC), another major carrier of electrons. The modulation these proteins content may have contributed to restrict the formation of ROS and consequent oxidative damage under conditions inducing photo oxidatives stress such as drought associated with high luminosities, in this species.

Keywords: Abiotic Stress, photo oxidative stress, photochemistry, photoprotection, *Anacardium occidentale*

SUMÁRIO

Capítulo I	17
1. JUSTIFICATIVA E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1. Respostas fotossintéticas a deficiência hídrica e ao estresse de luminosidade elevada.....	20
2.2. Fluorescência como uma medida da atividade fotossintética.....	24
2.3. Estresse fotooxidativo	25
2.4. Mecanismos celulares de fotoproteção.....	28
2.5. Reparo do sistema FSII e <i>turnover</i> da proteína D1	32
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS	36
Referências	38
Capítulo II	48
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
2.1. <i>Obtenção das mudas e aplicação de tratamentos de seca e de luminosidade elevada em casa de vegetação</i>	55
2.2. Medidas realizadas	57
3. RESULTADOS	61
<i>Alterações fotossintéticas de mudas de cajueiro sob estresses isolados e combinados de seca e de luminosidade elevada</i>	61
<i>Parâmetros fotoquímicos</i>	64
<i>Respostas oxidativas de mudas de cajueiro sob estresses isolados e combinados de seca e de luminosidade elevada</i>	66
4. DISCUSSÃO.....	68
Referências Bibliográficas	71
Capítulo III	74
1. INTRODUÇÃO.....	79
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	81
2.1. Experimentos realizados	81
2.2. Medidas realizadas	84
3. RESULTADOS	88
<i>A alta intensidade de luz acentua a fotoinibição transiente e reduz a atividade do fotossistema II sob condições de deficiência hídrica em mudas de cajueiro</i>	88
<i>Não houve estresse oxidativo em plantas de cajueiro submetidos à seca em exposição a intensidades de luz crescentes.</i>	92
<i>Caracterização morfo-fisiológica indica a susceptibilidade das plantas de cajueiro expostas a seca sob intensidades de luz crescente</i>	94
<i>Fotorrespiração como mecanismo de fotoproteção utilizado pelas mudas de cajueiro submetidas à alta luz</i>	97
4. DISCUSSÃO	98
Referências	101
Capítulo IV	105
1. INTRODUÇÃO.....	110
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	112
2.1. Aplicação dos tratamentos de seca e luminosidade (alta e moderada) em curto intervalo de tempo.....	112
2.2. Medidas realizadas	113
3. RESULTADOS	119
<i>O tempo de exposição à luz per se compromete as trocas gasosas de mudas de cajueiro</i>	119

<i>Respostas da atividade fotoquímica logo nas primeiras horas de exposição à luz alta é crucial para entendimento dos mecanismos de foto-proteção em cajueiro sob deficiência hídrica</i>	120
<i>Padrão de expressão de proteínas associadas com a eficiência fotossintética</i>	124
<i>Fotoinibição no fotossistema I</i>	128
<i>Danos oxidativos em resposta ao aumento da exposição à luz alta</i>	130
<i>Fotorrespiração como mecanismo de foto-proteção utilizado pelas mudas de cajueiro submetidas à luz alta</i>	132
4. DISCUSSÃO	135
CONSIDERAÇÕES FINAIS	139
Referências	140

Capítulo I

Referencial Teórico

1. JUSTIFICATIVA E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Em áreas localizadas em regiões semiáridas predomina uma combinação complexa de fatores de estresses abióticos, envolvendo seca, salinidade, elevada radiação solar e temperaturas relativamente altas (CAVALCANTI et al., 2004; MITLER, 2006). Esses stresses, isolados e principalmente combinados, podem afetar diversos processos bioquímicos e fisiológicos essenciais que comprometem o funcionamento celular (KREPS et al., 2002; RIZHSKY et al., 2004; MITLER, 2006; KOTAK et al., 2007; KANT et al., 2008). O entendimento preciso dos distúrbios metabólicos causados pelos efeitos desses fatores abióticos é essencial para a identificação e caracterização de mecanismos diretamente responsáveis pela resistência e/ou tolerância vegetal contra esses estresses.

Mesmo o ambiente semiárido apresentando condições desfavoráveis para o desempenho vegetal, algumas espécies vegetais são relativamente bem adaptadas ao cultivo nessas áreas. Essas espécies, a exemplo do que ocorre no cajueiro, parecem estar condicionadas a esses fatores limitantes por terem desenvolvido mecanismos genéticos, moleculares e fisiológicos para lidar com essas condições adversas (SILVEIRA et al., 2003). De fato, plantas de cajueiro apresentam bom desenvolvimento quando cultivadas em locais que apresentam restrição hídrica, excesso de salinidade e temperaturas elevadas em diversas áreas do semiárido no Brasil (FERREIRA-SILVA et al., 2008; 2011).

O entendimento de componentes metabólicos responsáveis pela proteção à seca e luminosidade elevada presentes de forma isolada e combinada, condições típicas no semiárido, poderá auxiliar na identificação de metabólitos, proteínas e bem como de genes relacionados com mecanismos de defesa celular. No geral, os mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos envolvidos nas respostas das plantas aos estresses combinados são complexos (KREPS et al., 2002; RIZHSKY et al., 2004; MITLER, 2006; KOTAK et al., 2007; KANT et al., 2008). No entanto, informações claras desses mecanismos são fundamentais para o desenvolvimento de novas estratégias de manipulação genética visando o aumento da resistência das plantas a estresses abióticos (VALLIYODAN e NGUYEN, 2006).

O metabolismo oxidativo é correntemente a área mais promissora da biologia vegetal para investigar redes metabólicas complexas, envolvidas na resposta a estresses ambientais (MITTLER et al., 2004, GECHEV e HILLE, 2005, MØLLER et al.,

2007; ŠLESÁK et al., 2007). Esse consenso é atribuído ao fato de que as mudanças do estado de oxido-redução, no ambiente celular, podem modular uma diversidade de respostas metabólicas, envolvendo principalmente a atividade enzimática e a expressão gênica, podendo levar a uma nova homeostase celular compatível com a resistência (PFANNSCHMIDT, 2003; WAGNER et al., 2008; VASSILIEV e BRUCE; 2008;). No entanto, apesar de o metabolismo oxidativo representar uma rota comum para as vias de sinalização envolvidas com a expressão de genes relacionados com a tolerância a estresses (NEILL et al., 2002), o entendimento preciso destes processos ainda é bastante restrito (MITTLER, 2002 e MITTLER et al., 2004).

Os estresses de luminosidade elevada e de deficiência hídrica podem causar uma acumulação excessiva de espécies reativas de oxigênio na célula vegetal, podendo levar a expressivos danos oxidativos (BJÖRKMAN e POWLES, 1984). Esses fatores podem ainda interagir de forma negativa quando presentes simultaneamente, em função do excesso de radiação poder intensificar os danos oxidativos causados pelo estresse hídrico (BJÖRKMAN et al., 1980). Nas plantas submetidas à deficiência hídrica há uma diminuição da atividade fotossintética causada, em grande parte, pela restrição estomática, devido a limitação do influxo de CO₂ para o mesófilo foliar (CORNIC, 2000; CHAVES et al., 2003). Nessas condições, o excesso de luz pode causar uma super redução dos sistema de carreamento de elétrons nos cloroplastos, potencializando a geração de danos oxidativos (NISHIYAMA et al., 2006).

Estudos tem demonstrado que a combinação dos estresses de baixa umidade relativa e luz elevada predispõem as plantas à fotoinibição, levando a redução da fixação de CO₂, podendo levar à danos oxidativos e morte celular (CHAVES e OLIVEIRA, 2004). Assim, os estresses hídrico e de luminosidade elevada podem estar diretamente relacionados com a modulação de processos metabólicos vitais na célula, como a fotossíntese e distúrbios oxidativos. Dessa forma, espécies que apresentam relativa aclimação a ambientes onde predominam esses fatores, como o cajueiro, podem representar modelos de estudo capazes de apresentar respostas metabólicas compatíveis com a proteção celular nessas condições. Ainda mais elucidativos, podem ser estudos que utilizam essas espécies quando expostas a aplicação simultânea de dois estresses interativos (como seca e excesso de luz), os quais podem contribuir para o entendimento dos danos metabólicos que comprometem o desempenho vegetal no semiárido.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Respostas fotossintéticas a deficiência hídrica e ao estresse de luminosidade elevada

A fotossíntese é composta de dois diferentes processos: etapa fotoquímica e de fixação de carbono. A fixação de carbono requer a energia do ATP e equivalentes redutores NADPH gerados pelas reações fotoquímicas. Esta consiste de uma série de etapas realizadas por quatro complexos proteicos localizados na membrana do tilacóide, incluindo dois fotossistemas (FSs), um complexo citocromo b_6f e uma sintase do ATP (NELSON e BEN-SHEM, 2004; NELSON e YOCUM, 2006) (Figura 1). Os fótons absorvidos pelos complexos antena de cada FS é convertido em energia de excitação, que é necessária para induzir a separação de cargas no centro de reação (VASSILIEV e BRUCE, 2008; MUH et al., 2012). A separação de carga dirige o transporte de elétrons entre os dois fotossistemas para gerar NADPH e ATP no processo (NELSON e BEN-SHEM, 2004). Os quatro supercomplexos nas membranas do tilacóide, cooperam em série, para realizar a reação fotoquímica (ANDERSSON e ANDERSON, 1980; KOURIL et al., 2012; NEVO et al., 2012) (Figura 2).

As plantas crescem sob contínuas mudanças das intensidades de luz, dessa forma a luz é o fator ambiental mais dominante na regulação das atividades fotossintéticas (NISHIYAMA et al., 2001; VASS, 2012). Aliás, a fotossíntese é o primeiro alvo fisiológico de outros estresses ambientais: salinidade, altas temperaturas e seca (MUNNS e TESTER, 2008; LIU e HUANG, 2008; CHAVES et al. 2009). O estresse hídrico induz muitas respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares em que a fotossíntese é bastante afetada (CHAVES et al., 2009). Contudo, há uma antiga controvérsia se o estresse hídrico primariamente limita a fotossíntese pelo fechamento estomático (CHAVES et al., 2009), através da reduzida condutância do mesófilo (MASSACCI e LORETO, 2001; CENTRITTO et al., 2003; FLEXAS et al., 2004) ou pelo prejuízo metabólico (BOYER, 1976; LAWLOR, 1995).

Geralmente, durante o início do estresse hídrico, a limitação estomática é responsável pelo declínio da fotossíntese (CHAVES, 1991; CORNIC, 2000). Com o progresso do estresse hídrico e desidratação do tecido, ocorre um prejuízo metabólico gradual (KAISER, 1987), incluindo a limitação da fotofosforilação (YOUNIS et al., 1979; TEZARA et al., 1999), regeneração da Ribulose 1-5 bifosfato (RuBP)

(GIMENEZ et al., 1992; GUNASEKERA e BWEKOWITZ, 1993), e atividade da Rubisco (MAROCO et al., 2002; PARRY et al., 2002).

Embora respostas das plantas ao estresse hídrico sejam relativamente bem conhecidas, o desempenho vegetal sob um ambiente mais complexo onde os estresses são múltiplos é fragmentado. Isto é devido, pelo menos em parte, ao fato de que as respostas vegetais a estresses simultâneos (seca, luz excessiva e calor) que podem ter ocorrência comum no campo geralmente não são inferidas de estudos de fatores individuais (MITLER, 2002). Por exemplo, plantas frequentemente absorvem mais energia luminosa do que elas necessitam para fotossíntese sob estas condições de estresse. Nesse caso a capacidade das reações que convertem energia solar em energia química é limitada e esse distúrbio na captação da energia luminosa pode gerar um desequilíbrio na produção de NADPH e ATP e as reações de fixação de carbono da fotossíntese, além de reforçar a inativação do FSII quando as plantas estão submetidas à condição de deficiência hídrica (BJORKMAN e POWLES, 1984; VALLADARES e PEARCY, 1997).

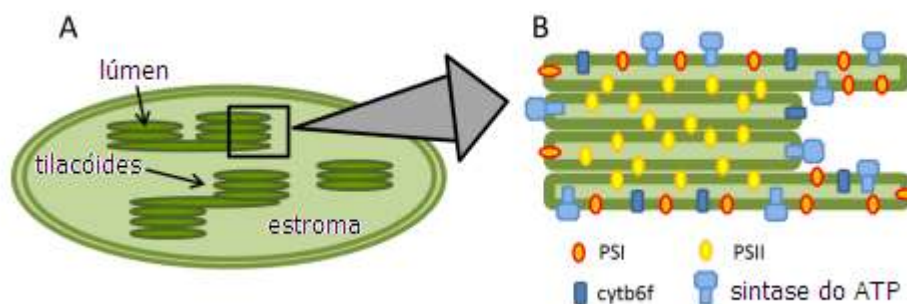


Figura 1. Cloroplasto e organização do tilacóide. Figura esquemática da organização A) dos tilacóides no cloroplasto e B) das proteínas membranares fotossintéticas na membrana do tilacóide. Modelo modificado por Dekker e Boekema 2005.

Nessas condições, em que ocorre excesso de absorção da energia luminosa, há acúmulo de energia de excitação nos cloroplastos a qual pode causar danos aos centros de reações dos fotossistemas (GUO et al, 2007). Esses danos podem levar a foto-inibição, o que corresponde a um processo fisiológico caracterizado pela redução lenta e reversível da atividade fotossintética, como resultado da exposição à radiação excessiva (LONG et al., 1994; LI et al., 2009).

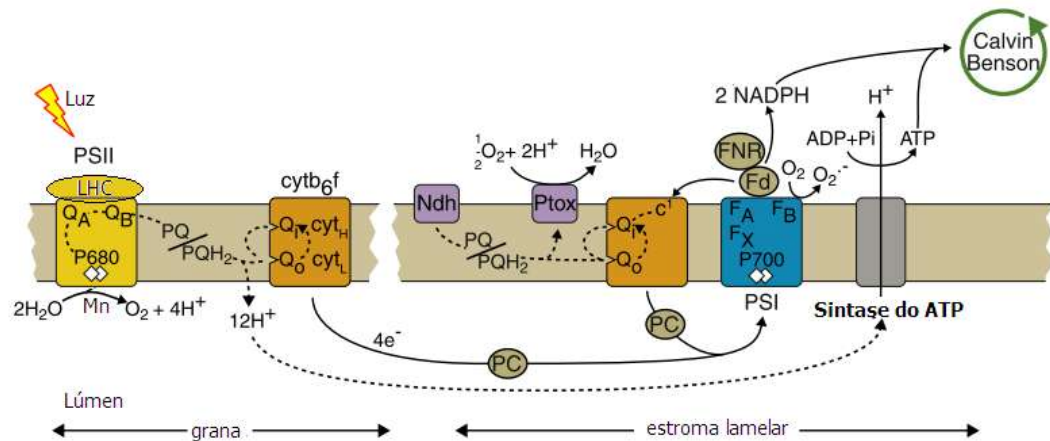


Figura 2. Reações na fotossíntese. A fotossíntese se inicia com excitação das clorofilas no complexo coletor de luz II (LHC). A energia é transferida para o centro de reação do fotossistema II. Ao mesmo tempo, uma molécula de água ligada ao FSII no lado do lúmen da membrana é oxidada no *cluster* de manganês (Mn). Um elétron é excitado e um próton (H^+) é liberado. FSII encaminha o elétron excitado através do *pool* de plastoquinona (PQ), citocromo *b₆f* e plastocianina ao FSI onde o elétron é novamente excitado. Através de ferredoxina (Fd) e ferredoxina NADP⁺ redutase (FNR) o elétron e um próton formam NADPH. Este transporte de elétrons também resulta em um gradiente de próton, o que leva a sintase do ATP, a formar ATP. (Rochaix, 2011).

Quando células fotossintéticas são expostas a luz em qualquer intensidade ocorrem dois fenômenos, nomeados, inativação do FSII induzida pela luz (fotodano ou fotoinativação) e reparo do FSII fotodanificado. A extensão da fotoinibição do FSII depende do balanço entre fotodano e a taxa de reparo. A taxa do fotodano e a taxa de reparo do FSII são relacionadas com a intensidade de luz incidente. Sob intensidades de luz de aproximadamente 50 a $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a taxa de reparo é muito maior que a taxa do fotodano, para a maioria das plantas C_3 . Quase todo FSII esta na forma ativa, o grau de fotoinibição, ou seja, o nível de FSII inativo é baixo. Sob intensidade de luz de aproximadamente $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a taxa de fotodano é maior que a taxa de reparo. A $900 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a taxa de fotodano e reparo são balanceadas, onde aproximadamente metade do FSII é inativo e a extensão da fotoinibição é aproximadamente 50% (MURATA et al., 2012).

Como os níveis de radiação não só variam entre diferentes habitats, mas também flutuam ao longo do dia e ao longo do ano, as plantas adquiriram diversas habilidades para se adaptar a diferentes intensidades de luz (SUORSA et al., 2012). Há ajustes a nível morfológico e anatômico, bem como a nível celular e subcelular. Esses ajustes podem ser divididos em respostas de curto ou longo prazo, que ocorrem em escalas de tempo de segundos e minutos até vários dias, respectivamente (BAILEY et al., 2004; DIETZEL e PFANNSCHMIDT, 2008). Tradicionalmente, as respostas de curto prazo

incluem: (1) a dissipação do excesso de energia luminosa como calor, que é um componente da dissipação não fotoquímica (NPQ) (HORTON et al., 1996; MÜLLER et al., 2001); e (2) estado de transição, em que a quinase de estado de transição⁷ (STN7) catalisa a fosforilação no complexo coletor de luz II (LHCII), que transfere energia de excitação não apenas para o FSII mas também para o FSI (ALLEN e FORSBERG, 2001).

Contrariamente, respostas de longo prazo à luz, surgem de mudanças na expressão gênica, alterando as quantidades e estequiometria das proteínas fotossintéticas e complexos proteicos (PFANNSCHMIDT, 2003; WAGNER et al., 2008). Outras respostas de aclimação a luz incluem movimento das folhas e do cloroplasto e alterações no grau do empilhamento granal (ANDERSON e ARO, 1994), assim como na espessura das cutículas e camadas de tricomas. Isso ocorre porque todo o corpo de uma espécie de planta está adaptado para o macroclima predominante em seu habitat natural. O tamanho, o número total e o arranjo das folhas estão adaptados ao ambiente de luz. Plantas crescidas em regiões de limitação de luz desenvolvem folhas grandes para recolher o máximo de luz. Em regiões com alta incidência luminosa as plantas desenvolvem pequenas folhas, dispostas de modo que o sombreamento mútuo ocorra. Algumas plantas parecem ter evoluído a capacidade de alterar o ângulo das folhas, a fim de ajustar a superfície que é exposta à luz (KOLLER, 1990).

Dentre os ajustes em um nível celular, espécies-específicas, podemos citar: mudança na arquitetura das folhas, a maneira como as células são reunidas, bem como a proporção de mesófilo paliçádico e esponjoso. Também as propriedades da epiderme e da cutícula, como a presença de pêlos, ceras ou o número de estômatos influencia a quantidade de luz absorvida pela planta (BUCHANAN et al., 2000). A nível subcelular o número total de cloroplastos e a orientação deles (HAUPT, 1990) e o empacotamento da membrana do tilacóide (cloroplasto sombreados) ou pequenos granos (cloroplasto ensolarados) podem ser adaptados (LICHTENTHALER et al., 1981). Muitas respostas a intensidades variáveis de luz acontecem a nível molecular e bioquímico. A composição de proteínas e outros compostos são constantemente arranjados para maximizar o desempenho fotossintético e o desenvolvimento em geral (DEMMIG-ADAMS e ADAMS, 1992).

2.2. Fluorescência como uma medida da atividade fotossintética

O processo de absorção de luz pelos pigmentos fornece um modo de determinação do desempenho fotossintético. Clorofilas ou outros pigmentos absorvem a luz e as transmitem para os centros de reação. Principalmente clorofila *a* constitui a antena, mas, isto pode variar com as espécies. Se o excesso de radiação age sobre os pigmentos, pode não haver centros de reação abertos o suficiente para capturar toda a excitação fornecida e mais energia deverá ser dissipada como calor ou fluorescência (FALKOWSKI e RAVEN, 1997). Em 1931, Kautsky descobriu que a iluminação de uma folha adaptada ao escuro, origina um aumento rápido na fluorescência, seguido de um lento declínio - o efeito de Kautsky (GOVINDJEE, 1995).

Os centros de reação estão abertos, se eles são capazes de utilizar a energia de um fóton absorvido para transferir um elétron para plastoquinona. Quando a plastoquinona é reduzida, os fótons que chegam ao centro de reação não podem ser utilizados até que o próximo aceptor receba o elétron, reoxidando a plastoquinona. Nesta situação, os centros de reação encontram-se fechados e nesse caso, mais fótons são reemitidos como fluorescência (RUBAN e JOHNSON, 2010).

Todos os centros de reação são abertos quando as células são adaptadas ao escuro. Na fluorometria modulada, um pulso saturante de luz é usado para fechar todos os centros de reação rapidamente, e a F_m , fluorescência máxima, é obtida. F_0 é a fluorescência mínima constante no escuro quando todos centros de reação estão abertos (RUBAN e JOHNSON, 2010) e fluorescência variável, F_v é o valor de fluorescência que resulta da subtração do F_0 a partir de F_m (KOOTEN e SNEL, 1990). O máximo rendimento quântico potencial do fotossistema II é dada pela razão F_v/F_m , medido em material adaptado ao escuro.

Se o aparelho fotossintético é submetido a uma dada intensidade de luz actínica, a fluorescência basal é denotada como F_0' (fluorescência mínima de um aparelho fotossintético adaptado a uma dada intensidade de luz actínica), e um pulso de saturação na mesma intensidade de luz actínica determina F_m' , o máximo de fluorescência em dadas condições de adaptação à luz (CARTAXANA e SERÔDIO, 2008), alterando consequentemente F_v' .

Em folhas adaptadas à luz, o rendimento quântico efetivo do fotossistema II é dado pelo produto do rendimento quântico dos centros reacionais do fotossistema II adaptado à luz pelo coeficiente de extinção fotoquímica, qP , que representa a fração dos

centros reacionais abertos do FSII. Curvas rápidas de luz (RLCs) proporcionam ainda uma estimativa da eficiência fotossintética (α), a capacidade, dada pelas taxas máximas de transporte de elétrons relativos (ETR m) e do índice de saturação de luz (E_k) (WHITE e CRITCHLEY, 1999; SERÔDIO et al, 2006; BELSHE et al, 2007), através da construção de curvas que relacionam a intensidade PAR e ETR observadas, e mais tarde com o ETR esperado (PLATT e JASSBY, 1976). Como tal, os rendimentos podem ser utilizados para estimar a atividade fotossintética de cloroplastos em qualquer intensidade de luz dada, e em diferentes condições estressantes.

2.3. Estresse fotooxidativo

Além do fotodano aos centros de reações, a exposição a forte radiância causa superexcitação do aparato fotossintético que induz a produção de perigosas espécies reativas de oxigênio (EROs) (NISHIYAMA et al., 2001; VASS, 2012). Quando as plantas absorvem mais luz do que elas podem usar pela fotoquímica há um excesso de entrada de elétrons do complexo de evolução do oxigênio sobre a saída de elétrons via redução de CO_2 nas reações do ciclo de Calvin. Isto leva a acumulação de elétrons dentro da maquinaria fotossintética. Em paralelo, a pressão parcial de O_2 é crescente devido aos altos níveis de clivagem da água. Sob condições de alta luz, contudo, o relaxamento do estado de energia de um composto específico ocorre muito mais lentamente porque a cadeia de transporte de elétrons está sobrecarregada, assim aumentando a probabilidade de transferência de energia para o O_2 (NIYOGI, 1999). Nestas circunstâncias, quantidades consideráveis de energia são transferida das clorofilas ao O_2 , e com isto altos níveis de EROs são formados (NISHIYAMA et al., 2006) (Figura 3).

As EROs mais proeminentes são os radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), os radicais perhidroxila (HO_2^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxil (OH^{\bullet}) e o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). O $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e OH^{\bullet} são produzidos como resultado do transporte de elétrons, enquanto o $^1\text{O}_2$ é produzido como resultado da transferência de energia de excitação (ASADA, 1999). Particularmente H_2O_2 pode facilmente passar as membranas biológicas e causar danos às células (KRIEGER-LISZKAY, 2005; VAN BREUSEGEN e DAT, 2006). Além disso, quando a disponibilidade de $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ for essencialmente reduzida, o lado aceptor do FSI e a ferredoxina podem reduzir

diretamente o oxigênio molecular (MEHLER, 1951), formando $O_2^{\bullet-}$ que é processado a H_2O_2 pela dismutase do superóxido (SOD) (ASADA, 2006). O peróxido de hidrogênio, por sua vez pode ser transformado em OH^{\bullet} e OH^- por ligantes de metais reduzidos (reação de Fenton) como o ferro-enxofre (MITLER, 2002). Assim, nas organelas e membranas celulares o dano oxidativo pode se propagar rapidamente, desencadeando reações em cadeia geradoras de radicais peroxil (ROO^{\bullet}), particularmente em membranas enriquecidas com ácidos graxos insaturados, tais como tilacóides ou membrana plasmática (NIYOG, 1999).

Sendo a principal fonte de formação de EROs, a maquinaria fotossintética é também a estrutura mais suscetível de ser danificada pelo excesso de radiação. O alvo principal de dano fotooxidativo é o fotossistema II (FSII), especialmente a proteína do seu centro de reação D1, que está ligada a maioria dos cofatores envolvidos na separação de carga e transporte de elétrons (BARBER e ANDERSON, 1992; ARO et al., 1993; YAMAMOTO et al., 2008). O dano oxidativo a qualquer parte dos fotossistemas diminui a eficiência e a taxa máxima de fotossíntese, um processo chamado de fotoxidação ou fotoinibição (KOK, 1956; MATSUBAR e CHOW, 2004).

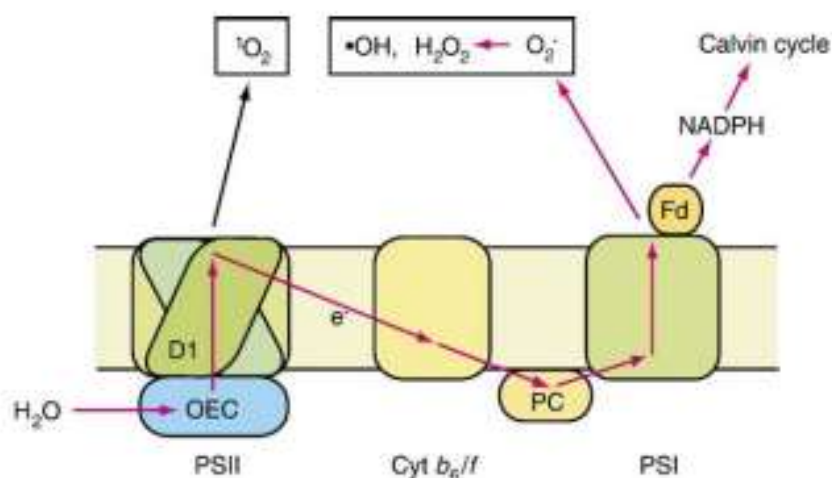


Figura 3. A produção de EROs na membrana do tilacóide. A produção de EROs é aumentada pela luz forte e também pela desaceleração do ciclo de Calvin. As setas vermelhas indicam transporte de elétrons e a seta preta indica a transferência de excitação de energia. Fd, Ferredoxina; OEC, Complexo Evolução do Oxigênio; PC, Plastocianina (NISHIYAMA et al., 2006).

Para evitar formação massiva de radicais livres, as plantas desenvolveram vários mecanismos para prevenir ou reduzir danos oxidativos durante a exposição à luminosidade elevada. Eles incluem várias vias alternativas de dissipação de energia (Tabela 1) e múltiplos sistemas antioxidantes (JALEEL et al., 2009).

Tabela 1. Processos de fotoproteção e tempo de ocorrência

Processo	Método de proteção	Intervalo de tempo
<i>Movimento folha/cloroplasto</i>	<i>Fuga da luz</i>	<i>Minutos-horas- dias</i>
<i>Redução do tamanho da antena</i>	<i>Fuga da luz</i>	<i>Horas-dias</i>
<i>Estado de transição</i>	<i>Balanceamento</i>	<i>Minutos</i>
<i>Ciclo das xantofilas</i>	<i>Dissipação de calor</i>	<i>Minutos</i>

Entretanto, essas estratégias não são totalmente eficientes e ocorre a formação de EROs. Assim, o sistema antioxidativo é sempre ativo, visto que, tanto o transporte de elétrons fotossintéticos como o respiratório mitocondrial tem um vazamento basal de EROs (ZHANG et al., 2011; FOYER et al., 2012). Cerca de 5% dos elétrons são transferidos ao oxigênio também sob condição ambiente (SCHOPFER e BRENNICKE, 1999). A eliminação das EROs é realizada através de diferentes enzimas e alguns antioxidantes de baixo peso molecular, tais como ascorbato (vitamina C), glutatona e α -tocoferol (vitamina E) (ASADA, 2006; JALEEL et al., 2009).

Duas enzimas desempenham um papel importante na desintoxicação de EROs no cloroplasto: a dismutase do superóxido (SOD), a qual catalisa a reação de $2 O_2^{\bullet -}$ e $2 H^+$ a O_2 e H_2O_2 , e a peroxidase do ascorbato (APX), a qual oxida 2 moléculas de ascorbato para reduzir H_2O_2 para $2 H_2O$ (IVANOV, 1998). O ascorbato é restaurado pela reação espontânea de 2 moléculas de monodeidroascorbato a deidroascorbato e ascorbato. Deidroascorbato é reduzido para o ácido ascórbico pela redutase do deidroascorbato, que se oxida e condensa 2 moléculas de glutatona nesta reação. As glutatonas oxidadas são reduzidas pela redutase da glutatona, que usa NADPH como doador de elétrons que reduz o *pool* de NADPH, possibilitando a passagem normal de elétrons pela CTE (MASTROPASQUA et al., 2012).

Outra enzima antioxidante, desta vez responsável pela desintoxicação de EROs nos peroxissomos é a catalase que converte $2 H_2O_2$ a $2 O_2$ e H_2O (ASADA, 2006). Além das enzimas, temos outras moléculas antioxidantes como o α -tocoferol, que é integrado às membranas fotossintéticas e fornece proteção contra oxidação lipídica (HAVAUX et al., 2005), e os carotenóides (vitamina A), que têm um papel importante como antioxidante em membranas (WOITSCH e RÖMER, 2005).

Aliás, os carotenóides presentes nos complexos antena são considerados a primeira linha de defesa das plantas contra toxicidade do oxigênio singlete (1O_2) devido

à sua capacidade para extinguir $^1\text{O}_2$ e clorofilas tripleto através de dois mecanismos, um físico e um químico. O primeiro envolve a transferência da energia de excitação seguida por dissipação na forma de calor e o segundo envolve a reação química com o $^1\text{O}_2$ (EDGE et al., 1997; NOCTOR e FOYER, 1998; STAHL e SIES, 2003; TRIANTAPHYLIDÈS e HAVAUX, 2009). O mecanismo químico de extinção do $^1\text{O}_2$ com os carotenóides é uma reação secundária de menor importância se comparado com o mecanismo físico (EDGE et al., 1997; STAHL e SIES, 2003).

O papel desses antioxidantes na proteção do FSII da fotoinibição sempre ficou demonstrado em pesquisas anteriores, mas faltava determinar se eles afetavam diretamente o fotodano ou o reparo do FSII fotodanificado. O monitoramento da taxa de fotodano e da taxa de reparo separadamente e exame dos respectivos efeitos dos vários distúrbios nos dois processos, permitiu a indicação de que mais do que proteção do FSII ao fotodano, os antioxidantes estimulam a síntese de proteínas, com reparação resultante do FSII e mitigação de fotoinibição. (MURATA et al. 2012).

2.4. Mecanismos celulares de fotoproteção

Para proteger o cloroplasto do dano de energia luminosa excedente durante o estresse hídrico, as plantas desenvolveram mecanismos de tolerância para eliminá-los rapidamente. Acredita-se que a dissipação térmica da energia luminosa, absorvida em excesso (medida como dissipação não fotoquímica, NPQ) pelo complexo antena coletor de luz do FSII, seja um dos mais importantes mecanismos regulatórios ativadas rapidamente (HOLT et al., 2004; HORTON et al., 2005; LAVAUD e KROTH, 2006). Em plantas superiores, NPQ é acionado pela formação de um gradiente de prótons trans-tilacóide (ΔpH) dirigido pela luz, em que ambos, a protonação do complexo antena coletor de luz e a produção de xantofilas de-epoxidadas estão envolvidas (LAVAUD e KROTH, 2006).

Estes mecanismos de dissipação de energia são indicados por declínios na fluorescência da clorofila *a*, traduzidos pelos coeficientes de extinção da fluorescência, (coeficiente de extinção fotoquímico, qP e coeficiente de extinção não fotoquímico, qN) mensuráveis com fluorímetros de luz modulada. Então, os efeitos dos fatores climáticos ou regimes hídricos no desempenho fotossintético das plantas podem ser rapidamente avaliados pela medição da fluorescência da clorofila, que é um método não invasivo e não destrutivo (BAKER, 2008). Este método tem sido frequentemente usado como um

potencial indicador de estresse ambiental e como um método de seleção de plantas resistentes a esses estresses (GUO et al., 2005). Os rendimentos quânticos: i) do FSII ($\Delta F/F_m'$), ii) da dissipação de energia regulada (YNPQ), e iii) da dissipação de energia não regulada (YNO), que descrevem o destino da energia no FSII, dão indicações sobre a capacidade das plantas de se defrontarem com o excesso de energia de excitação (KLUGHAMMER e SCHREIBER, 2008).

Uma das formas de aliviar a pressão de excitação sobre os fotossistemas é o ajustamento do tamanho da antena de coleta. Por mecanismos que são principalmente baseados em regulação por retroalimentação, o tamanho da antena pode ser aumentado se as taxas da fotossíntese são limitadas pela absorção de luz ou diminuídas durante períodos de excesso de luz (NIYOGI, 1999). O tamanho básico da antena é determinado em longo prazo pela aclimação a flutuações de luz dos habitats das plantas e é regulada pelos níveis de expressão do gene *lhc* e/ou degradação da proteína Lhc (LINDAHL et al., 1995). Em curto prazo alterações dos complexos antena são destacadas e redistribuídas no interior da membrana do tilacóide num processo denominado de estado de transição. Este processo é controlado pelo estado redox do *pool* de plastoquinona (ALLEN, 2003). Em condições fotoinibitórias o *pool* de plastoquinona é reduzido. Isso ativa a quinase que especificamente fosforila proteínas periféricas LhcII, que, posteriormente, perdem o contato com o complexo nuclear de FSII e são redirecionados e ligados ao complexo nuclear de FSI (ALLEN, 1995). Enquanto a redução do tamanho da antena do FSII diminui a pressão de excitação em FSII, ainda esta sendo discutido de forma controversa, se a transferência para o FSI está contribuindo para fotoproteção. Por um lado, a passagem do fluxo de energia de excitação para FSI está proporcionando um melhor fluxo de elétrons através do FSII. Por outro lado, há resultados que indicam que o sistema de quinase parece ser inativado sob condições de estresse de luz (RINTAMÄKI et al., 1997).

Outra estratégia de fotoproteção é drenar as altas taxas de transporte de elétrons através da cadeia transportadora de elétrons em condições fotoinibitórias (TAKAHASHI et al., 2009). Nisto, os prolongados períodos de meia-vida de estados de alta energia de cofatores fotossintéticos são reduzidos e menos energia pode ser transferida para o oxigênio, logo, menos radicais são formados. A dissipação de elétrons dos fotossistemas sobrecarregados pode ser alcançada através do aumento da função oxigenase da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco). Nesse processo, chamado fotorrespiração, glicolato-2-fosfato é produzido e posteriormente metabolizado

na via fotorrespiratória para formar o intermediário glicerato-3-fosfato do ciclo de Calvin. Durante este processo metabólico, CO_2 e NH_3 são produzidos e ATP e equivalentes redutores são consumidos (Figura 4) (FOYER et al., 2009). Embora isto leve a uma redução das taxas de assimilação de CO_2 fotossintética, precisamente essa ineficiência pode servir como dreno de energia e prevenir a fotoinibição. (WINGLER et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2007).

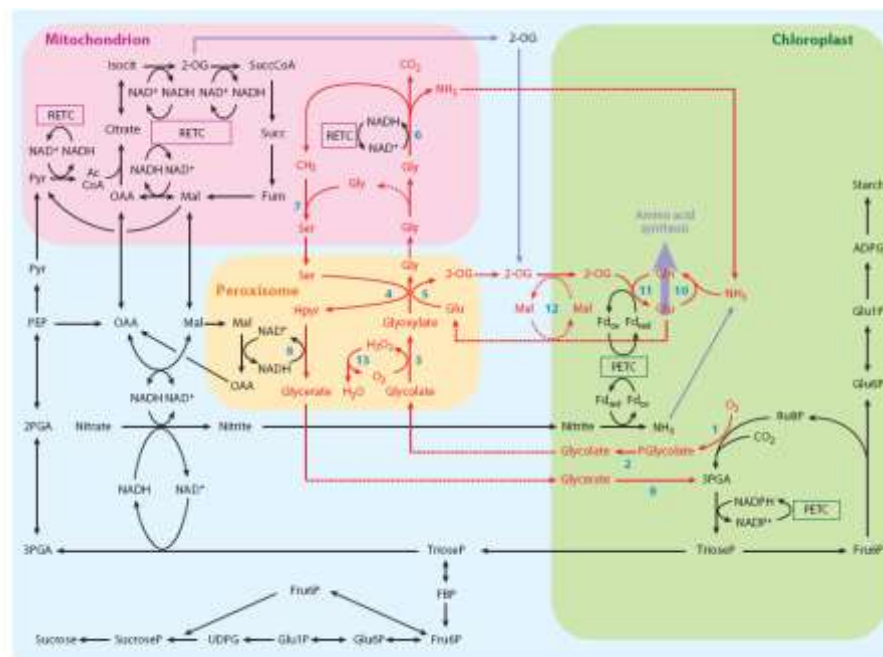


Figura 4. Rota da fotorrespiração. 1- Rubisco; 2- Fosfoglicolato fosfatase; 3- glicolato oxidase; 4-serina: glioxilato aminotransferase; 5- glutamato:glioxilato aminotransferase; 6-glicina descarboxilase; 7-serina hidroximetil transferase; 8-redutase do hidroxipiruvato; 9- quinase do glicerato; 10- sintetase da glutamina; 11- sintetase do glutamato; 12-trocadores dicarboxilato; 13-catalase. (Foyer, 2009).

Outro caminho dependente de oxigênio para manter o fluxo de elétrons sob condições fotoinibitórias é referido como transporte de elétrons pseudocíclico ou ciclo água-água. Este processo se utiliza da elevada eficiência das enzimas de desintoxicação das EROs, geradas no lado aceptor de FSI através da reação Mehler (MEHLER, 1951). Durante o processo, superóxido está sendo processado a H_2O_2 através da SOD seguido pela formação de água pela peroxidase do ascorbato. O ascorbato oxidado durante esta reação está sendo reduzido novamente pela redutase do ascorbato, que oxida duas moléculas de glutathiona. Glutathiona condensada é reduzida por NADPH, que é produzido pelas reações fotoquímicas. Nesta forma, os quatro elétrons obtidos a partir de H_2O são consumidos no final da cadeia de transporte de elétrons através da redução de O_2 para água (ASADA, 1999). Estima-se que este ciclo pode atingir entre 10% e

30% dos níveis normais de transporte lineares de elétrons (BIEHLER e FOCK, 1996; LOVELOCK e WINTER, 1996). Desta maneira a produção controlada de $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 pode ajudar a prevenir a descontrolada formação de EROs.

Duas vias de transporte de elétrons (linear e cíclico) ocorrem nas membranas fotossintéticas onde os elétrons podem ser alternados entre o FSII ou FSI. Acredita-se que este último represente um papel importante na fotoproteção. No lado acceptor do FSI basicamente dois sistemas estão competindo pelo poder redutor da ferredoxina. A energia pode ser utilizada para reduzir $NADP^+$ pela ferredoxina- $NADP^+$ -redutase, ou pode ser oxidado por uma plastoquinona ferredoxina- oxidorredutase (Figura 5) (BENDALL e MANASSE, 1995). Ao entrar no segundo sistema, os elétrons são reintroduzidos no *pool* de plastoquinona de onde podem ser passados até citocromo b_6f e depois voltar para FSI. Desta forma, o transporte cíclico de elétrons não é apenas usado em condições de estresse de luz, mas em todas as condições, quando o ATP adicional é necessário, uma vez que a passagem de elétrons de plastoquinol a FSI é acompanhado pelo transporte de H^+ no lúmen do tilacóide, aumentando a síntese de ATP (HALL e RAO, 1999; JOHNSON, 2011). Enquanto a contribuição do transporte de elétrons cíclico na fotoproteção de FSII ainda não foi bem elucidada, tem sido mostrado que no caso de um *pool* de plastoquinona largamente reduzido, elétrons de alta energia, podem ser transferidos das plastoquinonas e feofitinas para o citocromo b_6f . De lá, eles podem ser retornados para a clorofila, prevenindo assim a formação de clorofila triplete (BARBER e DE LAS RIVAS, 1993; TAKAHASHI et al., 2009).

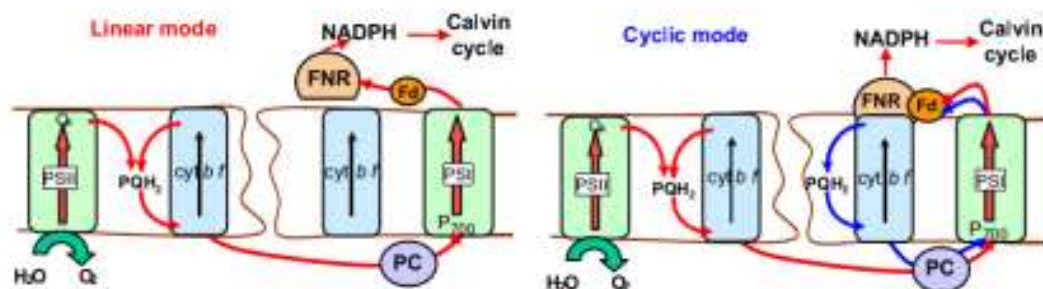


Figura 5. Modelo da organização estrutural da cadeia fotossintética nas configurações de transporte de elétrons linear (esquerda) e cíclico (direita) (Joliot e Johnson, 2011).

2.5. Reparo do sistema FSII e *turnover* da proteína D1

Elétrons que escapam da cadeia transportadora de elétrons estão livres para reagir com o oxigênio e produzir EROs. Formação de EROs pode causar fotoinibição do FSII do lado acceptor ou doador (Figura 6). Do lado doador, a transferência de elétrons de Tyr_Z⁺ para P680⁺ é interrompida e o P680⁺ ou Tyr_Z⁺ altamente oxidantes podem conduzir à oxidação de moléculas vizinhas, tais como pigmentos e aminoácidos ou produzir EROs, tais como superóxido (NAPIWOTZKI et al., 1997). P680⁺ parece ser a principal causa dos danos diretos à proteína D1 no centro de reação, em condições normais de luz (YAMAMOTO, 2001). Por sua vez, na fotoinativação do lado do acceptor, a recombinação do acceptor de elétrons primário Pheo⁻ com P680⁺ podem gerar P680 tripleto, o qual reage com o oxigênio e gera ¹O₂ (YAMAMOTO et al., 2008). Isto acontece por uma redução excessiva de Q_A invertendo o fluxo de elétrons, ou pela recombinação de carga entre os lados doador e acceptor (MURATA et al., 2007). Se Q_A é duplamente reduzido a Q_A²⁻ ou estabilizada por protonação (Q_AH₂), a fotossíntese é também inibida (SARVIKAS et al., 2010). Os elétrons podem também vazar quando são transferidos do acceptor secundário de plastoquinona Q_B ao *pool* de plastoquinonas, originando O₂^{•-} (YAMAMOTO et al., 2008). Estas EROs irão danificar os componentes do FSII, principalmente a proteína D1.

Vários mecanismos estão presentes em plantas para protegê-las da formação de EROs, especialmente em plantas expostas ao estresse ambiental. Apesar destes mecanismos protetores, danos fotooxidativos bem como a fotoinibição são inevitáveis (TAKAHASHI e MURATA, 2008). Este último, por sua vez, resulta em danos com subsequente degradação da proteína D1 conjuntamente com uma diminuição das proteínas do complexo coletor de luz (ARO et al., 1993). As plantas sobrevivem a esta fotoinibição através de um sistema de reparação eficiente, que envolve a degradação da proteína D1 danificada e a sua rápida substituição por uma cópia sintetizada *de novo* (HAUßÜHL et al., 2001; NIXON et al., 2010). A atividade do FSII depende do balanço entre a taxa do fotodano e do seu reparo e a fotoinibição do FSII se torna aparente quando a taxa de fotodano excede a taxa de reparo (TAKAHASHI e MURATA, 2008; NISHIYAMA et al., 2011).

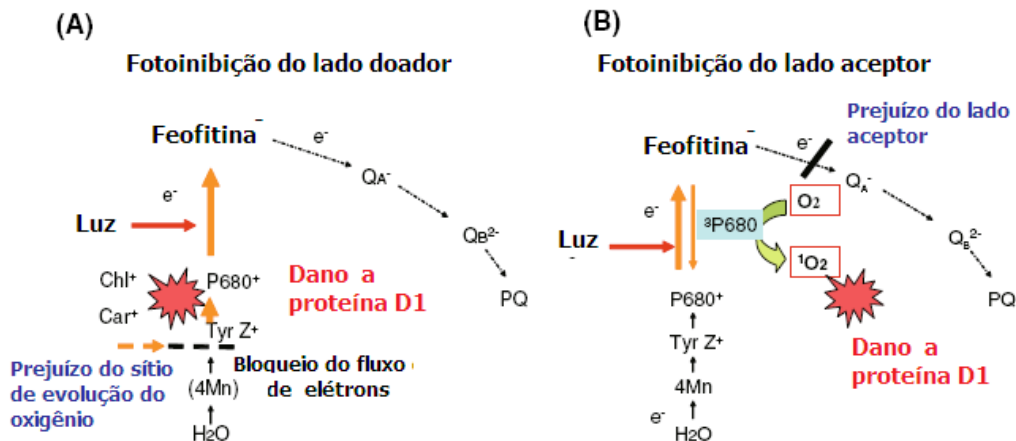


Figura 6. Danos ao FSII pelo fotoinibição do lado receptor e doador. (A) A fotoinibição do lado doador do FSII. (B) Fotoinibição do lado receptor. Na fotoinibição do lado doador, o P680⁺ parece ser a principal causa dos danos diretos à proteína D1 no centro reação FSII, enquanto na fotoinibição do lado receptor, o excesso de luz induz a formação de ¹O₂, que danifica a proteína D1. (Yamamoto et al., 2008).

Tem sido demonstrado que o fotodano é atribuído à absorção de luz diretamente pelo complexo de evolução do oxigênio (Figura 6) (ZHANG et al., 2011). Quando o complexo de evolução do oxigênio é danificado, o suprimento de elétrons para o centro de reação oxidado (P680⁺) é interrompido. Esse forte oxidante pode danificar os aminoácidos próximos, principalmente da proteína D1 (NISHIYAMA et al., 2011). O complexo de evolução do oxigênio danificado possibilita o acesso de moléculas de oxigênio ao P680, com geração resultante de superóxidos e outras EROs que podem causar danos oxidativos aos centros de reação (NISHIYAMA et al., 2006).

Os danos estruturais da proteína D1 podem levar a mudanças de conformação do centro reação do FSII, impedimento de transferência de elétrons e consequente inativação parcial ou total do centro de reação FSII (YAMAMOTO et al., 2008). Danos e reparos da proteína D1 ocorrem simultaneamente sob estresse de luminosidade elevada e seu equilíbrio determina o grau de fotoinibição. Somente quando a taxa de reparo é igual à taxa de danos, é que a fotoinibição pode ser evitada. Por conseguinte, a manutenção do eficiente turnover de proteína D1 é muito importante para proteger o aparelho fotossintético de estresses (NIYOGI, 1999).

O reparo do FSII ocorre via a seguinte sequência de eventos: degradação proteolítica da proteína D1 danificada; síntese de novo do precursor da proteína D1 (pre-D1); inserção do pre-D1 recém-sintetizado na membrana do tilacóide com a

concomitante organização de outros componentes do FSII; maturação da proteína D1 via processamento carboxi-terminal do pre-D1; e organização e reativação do complexo de evolução do oxigênio via o auxílio de várias proteínas, como a Psb27 (Figura 7) (NOWACZYK et al., 2010; NISHIYAMA et al., 2011). Esse mecanismo de retorno eficiente e rápido da D1 mantém a fotossíntese em funcionamento.

A elevada taxa de síntese e de rotação da D1 é resultado da sua atividade constante, uma vez que freqüentemente a proteína D1 sofre dano oxidativo quando catalisa a transferência de elétrons da água para plastoquinona através do cluster Mn (EDELMAN e MATTOO, 2008; KRIEGER-LISZKAY, 2005; LINDAHL et al., 2000). Em condições normais o reparo da D1 é afetado negativamente pelo excesso de produção de EROs. Se as células são expostas demasiadamente a elevada radiação, o ciclo de reparação não pode manter-se e a fotoinibição ocorrerá. A forma como a reparação é conduzida, mesmo em intensidades de luz baixa, permanece sem solução, mas as evidências sugerem que D1 é alvo de degradação através de um sinal, e a tradução de novos polipeptídeos D1 é iniciada. Os polipeptídeos precursores D1 (PD1) são direcionados para os complexos danificados onde eles substituem as D1 degradadas (NIXON et al., 2010).

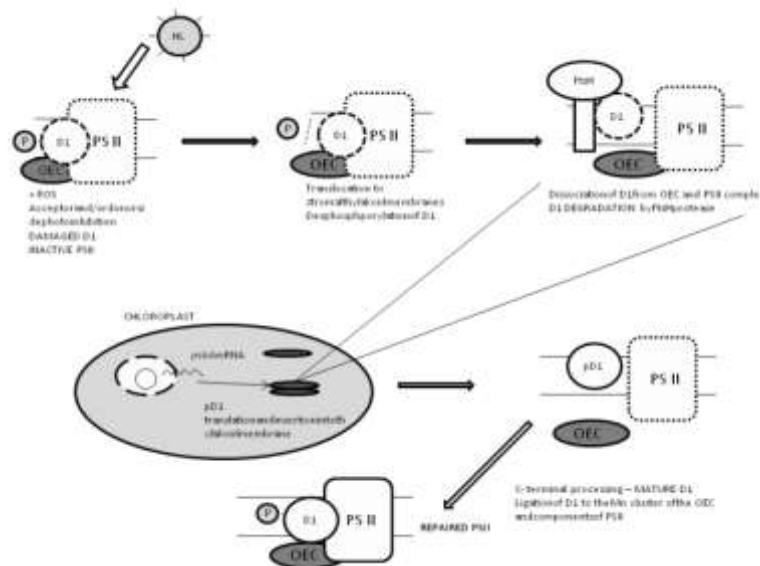


Figura 7. Modelo para a reparação de D1. Durante fotodano, pequenas proteínas tipo CAB (SCPs, ou HLIPS) protegem o complexo do FSII, provavelmente evitando a desfosforilação dos diferentes componentes, incluindo D1, até a chegada ao local de reparação nos tilacóides do estroma. Lá, a proteólise de proteína D1 danificadas nas membranas tilacóides é conduzida por um complexo protease FtsH2 / 3. Uma cópia D1 nova é trazida ao local de reparação e é inserido FSII. Adaptado de Nixon et al. (2010)

Devido a importância da proteína D1, um dos temas principais desta tese foi avaliar o seu papel na proteção ao aparelho fotossintético em plantas de cajueiro submetidas aos estresses de luminosidade elevada e estresse hídrico, visto que dentre os diversos mecanismos desenvolvidos pela planta este provavelmente possa ter contribuído para a prevenção da fotoinibição seja suprimindo o fotodano e/ou aumentando os mecanismos de reparo do FSII danificado.

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

Hipótese:

- ✓ A ocorrência de fotoinibição modula a atividade fotoquímica, restringindo danos fotooxidativos, em respostas aos estresses isolados e combinados de luminosidade elevada e seca em mudas de cajueiro.

Objetivo geral

- ✓ Elucidar mecanismos bioquímicos e fisiológicos decorrentes da fotoinibição que atuam na modulação da atividade fotoquímica e proteção oxidativa, reduzindo danos fotooxidativos, em repostas aos estresses de luminosidade elevada e estresse hídrico em mudas de cajueiro.

Objetivos específicos

1. Induzir o processo de fotoinibição pela exposição ao estresse de luminosidade elevada isolada (até 2000 μmol de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ou combinada com estresse hídrico em mudas de cajueiro;
2. Mensurar parâmetros indicadores da eficiência fotoquímica do FSII (F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$, ETR e NPQ), a partir de medidas de fluorescência da clorofila, em mudas de cajueiro expostas aos estresses hídrico e de luminosidade elevada;
3. Mensurar parâmetros indicadores da eficiência fotoquímica do FSI ($Y(I)$, $Y(\text{NO})$, $Y(\text{NA})$, $Y(\text{ND})$, $Y(\text{NPQ})$, ETRI), a partir de medidas de absorvância do P700, em mudas de cajueiro expostas aos estresses hídrico e de luminosidade elevada;
4. Caracterizar mudanças de trocas gasosas por meio de medidas de fotossíntese (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração interna de CO_2 (C_i) em resposta aos estresses hídrico e de luminosidade elevada em mudas de cajueiro;
5. Demonstrar a ocorrência da fotoinibição com base na redução da P_N e da relação F_v/F_m (eficiência quântica potencial do FSII) em resposta ao estresse de luminosidade elevada isolada ou combinada com estresse hídrico em mudas de cajueiro;
6. Estimar a taxa de assimilação máxima de CO_2 ($P_{N\text{max}}$), a respiração no claro (R_d), a taxa de carboxilação máxima da Rubisco (V_{cmax}) e a taxa de transporte de elétrons máxima (J_{max}), a partir de curvas A- C_i , em mudas de cajueiro expostas aos estresses hídrico e de luminosidade elevada;

7. Verificar a ocorrência de danos oxidativos nos tecidos foliares pela medida dos conteúdos de H_2O_2 e TBARS e pelos coramentos *in situ* do H_2O_2 e do $\text{O}_2^{\bullet-}$, em resposta aos estresses hídrico e luminosidade elevada em mudas de cajueiro;
8. Avaliar o aumento de atividade fotorrespiratória por meio das atividades das enzimas catalase (CAT) e oxidase do glicolato (GO), e conteúdo de glioxilato, em resposta aos estresses hídrico e de luminosidade elevada em mudas de cajueiro;
9. Avaliar mudanças no padrão de expressão das proteínas D1 e plastocianina, visando caracterizar o papel destas na limitação fotoquímica, e de Rubisco, para avaliar a limitação da fixação de CO_2 com o seu conteúdo, sob condições de fotoinibição induzida por estresse hídrico e luminosidade elevada em mudas de cajueiro;
10. Caracterizar as limitações do carreamento de elétrons pelas quinonas (Q_A , Q_B e *pool* de plastoquinonas), pela análise dos transientes O-J-I-P, durante a cinética rápida de indução de fluorescência da clorofila em mudas de cajueiro expostas aos estresses de estresse hídrico e luminosidade elevada;

Referências

- ALLEN, J.F. State transitions—a question of balance. **Science**, 299:1530–1532, 2003.
- ALLEN, J.F.; FORSBERG, J. Molecular recognition in thylakoid structure and function. **Trends Plant Sci.** 6: 317–326, 2001.
- ALLEN, J.F. Thylakoid protein phosphorylation, state 1-state 2 transitions, and photosystem stoichiometry adjustment: redox control at multiple levels of gene expression. **Physiol Plant** 93:196-205, 1995.
- ANDERSON, J.M.; ARO, E.M. Grana stacking and protection of photosystem-II in thylakoid membranes of higher-plant leaves under sustained high irradiance - An hypothesis. **Photosynth. Res.** 41: 315–326, 1994.
- ANDERSSON, B.; ANDERSON, J.M. Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll–protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. **Biochim Biophys Acta**;593:427–40, 1980.
- ARO, E.M.; VIRGIN, I.; ANDERSSON, B. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. **Biochim Biophys Acta** 1143:113-134, 1993.
- 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. 1999.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiol**, 141:391-396, 2006.
- BAILEY, S.; HORTON, P.; WALTERS, R.G. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: The relationship between photosynthetic function and chloroplast composition. **Planta** 218: 793–802, 2004.
- BAKER, N.R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annual Review of Plant Biology** 59: 89-113, 2008.
- BARBER, J.; DE LAS RIVAS, J. A functional model for the role of cytochrome b559 in the protection against donor and acceptor side photoinhibition. **Proc Natl Acad Sci USA** 90:10942-10946, 1993.
- BARBER, J.; ANDERSSON, B. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. **Trends Biochem Sci** 17:61-66, 1992.
- BELSHE, E.F., DURAKO, M.J.,; BLUM, J.E. Photosynthetic rapid light curves (RLC) of *Thalassia testudinum* exhibit diurnal variation. **J Exp Mar Biol Ecol** 342, 253-265, 2007.
- BENDALL, D.S.,; MANASSE, R.S. Cyclic photophosphorylation and electron transport. **Biochim Biophys Acta** 1229:23-38, 1995.
- BERRY, J., BJÖRKMAN, O. Photosynthesis response and adaptation to temperature in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 31, 491–543, 1980.

- BIEHLER, K.; FOCK, H. Evidence for the contribution of the Mehler peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. **Plant Physiol** 112:265-272, 1996.
- BJÖRKMAN, O.; POWLES, S.B. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. **Planta** 161, 490–504, 1984.
- BOYER, J.S. Photosynthesis at low water potentials. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** 273, 501–512, 1976.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1158-1203, 2000.
- CAVALCANTI, F.R.; OLIVEIRA, J.T.A.; MARTINS-MIRANDA, A.S.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G., Superoxide dismutase, catalase and peroxide activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist** 163, 563–571, 2004.
- CARTAXANA, P.; SERÔDIO, J. Inhibiting diatom motility: a new tool for the study of the photophysiology of intertidal microphytobenthic biofilms. **Limnol and Oceanogr: Methods** 6, 11, 2008.
- CENTRITTO, M.; LORETO, F.; CHARTZOULAKIS, K. The use of low [CO₂] to estimate diffusional and non-diffusional limitations of photosynthetic capacity of salt-stressed olive saplings. **Plant, Cell and Environment** 26, 585–594, 2003.
- CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany** 42, 1–16, 1991.
- CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.E; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany** 103: 551–560, 2009.
- CHAVES, M.M.; OLIVEIRA, M.M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany** 55: 2365–2384, 2004.
- CHAVES, M.M., MAROCO, J.P., PEREIRA, J. Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. **Funct. Plant Biol.** 30, 239–264, 2003.
- CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture: not by affecting ATP synthesis. **Trends in Plant Science** 5, 187–188, 2000.
- DEKKER, J.P.; BOEKEMA, E.J. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1706(1-2), 12-39, 2005.
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W.W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 43, 599-626, 1992.

- DIETZEL, L.; PFANNSCHMIDT, T. Photosynthetic acclimation to light gradients in plant stands comes out of shade. **Plant Signaling Behavior**. 3: 1116–1118, 2008.
- EDELMAN, M.; MATTOO, A.K. D1-protein dynamics in photosystem II: the lingering enigma. **Photosynthesis Research** 98, 609-620, 2008.
- EDGE, R.; MCGARVEY, D.J.; TRUSCOTT, T.G. The carotenoids as anti-oxidants— a review. **Journal Photochemistry Photobiology B. Biology** 41: 189–200, 1997.
- FALKOWSKI, P.G.; RAVEN, J.A. Aquatic photosynthesis (USA, Blackwell Science), 1997.
- FERREIRA-SILVA, S.L.; SILVEIRA, J.A.G.; VOIGT, E.L.; SOARES, L.S.P.; VIÉGAS, R.A. Changes in physiological indicators associated with salt tolerance in two contrasting cashew rootstocks. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 20, 51–59, 2008
- FERREIRA-SILVA, S.L.; VOIGT, E. L., SILVA, E. N.; MAIA, J. M.; FONTENELE, A. V; SILVEIRA, J.A.G. High temperature positively modulates oxidative protection in salt-stressed cashew plants. **Environmental and Experimental Botany**, 74 162–170, 2011.
- FLEXAS, J.; BOTA, J.; LORETO, F.; CORNIC, G.; SHARKEY, T.D. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C₃ plants. **Plant Biology** 6, 269–279, 2004.
- FOYER, C.H., BLOOM, A.J., QUEVAL, G., NOCTOR, G. Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. **Annual Review Plant Biology** v. 60, p. 455-484, 2009.
- FOYER, C. H.; NEUKERMANS, J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G.; HARBINSON, J. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. **Journal of experimental botany**, v, 63, p. 1637-61. 2012.
- GECHEV, T.S., HILLE, J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. **The Journal of Cell Biology** 168, 17–20, 2005.
- GIMENEZ, C.; MITCHELL, V.J.; LAWLOR, D.W. Regulation of photosynthesis rate of two sunflower hybrids under water stress. **Plant Physiology** 98, 516–524, 1992.
- GOVINDJEE. Sixty-three years since Kaustky: Chlorophyll a fluorescence. **Australian Journal of Plant Physiology** 22, 131-160, 1995.
- GUNASEKERA, D.; BERKOWITZ, G.A. Use of transgenic plants with Rubisco antisense DNA to evaluate the rate limitation of photosynthesis under water stress. **Plant Physiology** 103, 629–635, 1993.
- GUO, Z.; HUANG, M.; LU, S.; ZHAO YAQING, Z. E.; ZHONG, Q. Differential response to paraquat induced oxidative stress in two rice cultivars on antioxidants and chlorophyll a fluorescence. **Acta Physiology Plant** 29:39–46, 2007.
- GUO D-P., GUO Y-P., ZHAO J-P., LIU H., PENG Y., WANG Q-M., CHEN J-S., RAO G-Z. Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard

- (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. **Plant Science** 168: 57-63, 2005.
- HALL, D.O.; RAO, K. Photosynthesis. **Cambridge University Press**, Cambridge, UK, 1999.
- HAUßUHL K, ANDERSSON B, ADAMSKA I. A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. **EMBO Journal** 20, 713–722, 2001.
- HAUPT, W. Chloroplast movement: from phenomenology to molecular biology. (ed) **Progress in Botany**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 1990.
- HAVAUX, M., EYMERY, F., POFIROVA, S., REY, P., DÖRMANN, P. Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell** 17: 3451–3469, 2005.
- HOLT, N.E.; FLEMING, G.R.; NIYOGI, K.K. Toward an understanding of the mechanism of the non photochemical quenching in green plants. **Biochemistry** 43, 8281–8289, 2004.
- HORTON, P.; WENTWORTH, M.; RUBAN, A. Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes: the LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. **FEBS Letters** 579, 4201–4206, 2005.
- HORTON, P.; RUBAN, A.V.; WALTERS, R.G. . Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **Plant Molecular Biology** 47: 655–684, 1996.
- IVANOV, B.N. Oxygen reduction in chloroplasts and the ascorbate cycle. **Biochemistry (Mosc)** 63:133-138, 1998.
- JALEEL, C. A.; RIADH, K.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; INÈS, J.; AL-JUBURI, H. J.; CHANG-XING, Z. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 31, p. 427–436. 2009.
- JOHNSON, G. N. Reprint of: physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, p. 906–11, 2011.
- JOLIOT, P.; JOHNSON, G. N. Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 13317–22. 2011.
- KAISER, W.M. Effects of water deficit on photosynthetic capacity. **Physiologia Plantarum** 71, 142–149, 1987.
- KANT, P., GORDON, M., KANT, S., ZOLLA, G., DAVYDOV, O., HEIMER, Y.M., CHALIFA-CASPI, V., SHAKED, R., BARAK, S. Functional-genomics-based identification of genes that regulate *Arabidopsis* responses to multiple abiotic stresses. **Plant, Cell and Environment** 31, 697–714, 2008.

- KOK, B. On the inhibition of photosynthesis by intense light. **Biochimica Biophysica Acta** 21:234-244, 1956.
- KOLLER, D. Light-driven leaf movements. **Plant, Cell & Environment** 13:615-632, 1990.
- KOOTEN, O.; SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research** 25, 147-10, 1990 .
- KOTAK, S., LARKINDALE, J., LEE, U., KOSKULL-DORING, P.V., VIERLING, E., SCHARF, K.D. Complexity of the heat stress response in plants. **Current Opinion in Plant Biology**10, 310–316, 2007.
- KOURIL, R.; DEKKER, J.P.; BOEKEMA, E.J. Supramolecular organization of photosystem II in green plants. **Biochimica Biophysica Acta**;1817:2–12, 2012.
- KREPS, J.A., WU, Y., CHANG, H.S., ZHU, T., WANG, X., HARPER, J.F.,. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt osmotic, and cold stress. **Plant Physiology** 130, 2129–2141, 2002.
- KRIEGER-LISZKAY, K. Singlet oxygen production in photosynthesis. **Journal Experimental Botany** 56:337-346, 2005.
- KLUGHAMMER, C.; SCHREIBER, U. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. **PAM Application Notes** 1: 27-35, 2008.
- LAVAUD, J.; KROTH, P.G. In diatoms, the transthylakoid proton gradient regulates the photoprotective non-photochemical fluorescence quenching beyond its control on the xanthophyll cycle. **Plant and Cell Physiology** 47, 1010–1016, 2006.
- LAWLOR, D.W. The effects of water deficit on photosynthesis. In: Smirnoff N, ed. *Environment and plant metabolism. Flexibility and acclimation.* Oxford: **BIOS Scientific Publishers**, 129–160, 1995.
- LAWLOR, D.W., CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant Cell Environment.** 25,275–294, 2002.
- LI, Z., WAKAO, S., FISCHER, B. B. e NIYOGLI, K. K. Sensing and Responding to Excess Light. **The Annual Review of Plant Biology**, 60:239–60, 2009.
- LICHTENTHALER, H.K.; BUSCHMANN, C.; DÖLL, M.; FIETZ, H.J.; BACH, T.; KOZEL, U.; MEIER, D.; RAHMSDORF, U. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. **Photosynthesis Research** 2:115-141, 1981.
- LINDAHL, M.; YANG, D.H.; ANDERSSON, B. Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. **European Journal Biochemistry** 231:503-509, 1995.

LINDAHL, M., SPETEA, C., HUNDAL, T., OPPENHEIM, A.B., ADAM, Z., AND ANDERSSON, B. The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. **Plant Cell** 12, 419-431, 2000.

LIU, X. E.; HUANG, B. Photosynthetic acclimation to high temperatures associated with heat tolerance in creeping bentgrass. **Journal of Plant Physiology**. p1947–1953, 2008.

LONG, S.P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWSI, P.G., Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology** 45, 633–662, 1994.

LOVELOCK, C.E.; WINTER, K. Oxygen-dependent electron transport and protection from photoinhibition in leaves of tropical tree species. **Planta** 198:580-587, 1996.

MAROCO, J.P.; RODRIGUES, M.L.; LOPES, C.; CHAVES, M.M.. Limitations to leaf photosynthesis in field-grown grapevine under drought-metabolic and modelling approaches. **Functional Plant Biology** 29, 451–459, 2002.

MASSACCI, A.; LORETO, F. Diffusive resistances to CO₂ entry in the leaves and their limitations to photosynthesis. In: Pessaraki M, ed. **Handbook of plant and crop physiology**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer, 327–336, 2001.

MASTROPASQUA, L.; BORRACCINO, G.; BIANCO, L.; PACIOLLA, C. Light qualities and dose influence ascorbate pool size in detached oat leaves. **Plant Science**.v.183, p 57-64, 2012.

MATSUBARA, S.; CHOW, W.S. Populations of photoinactivated photosystem II reaction centers characterized by chlorophyll a fluorescence lifetime in vivo. **Proceedings National Academy of Science USA** 01:18234-18239, 2004.

MEHLER, A.H. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. **Archives of Biochemistry** 33:65-77, 1951.

MITTLER, R. Abiotic Stress, the Field Environment and Stress Combination. **Trends Plant Science**. 11, 15-19, 2006.

MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M., BREUSEGEM, F.V. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science** 9, 490–498, 2004.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** 7, 405–410, 2002.

MØLLER, I.M., JENSEN, P.E., HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology** 58, 459–481, 2007.

MÜH, F.; GLÖCKNER, C.; HELLMICH, J.; ZOUNI, A. Light-induced quinone reduction in photosystem II. **Biochimistry Biophysica Acta**;1817:44–65, 2012.

MÜLLER, P.; LI, X.P.; NIYOGI, K.K. . Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. **Plant Physiology**. 125: 1558–1566, 2001.

MUNNS, R. ; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual Review Plant Biology**. 59:651–81, 2008.

MURATA , N. ; ALLAKHVERDIEV , S. I.; NISHIYAMA, Y. The mechanism of photoinhibition in vivo: Re-evaluation of the roles of catalase, α -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. **Biochimica et Biophysica Acta** 1817 1127–1133, 2012.

MURATA, N.; TAKAHASHI, S.; NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1767, p. 414-21. 2007.

NAPIWOTZKI, A., BERGMANN, A., DECKER, K., LEGALL, H., ECKERT, H.J., EICHLER, H.J., AND RENGER, G. Acceptor side photoinhibition in PS II: On the possible effects of the functional integrity of the PS II donor side on photoinhibition of stable charge separation. **Photosynthesis Research** 52, 199-213, 1997.

NEILL, S.T., DESIKAN, R., HANCOCK, R. Hydrogen peroxide signalling. **Current Opinion in Plant Biology** 5, 388–395, 2002.

NELSON N, YOCUM C. Structure and function of PS I and II. **Annual Review of Plant Biology** 57, 521–565, 2006.

NELSON, N.; BEN-SHEM, A. The complex architecture of oxygenic photosynthesis. **Nature Review Molecular Cell Biology**. 5: 971–982, 2004.

NEVO, R.; CHARUVI, D.; TSABARI, O.; REICH, Z. Composition architecture and dynamics of the photosynthetic apparatus in higher plants. **Plant Journal**;70:157–76, 2012.

NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; MURATA, N. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Biochimica Biophys Acta** 1757: 742–749, 2006.

NISHIYAMA, Y.; YAMAMOTO, H.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; INABA, M.; YOKOTA, A.; MURATA, N. Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. **EMBO Journal**, 20:5587–94, 2001.

NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; MURATA, N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Physiology Plant**, v. 142, p. 35–46. 2011.

NIYOGI, K.K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 333-359. 1999.

NIXON, P.J., MICHOUX, F., YU, J., BOEHM, M., AND KO MENDA, J. . Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. **Annals of Botany** 106, 1-16, 2010.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology** 49: 249–279, 1998.

- NOWACZYK, M.M.; SANDER, J.; GRASSE, N.; CORMANN, K.U.; REXROTH, D.; BERNÁT, G.; RÖGNER, M. Dynamics of the cyanobacterial photosynthetic network: communication and modification of membrane protein complexes. **European Journal Cell Biology**, v. 89, p. 974–982, 2010.
- PARRY, M.A.J.; ANDRALOJC, P.J.; KHAN, S.; LEA, P.J.; KEYS, A.J. Rubisco activity: effects of drought stress. **Annals of Botany** 89, 833–839, 2002.
- PFANNSCHMIDT, T. Chloroplast redox signals: How photosynthesis controls its own genes. **Trends Plant Science**. 8: 33–41, 2003.
- PLATT, T.; JASSBY, A.D. The relationship between photosynthesis and light for natural assemblages of coastal marine phytoplankton. **Journal Phycology** 12, 421-430, 1976.
- RADIN, J.W.; ACKERSON, R.C. Does abscisic acid control stomatal closure during water stress? **What's New in Plant Physiology**, Gaithersburg, v. 13, n.1, p 9-12, 1982.
- RAMEL, F.; BIRTIC, S.; CUINÉ, S.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; RAVANAT, Jean-Luc ; HAVAUX, M. Chemical Quenching of Singlet Oxygen by Carotenoids in Plants. **Plant Physiology**, vol. 158, pp. 1267–1278, 2012.
- RINTAMÄKI, E.; SALONEN, M.; SUORANTA, U.M.; CARLBERG, I.; ANDERSSON, B.; ARO, E.M. Phosphorylation of light-harvesting complex II and photosystem II core proteins shows different irradiance-dependent regulation in vivo. Application of phosphothreonine antibodies to analysis of thylakoid phosphoproteins. **Journal Biology Chemistry** 272:30476-30482, 1997.
- RIZHISKY, L., LIANG, H., SHUMAN, J., SHULAEV, V., DAVLETOVA, S., MITTLER, R. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. **Plant Physiology** 134, 1683–1696, 2004.
- ROCHAIX, J-D. Regulation of photosynthetic electron transport. **Biochimica et Biophysica Acta** 1807, 375–383, 2011.
- RUBAN, A.V.; JOHNSON, M.P. Xanthophylls as modulators of membrane protein function. **Archives Biochemistry Biophysics** 504, 78-85, 2010.
- SARVIKAS, P., HAKALA-YATKIN, M., DONMEZ, S., AND TYYSTJARVI, E. Short flashes and continuous light have similar photoinhibitory efficiency in intact leaves. **Journal Experimental Botany** 61, 4239-4247, 2010.
- SCHOPFER, P.; BRENNICKE, A. Pflanzenphysiologie. Springer-Verlag, **Berlin Heidelberg**, Germany, 1999.
- SERÔDIO, J.; VIEIRA, S.; CRUZ, S.; COELHO, H. Rapid light-response curves of chlorophyll fluorescence in microalgae: relationship to steady-state light curves and non-photochemical quenching in benthic diatom-dominated assemblages. **Photosynthesis Research** 90, 15, 2006.
- SILVEIRA, J.A.G., VIÉGAS, R.A., ROCHA, I.M.A., MOREIRA, A.C.O.M., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A.,. Proline accumulation and glutamine synthetase

activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology** 160, 115–123, 2003.

SLESÁK, I., LIBÍK, M., KARPINSKA, B., KARPINSKI, S., MISZALSKI, Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. **Acta Biochimica Polonica** 54, 39–50, 2007.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine** 24: 345–351, 2003.

SUORSA, M.; JÄRVI, S.; GRIECO, M.; NURMI, M.; PIETRZYKOWSKA, M.; RANTALA, M.; KANGASJÄRVI, S.; PAAKKARINEN, V.; TIKKANEN, M.; JANSOJA, S.; ARO, Eva-Mari. PROTON GRADIENT REGULATION5 Is Essential for Proper Acclimation of Arabidopsis Photosystem I to Naturally and Artificially Fluctuating Light Conditions. **The Plant Cell**, Vol. 24: 2934–2948, 2012.

TAKAHASHI, S.; MILWARD, S.E.; FAN, D.Y.; CHOW, W.S.; BADGER, M.R. How does cyclic electron flow alleviate photoinhibition in Arabidopsis? **Plant Physiology**, v. 149, p. 1560–1567. 2009.

TAKAHASHI, S.; MURATA, N.; How do environmental stresses accelerate photoinhibition? **Trends Plant Sci**, v. 13, p. 178–182. 2008.

TAKAHASHI, S. et al. Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair process and not acceleration of damage process in Arabidopsis thaliana. **Plant Physiology**. 144, 487–494, 2007.

TEZARA, W., MITCHELL, W.J.; DRISCOLL, S.D.; LAWLOR, D.W. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. **Nature** 401, 914–917, 1999

TRANTAPHYLIDES, C.; HAVAUX, M. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. **Trends Plant Science** 14: 219–228, 2009.

VALLADARES, F.; PEARCY, R.W. Interactions between water stress, sun–shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. **Plant, Cell and Environment** 20, 25–36, 1997.

VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H. T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 9: 189–195, 2006.

VAN BREUSEGEM, F.; DAT, J.F. Reactive oxygen species in plant cell death. **Plant Physiology** 141:384–390, 2006.

VASS, I. Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. **Biochimica Biophysica Acta** 1817, 209–217, 2012.

VASSILIEV, S.; BRUCE, D. Toward understanding molecular mechanisms of light harvesting and charge separation in photosystem II. **Photosynthesis Research**;97: 75–89, 2008.

WAGNER,R.; DIETZEL,L.; BRÄUTIGAM, K.; FISCHER,W.; PFANNSCHMIDT, T. The long-term response to fluctuating light quality is an important and distinct light acclimation mechanism that supports survival of *Arabidopsis thaliana* under low light conditions. **Planta** 228: 573–587, 2008.

WALTER, M.H.; STRACK, D. Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. **Nat Prod Rep** 28: 663–692, 2011.

WHITE, A.J.; CRITCHLEY, C. Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. **Photosynthesis Research** 59, 10, 1999.

WOITSCH, S.; RÖMER, S. Impact and interaction of lipophilic antioxidants in mutants and transgenic plants. **Journal Plant Physiology** 162:1197-1209, 2005.

WINGLER, A., LEA,P. J., QUICK, W.P. e LEEGOOD, R.C. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Philosophical Transaction Royal Society of London B**, 355, 1517-1529, 2000

YAMAMOTO, Y.; AMINAKA, R. YOSHIOKA, M.; KHATOON, M.; KOMAYAMA, K.; TAKENAKA, D.; YAMASHITA, A.; NIJO, N.; INAGAWA, K.; MORITA, N.; SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y. Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. **Photosynthesis Research** 98:589–608, 2008.

YAMAMOTO, Y. Quality Control of Photosystem II. **Plant Cell Physiology**. 42(2): 121–128 (2001)

YOUNIS, H.M.; BOYER, J.S.; GOVINDJE, E. Conformation and activity of chloroplast coupling factor exposed to low chemical potential of water in cells. **Biochimica et Biophysica Acta** 548, 328–340, 1979.

ZHANG, L.T.; ZHANG, Z.-S.; GAO, H.Y.; XUE, Z.C.; YANG, C.; MENG, X.L.; MENG, Q.W. Mitochondrial alternative oxidase pathway protects plants against photoinhibition by alleviating inhibition of the repair of photodamaged PSII through preventing formation of reactive oxygen species in *Rumex K-1* leaves. **Physiologia plantarum**, v. 143, p. 396–407. 2011.

Capítulo II

Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas de mudas de cajueiro sob estresses isolados e combinados de seca e de luminosidade elevada

Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas de mudas de cajueiro sob estresses isolados e combinados de seca e de luminosidade elevada

Lima, C. S.^a, Ferreira-Silva, S. L.^a, Silveira, J. A. G.^{a*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Metabolismo de Plantas, Universidade Federal do Ceará, CP 6004, CEP 60455-970, Fortaleza, Ceará, Brazil.

*Autor Correspondente: Tel.: +55 8533669821; fax: +55 8533669821

E-mail: silveira@ufc.br (Silveira JAG.)

Resumo

Os estresses abióticos de seca e de alta luminosidade são responsáveis por perdas significativas da produtividade agrícola nas regiões áridas e semiáridas. Nessas áreas, esses estresses estão presentes de forma combinada, causando distúrbios no metabolismo vegetal que resultam na redução do crescimento. Esses distúrbios incluem danos fotossintéticos, que podem resultar na produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e conseqüente estresse oxidativo. Assim, nesse capítulo foi realizada uma caracterização dos efeitos isolados e combinados da seca e da luminosidade elevada sobre processos relacionados à eficiência fotossintética e aos mecanismos de danos e de proteção oxidativa. A obtenção das mudas de cajueiro e aplicação dos tratamentos de seca e luminosidade foram realizados em casa de vegetação. Verificou-se que sob estresse de seca e de radiação isolados e combinados as mudas de cajueiro apresentaram intensa redução dos parâmetros de trocas gasosas quando comparadas com as mudas controle. A seca e a radiação isoladas afetaram a fotossíntese líquida e a interação dos estresses resultou numa resposta sinérgica. A depressão da taxa fotossintética observadas nas plantas expostas a condição de seca isolada, em grande parte se deveu ao fechamento dos estômatos. No entanto, os parâmetros da fluorescência da clorofila **a**, indicaram que a inibição da atividade fotossintética nas plantas expostas a seca isolada não originou danos fotoinibitórios (decréscimo da eficiência quântica máxima, (F_v/F_m) e oxidativos nas folhas. As plantas expostas ao estresse isolado de luminosidade elevada apresentaram acréscimos significativos dos teores de dialdeído malônico (MDA) e H_2O_2 . Na combinação dos estresses, o efeito da seca prevalece. Com relação a proteção oxidativa, a redução do peróxido nas plantas expostas a condição de seca foi acompanhado da atividade aumentada de APX e

reduzida de catalase, mostrando que a APX foi mais eficiente na remoção do peróxido e que APX e CAT tiveram atividades compensatórias. Da mesma forma a atividade da SOD respondeu eficientemente na remoção de $O_2^{\cdot-}$ acumulado nas mudas expostas à seca tanto de forma isolada como combinada com a luz, indicando que o sistema de eliminação de espécies reativas de oxigênio, determinante da tolerância a estresses abióticos, funcionou de forma eficiente nas mudas de cajueiro expostas a estresses isolados e combinados de seca e luz. Com base nos resultados obtidos podemos concluir que provavelmente o estresse de luminosidade elevada causou maior distúrbio que o estresse de seca, sendo que a combinação dos estresses causaram interações antagônicas e sinérgicas.

Palavras – chaves: Estresses abióticos; fotossíntese; fluorescência da clorofila; peroxidação lípidica; enzimas antioxidantes.

Photosynthetic changes and oxidative responses in cashew seedlings under isolated and combined stresses of drought and high light

Lima, C. S.^a, Ferreira-Silva, S. L.^a, Silva, E. N.^a, Magalhães, R. A.^a, Silveira, J. A. G.^{a*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Metabolismo de Plantas, Universidade Federal do Ceará, CP 6004, CEP 60455-970, Fortaleza, Ceará, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55 8533669821; fax: +55 8533669821

E-mail: silveira@ufc.br (Silveira JAG.)

Abstract

Drought and high light stress are responsible for significant losses in agricultural productivity in arid and semi-arid areas. In such areas, these stresses are present in combination causing disturbances in the plant metabolism which result in reduced growth. These disorders include photosynthetic damage, which may result in excessive production of reactive oxygen species (ROS) and consequent oxidative stress. Thus, in this chapter we performed a characterization of the isolated and combined effects of drought and high light on processes related to photosynthetic efficiency and mechanisms of damage and protection oxidative. Cashew seedlings obtaining as also the luminosity and drought treatments application were conducted in a greenhouse. It was found that cashew seedlings under isolated and combined drought and light stress exhibited strong reducing gas exchange parameters when compared with control plants. Drought and light isolated affected net photosynthesis and the interaction of stresses resulted in a synergistic response. Photosynthesis rate depression observed in plants exposed to drought isolated, is due largely to the closure of stomata. However, the parameters of chlorophyll fluorescence indicated that the inhibition of photosynthetic activity in plants exposed to drought alone did not result in damage photoinhibitory (decrease in maximum quantum efficiency, (F_v/F_m)) and oxidative leaves, but the seedlings exposed light alone showed significant increases in levels of malondialdehyde, MDA and H_2O_2 . In the combination of the effect of drought stress prevails. The reduction of peroxide in plants exposed to drought was accompanied by increased activity of APX and catalase reduced, showing that APX was more efficient in the removal of peroxide, and that APX and CAT had compensatory activities. Likewise SOD activity responded efficiently in the removal of $O_2^{\bullet-}$ accumulated in the seedlings exposed to drought both alone and combined with the light, indicating that

disposal system of reactive oxygen species, determining the tolerance to abiotic stresses, worked efficiently in cashew seedlings exposed to single and combined stress of drought and light. Based on the results obtained we can conclude that probably the greatest stress disorder that caused light stress of drought, and the combination of stresses caused synergistic and antagonistic interactions.

Key - words: Abiotic Stress; photosynthesis, chlorophyll fluorescence, lipid peroxidation, antioxidant enzymes.

1. INTRODUÇÃO

A seca combinada com elevadas temperaturas e alta irradiância é uma das maiores limitações à expansão de culturas (CHAVES e OLIVEIRA, 2004), pois inibe o crescimento da planta devido aos efeitos negativos sobre os principais processos fisiológicos e bioquímicos (TATAR e GEVREK, 2008). O tipo de resposta ao déficit hídrico e irradiância elevada depende da espécie, do estágio de desenvolvimento, do estado metabólico e da capacidade protetora da planta, assim como da duração e da intensidade do estresse (REDDY et al., 2004; SIMOVA-STOILOVA et al., 2008). Estas respostas podem incluir, entre outras, a diminuição da abertura estomática, a produção de proteínas específicas, o ajustamento osmótico e alterações nos níveis endógenos dos reguladores de crescimento (PASSIOURA, 1983).

A nível celular pode ocorrer a perda de rigidez, mudanças na fluidez e composição da membrana, alterações nas concentrações de solutos, e interações proteína-proteína e proteína-lípidos (VALLIYODAN e NGUYEN, 2006). Embora a expansão celular seja um dos primeiros processos a ser afetado, a fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais sensíveis ao déficit hídrico e irradiâncias elevadas (CHAVES et al., 2002). No caso de um déficit hídrico moderado, o fechamento dos estômatos é parcial e a planta recupera rapidamente quando se restabelecem as condições hídricas favoráveis (TEIXEIRA e RICARDO, 1983). O mesmo pode não acontecer quando o déficit hídrico tem efeitos mais drásticos, conduzindo ao fechamento completo dos estômatos. Em tais condições, a planta leva vários dias a recuperar e, em casos extremos, a capacidade fotossintética original pode nunca chegar a ser restabelecida (TEIXEIRA e RICARDO, 1983).

A limitação da assimilação do CO₂ em plantas sujeitas ao déficit hídrico e/ou luminosidades elevadas provoca uma sobre-redução da cadeia fotossintética de elétrons e, se for excedida a capacidade de dissipar energia da radiação em excesso daquela que pode ser consumida, desencadeia-se o mecanismo de fotoinibição e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (DEMMIG-ADAMS e ADAMS, 1996). No entanto, as plantas possuem um sistema antioxidante complexo que lhes permite confrontarem-se com o EROs (SMIRNOFF, 1993). Contudo, quando a acumulação de EROs em condições de estresse (hídrico, térmico, etc.) excede a capacidade de remoção do sistema antioxidante, aparecem os danos oxidativos, incluindo a oxidação celular dos lípidos e proteínas, destruição dos pigmentos fotossintéticos e inativação das

enzimas fotossintéticas (SMIRNOFF, 1993). Então, o desenvolvimento do estresse oxidativo é um resultado do desequilíbrio entre a formação de EROs e a sua desintoxicação (SIMOVA-STOILOVA et al., 2008).

Em geral, ficou evidente que os mecanismos diretamente responsáveis pela resistência e/ou tolerância vegetal contra os estresses, isolados ou combinados, são bastante complexos. Esse capítulo foi elaborado com intuito de caracterizar as respostas imediatas das plantas de cajueiro frente aos estresses isolados e combinados de seca e luminosidade. Os resultados obtidos nesse capítulo foram importantes para o entendimento das estratégias adaptativas da atividade fotossintética ao estresse hídrico e de alta luminosidade e primordiais para que possamos avaliar a capacidade de resistência ao estresse fotooxidativo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. *Obtenção das mudas e aplicação de tratamentos de seca e de luminosidade elevada em casa de vegetação*

Sementes de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale*), progênie CCP 06, foram germinadas em uma mistura de areia e vermiculita, na proporção de 1:1, em sacos plásticos com capacidade de 2 kg. Durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas, a umidade do substrato foi mantida próxima da capacidade de campo, por irrigações com água destilada. Após atingirem o estágio fisiológico de oito folhas expandidas (± 25 dias) as mudas foram divididas em dois lotes, dos quais um permaneceu sendo irrigado (controle) e o outro foi submetido ao estresse hídrico por meio da suspensão da rega durante 20 dias. Posteriormente, 6 plantas continuaram expostas a luz ambiente da casa de vegetação ($1700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 12 plantas foram colocadas em baixo de uma tela sombrite (baixa luz: $\approx 10\%$ da luz), sendo que a metade destas plantas (3 irrigadas e 3 submetidas a seca) foram mantidas sob a exposição a holofotes para aplicação do tratamento de luz alta ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 1). Os tratamentos de luz (ambiente da casa de vegetação, baixa luz e alta luz), foram aplicados por um período de 12 h.



Figura 1. Plantas de cajueiro cultivadas sob condições controle (irrigada) e estressantes (suspensão de rega) e expostas ao tratamento de baixa luminosidade ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e de luminosidade elevada ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), utilizando uma tela sombrite, em casa de vegetação.

2.2. Medidas realizadas

2.2.1. Curvas de resposta à CO₂

Foram realizadas curvas de resposta da fotossíntese à concentração de CO₂. A fotossíntese foi acompanhada em diversas concentrações de CO₂ na câmara de medida. Essas concentrações foram de 400, 300, 200, 100, 50, 400, 600, 800, 1200, 1600 e 2000 ppm. A partir dessa curva foram calculados a eficiência de carboxilação da rubisco (V_{cmax}), taxa de regeneração de RuBP (J_{max}), o ponto de compensação de CO₂, a fotossíntese máxima, a condutância do mesófilo (g_m) e a respiração na presença de luz (R_d). Durante a curva de resposta ao C_i , a intensidade de luz de medida no IRGA foi de $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (SHARKEY et al., 2007).

Para realização das duas curvas foi utilizado o IRGA (LI-6400XT, LI-COR, EUA) com suprimento de CO₂ e fonte de luz acoplados.

2.2.2. Medidas de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila

As medidas da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas em folhas maduras e completamente expandidas através do método do pulso de saturação (SCHREIBER *et al.*, 1994; van KOOTEN e SNEL, 1990) com um fluorômetro modulado (LI-6400-40, LI-COR, EUA), acoplado com IRGA. A partir dos dados de fluorescência foi calculada a eficiência quântica máxima do FSII, pela relação [$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$], e os seguintes parâmetros: eficiência quântica efetiva do FSII [$\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s)/F_m'$], coeficiente de dissipação fotoquímica [$q_P = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$], coeficiente de dissipação não fotoquímica [$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$] e fluxo de ftons atual do FSII [$ETR = (\Delta F/F_m' \times PPDF \times 0.5 \times 0.84)$]. Para determinar a taxa de transporte aparente a nível de FSII (ETR), 0.5 foi usado como a fração de energia de excitação distribuída ao FSII, e 0.84 foi usado como a fração de entrada da luz absorvida pelas folhas. O F_m , F_o e F_v representam a fluorescência máxima, mínima e variável após adaptação das folhas a 30 min de escuro, respectivamente, e aquelas de F_m' , F_o' e F_s representam a fluorescência máxima, mínima e no estado de equilíbrio dinâmico na presença de luz, respectivamente. As medidas realizadas na presença de luz foram feitas em folhas adaptadas às condições de irradiância prevalentes na câmara de crescimento, após exposição por 10s a um feixe de luz de $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecido pela própria fibra óptica do aparelho.

Após as medidas de fluorescência, foram realizadas as medidas de taxas de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E), com um Sistema Portátil de Fotossíntese (LI-6400XT, LI-COR, EUA) em folhas completamente expandidas submetidas à irradiância saturante ($1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) fornecida por uma lâmpada de halogênio externa, para saturar os fotossistemas sem danos.

2.2.3. Determinação do conteúdo de H_2O_2

O conteúdo de H_2O_2 foi determinado pelo método descrito por Gay et al. (1999). Neste ensaio, o peróxido de hidrogênio reage com Fe^{+2} a pH baixo, na presença do corante alaranjado de xilenol (XO) para a formação de Fe^{+3} . A concentração de Fe^{+3} gerada é calculada pelo aumento da absorvância, ocasionado pela formação do complexo Fe-XO. Para isso, 500 mg de tecido fresco de folhas foram macerados na presença de nitrogênio líquido. Após a obtenção de farinha homogênea, 1,5 ml de tampão borato-bórax 50 mM pH 8,4, foram adicionados, seguido de maceração por mais 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a $13.000 \times g$ por 20 minutos, a 4°C . Ao término, o sobrenadante foi coletado (H_2O_2 total) e o precipitado, descartado. Em seguida, alíquotas de 100 μl das amostras (diluídas, caso necessário) foram transferidas para tubos de ensaio e adicionado 900 μl de reagente contendo 0,25 mM de FeSO_4 , 0,25 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25 mM de H_2SO_4 , 124 μM de alaranjado de xilenol e 99 mM de sorbitol. A mistura de reação foi incubada por 30 minutos, a 25°C , e posteriormente, foram realizadas as leituras de absorvância, no comprimento de onda de 560 nm. As concentrações de H_2O_2 foram obtidas a partir de curva padrão e os dados serão expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$.

2.2.4. Peroxidação de lipídios (TBARS)

A peroxidação de lipídios foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme Heath e Packer (1968). Para isso, 0,1 g de folhas frescas foram macerados em almofariz na presença de N_2 líquido seguido da adição de TCA 5% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a $12.000 \times g$ durante 15 min em temperatura de 4°C . Em seguida, 0,5 ml do sobrenadante foram adicionados a 2,0 ml da solução TCA 20% e TBA 0,5% (p/v) e aquecida em banho maria a 95°C em tubos hermeticamente fechados durante 1 hora. Em seguida a reação foi interrompida em banho de gelo, e foram realizadas leituras a 532 e 660 nm. O

conteúdo de TBARS foi estimado utilizando o coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ após a subtração da absorvância obtida a 660 nm daquela a 532 nm .

2.2.5. Detecção *in situ* de peróxido e superóxido

A detecção *in situ* de peróxido (H_2O_2) foi determinado baseado na metodologia proposta por Thordal-Christensen et al., (1997). Discos foliares foram infiltrados a vácuo sob condições de escuro com 10 mM de tampão fosfato de potássio, 10 mM NaNO_3 e 0.1% (w/v) 3,3'- diaminobenzidina (DAB), pH 7.8. Os discos foliares foram incubados por aproximadamente 16h em condições de escuro e então descorados com 0.15% (w/v) de ácido tricloroacético em 4:1 (v/v) etanol:clorofórmio por 48h antes de serem fotografadas. A detecção de superóxido (O_2^-) foi feita essencialmente como descrito por Jabs et al., (1996). Folhas destacadas foram infiltradas a vácuo com 10 mM de tampão fosfato de potássio, 10 mM NaNO_3 e 0.1% (w/v) azul de nitrotetrazólio (NBT) e 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7.8. As folhas destacadas, infiltradas e tratadas com NBT foram mantidas por 30 minutos sob condições de luz, antes do descoramento que segue o mesmo método descrito acima para detecção de H_2O_2 .

2.2.6. Atividades enzimáticas

A atividade da catalase (CAT; EC: 1.11.1.6) foi determinada conforme Havir e McHale (1987). Alíquotas de $0,05 \text{ ml}$ de extrato protéico foram adicionadas de $2,95 \text{ ml}$ de tampão fosfato de potássio 50 mM , pH 7,0, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e acompanhado o decaimento da absorvância a 240 nm em espectrofotômetro durante 300 segundos, com leituras sucessivas a cada 30 seg. A atividade da enzima foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a 240 nm , para o H_2O_2 e expressa em $\eta\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MF min}^{-1}$ ou de forma específica.

A atividade da peroxidase de ascorbato (APX; EC: 1.11.1.1) foi determinada conforme método descrito por Nakano e Asada (1981). Alíquotas de $0,1 \text{ ml}$ de extrato protéico foram adicionadas ao meio de reação composto de $2,7 \text{ ml}$ de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0), contendo $0,5 \text{ mM}$ de ácido ascórbico. A reação foi iniciada pela adição de H_2O_2 (30 mM) ao meio de reação e acompanhada pelo decaimento da absorvância a 290 nm em espectrofotômetro durante 300 seg, com leitura sucessivas

em intervalos de 30 seg. A atividade da APX foi estimada utilizando o coeficiente e de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o ascorbato, em 290 nm , e expressa como $\mu\text{mol AsA g}^{-1} \text{ MF min}^{-1}$.

A atividade da dismutase de superóxido (SOD; EC: 1.15.1.1) foi determinada conforme metodologia descrita por Gianopolitis e Ries (1977). Alíquotas de $0,1 \text{ ml}$ do extrato protéico foram transferidas para meio de reação, em tubos protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), $0,1 \text{ mM}$ de EDTA, 13 mM de L-metionina e $75 \mu\text{M}$ de NBT. A reação foi iniciada pela adição de 2 mM de riboflavina e rápida transferência dos tubos, sem a proteção da luz, para câmara iluminada por lâmpada de 30 wats ($30 \mu\text{mol de fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), durante 6 minutos . A reação foi interrompida pelo desligamento da luz, os tubos foram revestidos por filme escuro e realizadas leituras a 540 nm . A atividade foi estimada com base na inibição da redução do NBT, definindo-se uma unidade de atividade como a quantidade da enzima necessária para inibir 50% da fotoredução (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade foi expressa em $\text{U.A. g}^{-1} \text{ MF min}^{-1}$.

A atividade da oxidase do glicolato (GO: EC; 1.1.3.15) foi determinada conforme o princípio de reação do método descrito por Baker e Tolbert (1966). Esse método se baseia na produção do complexo glioxilato-fenilhidrazona, produzido a partir da conversão do glicolato para glioxilato pela GO no meio. Alíquotas de $100 \mu\text{L}$ do extrato foram adicionadas a $2,9 \text{ mL}$ de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM , pH 8,3, adicionado de glicolato de sódio 40 mM , L-cisteína 100 mM , fenilhidrazina-HCl 100 mM e FMN 1 mM . O incremento da produção do complexo (glioxilato-fenilhidrazona), referente à atividade da enzima, será medido a 324 nm em espectrofotômetro durante 5 min . A atividade da GO foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 17 mM^{-1} e expressa em $\mu\text{mol de glicolato g}^{-1} \text{ MF min}^{-1}$.

Tendo em vista que a umidade, ou seja, a relação MF/MS, não variou entre os tratamentos, as atividades enzimáticas foram expressas na base de MF.

2.3. Delineamento estatístico e análise dos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com os tratamentos dispostos num fatorial 2×3 , dois níveis de umidade, irrigado e seca, e 3 intensidades de luz, 200 e $2000 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (sombrite) e expostas ao ambiente de casa

de vegetação ($1700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Cada tratamento foi representado por cinco repetições, num total de 30 parcelas experimentais. Os dados foram submetidos ao teste F a 0,05 de significância, por análise de variância, e as médias das variáveis submetidas ao teste de Tukey no mesmo nível de probabilidade.

3. RESULTADOS

Alterações fotossintéticas de mudas de cajueiro sob estresses isolados e combinados de seca e de luminosidade elevada

Para verificar os efeitos que a seca em conjunto com a alta luz exerceu sobre a fotossíntese foram realizadas curvas de $P_N\text{-}C_i$ para identificar diferenças entre parâmetros relacionados a assimilação do CO_2 em ambos os grupos de plantas controle e expostas a seca (Figura 2A e 2B). Na condição isolada de luminosidade elevada, a P_{Nmax} atingiu valores próximos a $14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se aproximando dos valores da taxa máxima de assimilação do CO_2 obtidos por Souza et al., 2005, que foi de $17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Contudo a condição de seca isolada reduziu os valores de P_{Nmax} para menos que a metade quando comparadas às plantas controle. Porém na condição de combinação dos estresses, a P_{Nmax} retorna aos valores médios do controle, indicando que nesta condição (alta luz + seca), a luminosidade elevada favoreceu a assimilação de CO_2 na condição de estresse combinado.

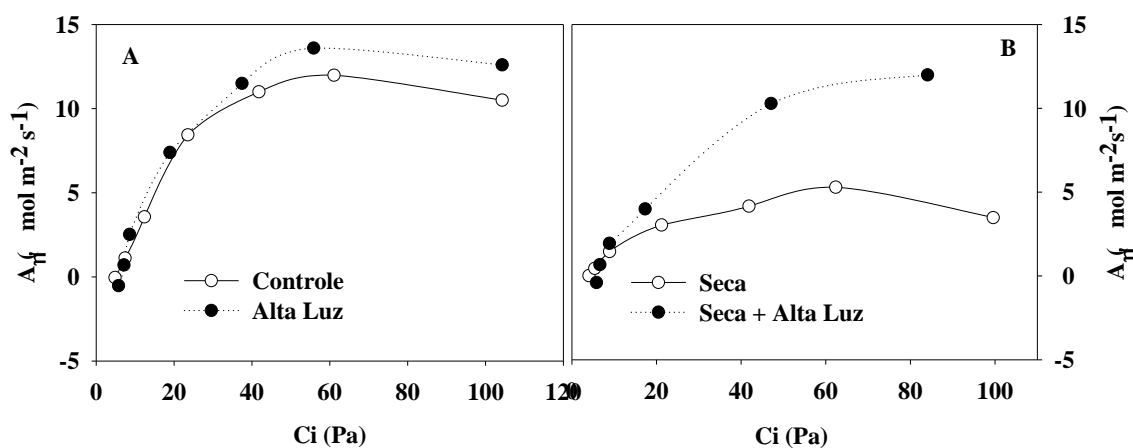


Figura 2. Resposta da assimilação de CO_2 (A) a concentração de CO_2 intercelular (C_i) de plantas de cajueiro crescidas em condições controle (irrigadas) (A) ou submetidas à suspensão de rega (B) e expostas a uma luz baixa (círculos brancos) e a uma luz alta (círculos pretos).

Em condições de casa de vegetação as plantas de cajueiro submetidas ao estresse de seca e de luz, isolados e combinados, apresentaram intensa redução dos parâmetros de tocas gasosas quando comparadas com as plantas controle (irrigadas), conforme demonstrado pelas reduções das taxas da fotossíntese, condutância estomática e transpiração (Figuras 3A, 3B e 3C). As plantas submetidas a seca isolada apresentaram os maiores valores de limitação estomática e portanto menor taxa de assimilação de CO_2 . Esse fato se repete nas plantas submetidas a luminosidade elevada. Entretanto, aquelas com a combinação dos estresses (seca + alta luz), apresentaram a mesma taxa de fotossíntese líquida que as mudas submetidas a luz de forma isolada. A transpiração total diferiu estatisticamente entre os tratamentos aplicados e seus valores médios acompanharam a condutância estomática. (Figura 3C).

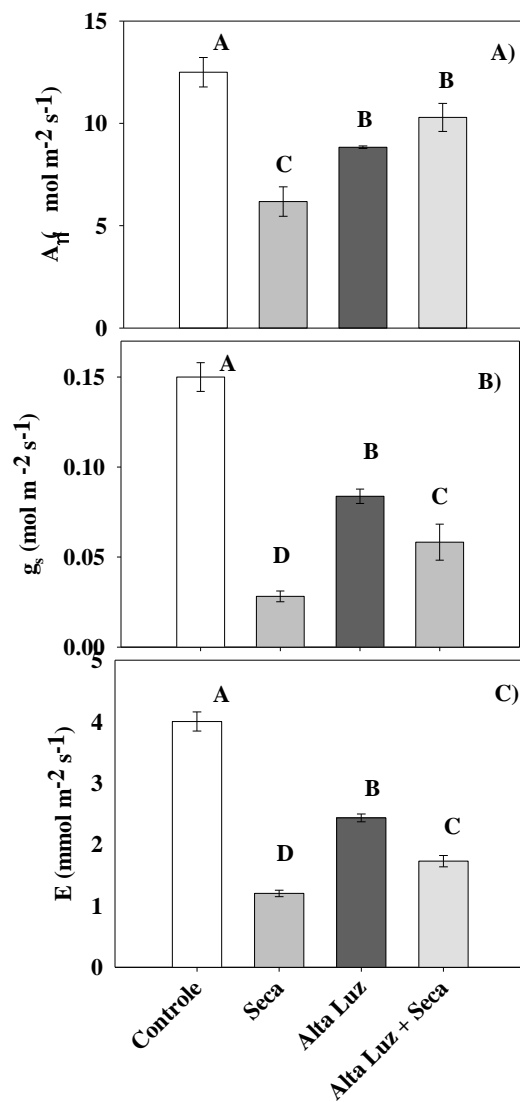


Figura 3: Fotossíntese (A), condutância estomática (B) e transpiração (C) de plantas de cajueiro submetidas aos estresses isolados e combinados de seca e alta luminosidade. Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre os tratamentos, pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Parâmetros fotoquímicos

A seca isolada não afetou a razão F_v/F_m , mostrando que as reações fotoquímicas do cajueiro nessa condição são pouco ou não afetadas. Contudo sob estresse de luminosidade elevada, isolado ou combinado com a seca, esse parâmetro foi reduzido de forma significativa, apesar disto, a redução deste parâmetro não é suficiente para indicar a ocorrência de fotoinibição (valores 0,69-0,7), indicando que a luz não chegou a causar danos no aparato fotossintético (figura 4A). Os dados de eficiência quântica efetiva do FSII ($\Delta F/F_m'$), não diferiram estatisticamente nas plantas expostas ao efeito isolado e combinado de seca e luz, reforçando a sugestão da não ocorrência de danos (Figura 4 B). A dissipação não fotoquímica (NPQ) não variou quando as mudas foram expostas a luz alta e quando em combinação com seca, apresentou uma leve queda. Apenas na condição de seca isolada, o NPQ se apresentou aumentado (Figura 4C). O aumento de NPQ quando as mudas foram expostas a seca isolada era esperado, uma vez que essas mudas apresentaram menor taxa fotossintética o que resultaria numa maior pressão de excitação sobre os fotossistemas e conseqüentemente uma maior necessidade de dissipação dessa excitação na forma de calor. Resposta oposta foi observada nas plantas expostas a luz alta isolada e combinada a seca, resultante da melhor assimilação de CO_2 e menor pressão de excitação sobre os FSs nessas plantas.

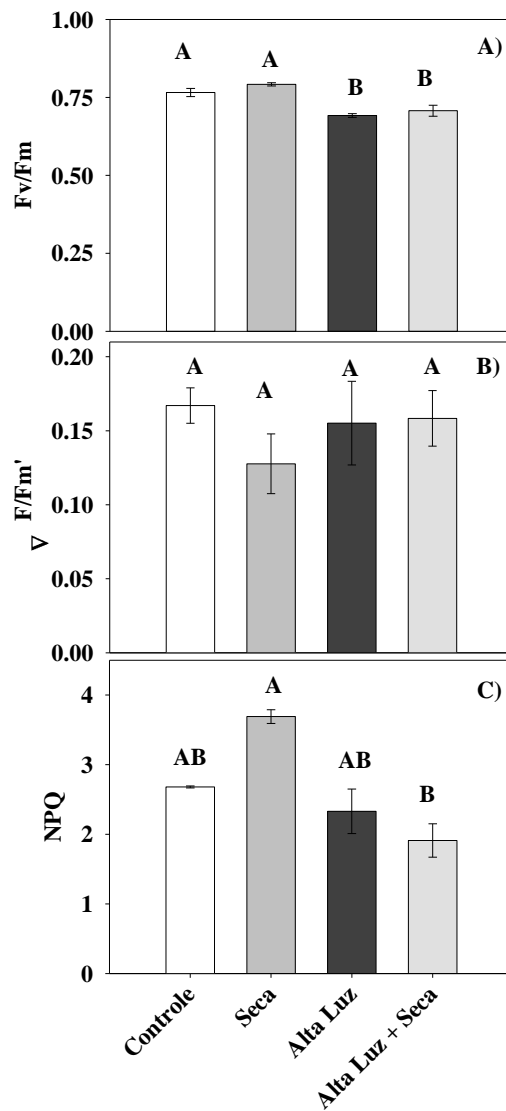


Figura 4: Parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: Eficiência quântica potencial do fotossistema II (A), eficiência quântica efetiva do fotossistema II (B) e dissipação não fotoquímica (C) em plantas de cajueiro submetidas aos estresses isolados e combinados de seca e alta luminosidade. Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre os tratamentos, pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Respostas oxidativas de mudas de cajueiro sob estresses isolados e combinados de seca e de luminosidade elevada

No presente estudo dois indicadores da ocorrência de estresse oxidativo foram medidos e as mensuração dos seus conteúdos demonstraram um maior dano oxidativo nos tecidos foliares de mudas de cajueiro expostas a luminosidade isolada (Figura 5A e 5B). Contudo, os conteúdos de H_2O_2 e de TBARS nos tecidos foliares de plantas expostas a seca de forma isolada ou combinada com a luz apresentaram –se reduzidos e similares, respectivamente, as das plantas controle sugerindo que não ocorreram danos oxidativos nessas condições.

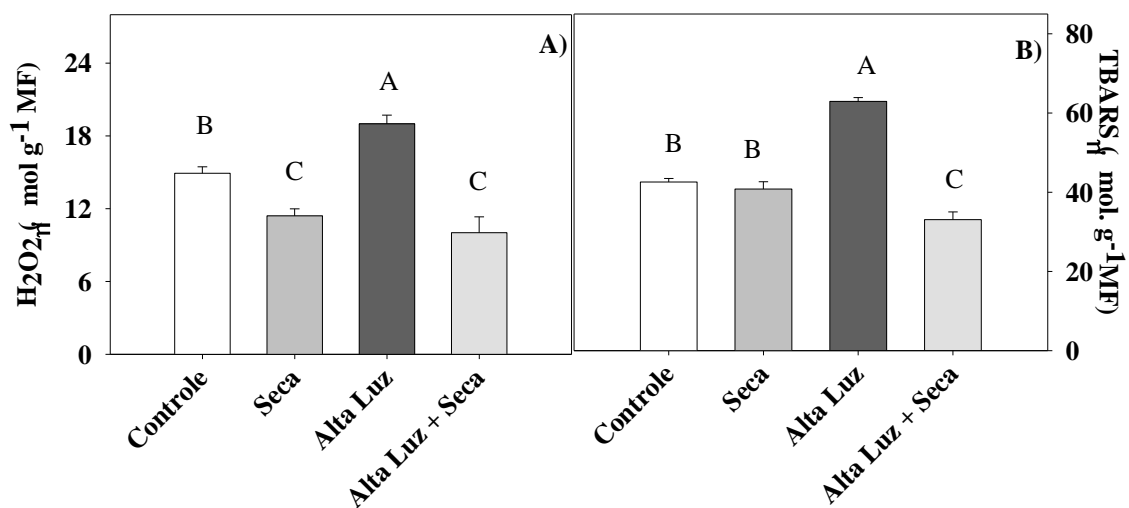


Figura 5. Determinações do conteúdo de peróxido de hidrogênio (A) e peroxidação lipídica (B) em plantas de cajueiro submetidas aos estresses isolados e combinados de seca e luminosidade elevada. Médias seguidas da mesma letra maiuscula não diferem entre os tratamentos, pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

O coramento com DAB detectou os maiores níveis de H_2O_2 nas mudas de cajueiro submetidas a alta luminosidade, confirmando resultados obtidos pela análise *in vitro* do conteúdo de H_2O_2 (Figura 6A). Também foram detectados maiores níveis de O_2^- nas plantas submetidas ao estresses de alta luminosidade, tanto isolado como em combinação com a seca (Figura 6B).

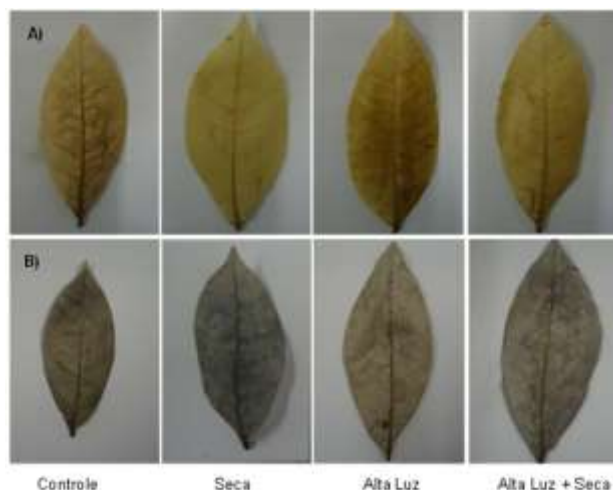


Figura 6. Detecção *in situ* de peróxido de hidrogênio (A) e de superóxido (B) em folhas cajueiro expostas aos estresses de seca e alta luminosidade

Os baixos níveis de H_2O_2 nas plantas submetidas aos estresses de seca, tanto de forma isolada como em combinação com a luz, foram consistentes com o aumento de atividade da APX induzida pelo estresse de seca principalmente sob uma alta luz (Figura 7B). Apesar da catalase também atuar como enzima removedora de H_2O_2 , as APXs se mostraram mais eficientes nesse papel. Enquanto o estresse de seca (isolado ou combinado a luz) induziu a atividade de APX, ao mesmo tempo inibiu a atividade de catalase, demonstrando que essas enzimas tem atividades compensatórias (Figuras 7A e 7B).

As SODs, por sua vez, catalisam a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ para H_2O_2 e O_2 (ALSCHER et al., 2002). No presente estudo, ocorreu aumento na atividade da SOD nas mudas expostas à seca de forma isolada e combinada com a luz (Figura 7C), indicando que a eficiência da atividade da SOD na remoção do $O_2^{\cdot-}$ acumulado.

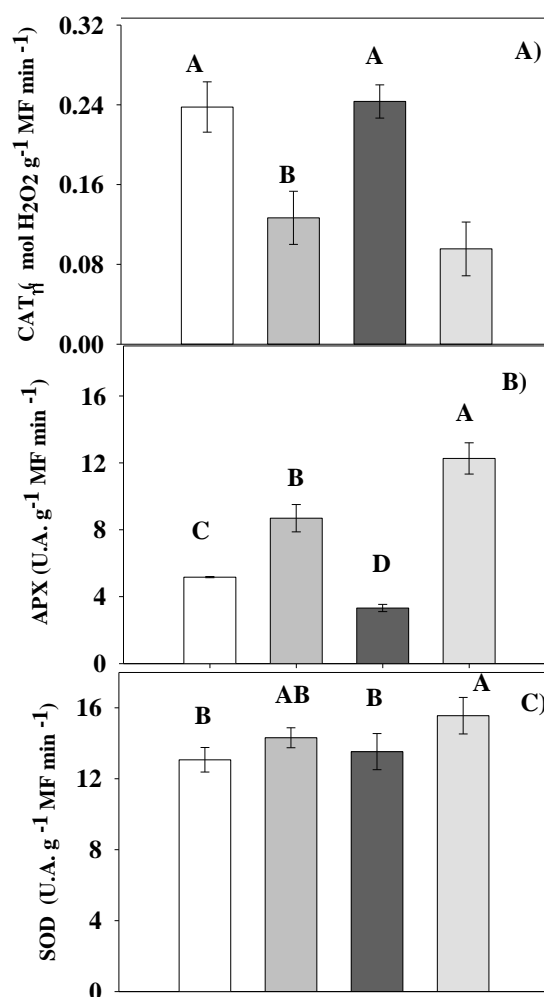


Figura 7. Determinações das atividades enzimáticas de catalase (A), peroxidase do ascorbato (B) e superóxido dismutase (C), de plantas de cajueiro submetidas aos estresses isolados e combinados de seca e alta luminosidade. Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre os tratamentos, pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

4. DISCUSSÃO

A imposição do estresse hídrico e da luminosidade elevada (isolados e combinados) afetou negativamente a atividade fotossintética das mudas de cajueiro (Figura 3A). Os decréscimos nas taxas fotossintéticas, em grande parte, se deveram ao fechamento estomático traduzido numa diminuição dos valores da condutância estomática (g_s). Resultados similares foram obtidos por Ramalho et al. (2000), que concluíram que uma redução na condutância estomática pode diminuir o consumo de água através da transpiração e contribuir para a retenção de água na folha, podendo este ser um fator chave para evitar efeitos drásticos da seca no crescimento e fotossíntese.

Valliyodan e Nguyen (2006), também afirmaram que a redução da atividade fotossintética pode resultar do fechamento dos estômatos. Falhando esta defesa de primeira linha (fechamento dos estômatos) a diminuição de P_N pode estar relacionada com alterações nas estruturas dos cloroplastos, pois segundo Dekov et al. (2000), os estresses hídrico e de luminosidade elevada influenciam muitos processos celulares, e os cloroplastos e suas membranas estão entre os principais alvos.

A inibição da fotossíntese detectada em plantas expostas à seca e luminosidade elevada foi acompanhada pela alteração de outros parâmetros de fluorescência da clorofila **a** que estão relacionados com a eficiência fotossintética. A alta radiação isolada ou combinada com a seca afetou negativamente a eficiência quântica máxima do FSII (F_v/F_m), no entanto, a imposição do estresse de seca isolada não provocou alterações na razão F_v/F_m , mantendo esta razão perto de 0,8 (valor ótimo segundo Chaves et al., 2002), sugerindo que a seca isolada não induziu danos nos centros de reação do FSII (Figura 4A). Da mesma forma, as plantas expostas a luminosidade elevada também não sofreram danos nos centros de reação do FSII apesar da diminuição da razão F_v/F_m para de 0,69 e 0,70. Conjuntamente aos menores valores de F_v/F_m , as mudas expostas a luz, apresentarem os menores valores de NPQ, indicando que essas plantas são mais susceptíveis aos danos oxidativos, de modo que não são capazes de se protegerem dos excessos de radiação, através da dissipação do excesso de energia, via ciclo das xantofilas. Contudo, outras vias, como a reação de Mehler e a fotorrespiração podem funcionar como dreno de elétrons resultantes do excesso de energia quando há baixa disponibilidade de CO_2 nos cloroplastos. Estes processos estariam envolvidos na proteção do aparelho fotossintético de danos fotooxidativos. Ambas as vias, reação de Mehler e fotorrespiração, implicam um aumento na produção de espécies de O_2 tóxicas, como O_2^- e H_2O_2 (SCHWANZ et al., 1996).

Os resultados do estudo indicaram que sob alta radiação isolada as plantas de cajueiro acumularam mais O_2^- e H_2O_2 , essas plantas também apresentaram o maior conteúdo de TBARS (Figuras 5 e 6), indicando que essas plantas são mais suscetíveis ao dano oxidativo. O método do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) é utilizado para determinação da concentração do dialdeído malônico (MDA) e tem sido amplamente utilizado desde os anos 1950 para estimar a peroxidação dos lipídios nas membranas e sistemas biológicos (JIANG e HUANG, 2001; CORREIA et al., 2006). A determinação do MDA é considerada como o principal parâmetro para avaliar a extensão da oxidação da membrana (AL-GHAMDI, 2009). O dialdeído malônico é

formado através da auto-oxidação e degradação enzimática dos ácidos graxos polinsaturados nas células (HODGES et al., 1999).

Os radicais livres podem atacar diretamente os ácidos graxos polinsaturados nas membranas e iniciar a peroxidação lipídica provocando danos nas membranas (CHEN et al., 2006). Como as membranas são os primeiros alvos de muitos estresses, designadamente o hídrico e o luminoso, a manutenção da sua integridade e estabilidade é um importante componente da tolerância à seca e às altas luminosidades. Por sua vez a danificação das membranas leva a um decréscimo da atividade fotossintética.

Um potencial danificador da maquinaria fotossintética é o estresse oxidativo desenvolvido como um efeito secundário, portanto, a capacidade de resposta dos sistemas protetores é um aspecto relevante a considerar na aclimação a novas condições ambientais. Por isso a tolerância às condições ambientais também está relacionada com o aumento da capacidade de limpar ou desintoxicar EROs (CHEN et al., 2006).

A proteção de antioxidantes nas células vegetais é complexa e altamente compartimentada, compreendendo compostos enzimáticos e não-enzimáticos (SIMOVA-STOILOVA et al., 2008) que desempenham um papel importante a fim de evitar efeitos nocivos dos radicais livres (TATAR e GEVREK, 2008). Do sistema de enzimas antioxidantes fazem parte a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do ascorbato (APX) e a redutase da glutathiona (GR). No nosso estudo as APXs e SODs se mostraram muito eficientes na remoção do H_2O_2 e do $O_2^{\bullet-}$, respectivamente, nas mudas submetidas seca, a atividade aumentada dessas enzimas foram responsáveis pelos baixos níveis dessas EROs, tanto na condição isolada como combinada com a luz (Figura 7B e 7C).

Com os resultados já obtidos e com base em outros experimentos realizados no laboratório, podemos concluir que os estresses de seca e luminosidade elevada causaram alterações oxidativas e na eficiência fotoquímica das plantas de cajueiro. Essas alterações possivelmente foram do tipo aclimatativas, a fim de estabelecer ajustamento metabólico frente às condições estressantes impostas em casa de vegetação.

Referências Bibliográficas

- ALSCHER, R.G., ERTURK, N. e HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341. 2002.
- AL-GHAMDI, A.A. (2009) Evaluation of oxidative stress tolerance in two wheat (*Triticum aestivum*) cultivars in response to drought. **International Journal of Agriculture and Biology** 11: 7-12.
- BAKER, N.R. (2008) Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annual Review of Plant Biology** 59: 89-113.
- BAKER, A.L.; TOLBERT, N.E. Glycolate oxidase (ferredoxin-containing form). **Methods in Enzymology**, v.9, 339-340, 1966.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v. 44, p. 2762–2787. 1971.
- CHAVES, M.M.; PEREIRA, J.S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M.L.; RICARDO, C.P.P.; OSÓRIO, M.L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. (2002) How Plants Cope with Water Stress in the Field. Photosynthesis and Growth. **Annals of Botany** 89: 907-916.
- CHAVES, M.M.; OLIVEIRA, M.M. (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany** 55 (407): 2365-2384.
- CHEN, Y.; ZHANG, M.; CHEN, T.; ZHANG, Y.; AN, L. (2006) The relationship between seasonal changes in anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of *Sabina*. **South African Journal of Botany** 72: 272-279.
- CORREIA, M.J.; OSÓRIO, M.L.; OSÓRIO, J.; BARROTE, I.; MARTINS, M.; DAVID, M.M. (2006) Influence of transient shade periods on the effects of drought on photosynthesis, carbohydrate accumulation and lipid peroxidation in sunflower leaves. **Environmental and Experimental Botany** 58: 75-84.
- DEKOV, I.; TSONEV, T.; YORDANOV, I. (2000) Effects of water stress and high-temperature stress on the structure and activity of photosynthetic apparatus of *Zea mays* and *Helianthus annuus*. **Photosynthetica** 38 (3): 361-366
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W.W. III. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. **Trends in Plant Science** 1: 21-26..
- GAY, C., COLLINS, J. e GEBICKI, J. M. Hydroperoxide Assay with the Ferric-Xylenol Orange Complex. *Analytical Biochemistry*, v. 273, p.149–155, 1999.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309–314. 1977.

- HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in Tobacco-Leaves. **Plant Physiology**. v. 84, p. 450-455, 1987.
- HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 125, p. 189-198. 1968.
- HODGES, D.; DELONG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta** 20: 604-611.
- JABS, T.; DIETRICH, R.; DANG, J. Initiation of runaway cell death in an Arabidopsis mutant by extracellular superoxide. **Science** 273: 1853–1856, 1996
- JIANG, Y.; HUANG, B. (2001) Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. **Crop Science** 41: 436-442.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Environment** 22: 867-880.
- PASSIOURA, J.B. (1983) Roots and drought resistance. **Agricultural Water Management** 7: 265-280.
- RAMALHO, J.C.; LAURIANO, J.A.; NUNES, M.A. (2000) Changes in photosynthetic performance of *Ceratonia siliqua* in summer. *Photosynthetica* 38 (3): 393-396.
- REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161: 1189-1202.
- SCHWANZ, P.; PICON, C.; VIVIN, P.; DREYER, E.; GUEHL, J-M.; POLLE, A. (1996) Responses of Antioxidative Systems to Drought Stress in Pendunculate Oak and Maritime Pine as Modulated by Elevated CO₂. **Plant Physiology** 110: 393-402. ()
- SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. 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, p. 49-70. 1994.
- SHARKEY, T.D.; BERNACCHI, C.J.; FARQUHAR, G.D.; SINGSAAS, E.L. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ plants. **Plant Cell Environ**, v. 30, p. 1035-1040. 2007
- SIMOVA-STOILOVA, L.; DEMIREVSKA, K.; PETROVA, T.; TSENOV, N.; FELLER, U. (2008) Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. **Plant, Soil and Environment** 54: 529-536.

SMIRNOFF, N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist** 125: 27-58.

SOUZA , R. P.; RIBEIRO , R. V.; MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F.; GOMES DA SILVEIRA , J.A.G. Photosynthetic responses of young cashew plants to varying environmental conditions. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.40, n.8, p.735-744, ago. 2005

TATAR, Ö.; GEVREK, M.N. (2008) Influence of Water Stress on Proline Accumulation, Lipid Peroxidation and Water Content of Wheat. **Asian Journal of Plant Sciences** 1682-3974.

TEIXEIRA, A.R.N.; RICARDO, C.P.P. (1983) Fotossíntese. Didáctica Editora. Lisboa, Portugal. Valliyodan B., Nguyen H. T. (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 9: 189-195.

THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y.; COLLINGE, D.B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. **Plant J** 11: 1187–1194, 1997.

VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H. T. (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 9: 189-195.

VAN KOOTEN, O.; SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v. 25,p.147-150, 1990.

VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H. T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 9: 189-195, 2006.

Capítulo III

*A fotoinibição atenua danos fotooxidativos
sob condições de estresse hídrico em mudas de cajueiro*

A fotoinibição atenua danos fotooxidativos sob condições de estresse hídrico em mudas de cajueiro

Lima, C. S.^a, Ferreira-Silva, S. L.^a, Silva, E. N.^a, Aragão, R. M.^a, Silveira, J. A. G.^{a*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Metabolismo de Plantas, Universidade Federal do Ceará, CP 6004, CEP 60455-970, Fortaleza, Ceará, Brazil.

*Autor Correspondente: Tel.: +55 8533669821; fax: +55 8533669821

E-mail: silveira@ufc.br (Silveira JAG.)

Resumo

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta nativa do Brasil, amplamente cultivada na região Nordeste, onde tem grande importância econômica. Plantas adultas de cajueiro convivem naturalmente com alta intensidade de radiação solar juntamente com baixa disponibilidade de água no solo, e isso leva ao questionamento de como essa espécie é capaz de tolerar essas condições ambientais. Seria seu aparato fotoquímico de fato resistente aos estresses de seca e alta luminosidade? Para testar a hipótese, foram realizados dois experimentos, num primeiro momento as mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas ou com suspensão de rega foram expostas a condições de luz crescente (200, 400, 800, 1600 e 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 24h e num segundo momento, as mudas de cajueiro nas mesmas condições de umidade (irrigado ou com suspensão de rega) foram expostas a alta luminosidade (2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 24h seguidas por recuperação da radiação (12h claro/12h escuro) a 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com as demais condições ambientais controladas. Foi demonstrado que plantas de cajueiro apresentaram fotoinibição em resposta ao aumento da intensidade luminosa, resposta esta que foi intensificada nas plantas submetidas ao estresse hídrico. Interessantemente o excesso de luminosidade não induziu produção excessiva de EROs, conforme indicado pelo conteúdos de TBARS e de H_2O_2 , contudo essa proteção oxidativa não pode ser atribuída a dissipação de energia por meio do NPQ. Nessas condições, a fotorrespiração pode ter tido esse papel de proteção frente ao estresse de luminosidade excessiva, assim como a redução no teor de clorofilas representou pelo menos em parte, um mecanismo de restrição na captação de energia e conseqüente atenuação dos fotodanos nessas condições. Hipotetizamos que a indução de uma nova homeostase

metabólica, possivelmente conferida por mecanismos foto-protetores, presentes nessa espécie foram responsáveis pela efetiva proteção celular mesmo na ausência de respostas fotoquímicas diretamente relacionadas com a proteção à foto-danos, tais como a indução do NPQ. Nossos dados sugerem que a fotoinibição causada pela luminosidade moderada e elevada pode fornecer um mecanismo para a dinâmica da regulação do aparato fotossintético, evitando os foto-danos em resposta ao aumento do tempo de exposição à luz elevada.

Palavras-chaves: Estresse abiótico, estresse fotooxidativo, proteção oxidativa.

**Photoinhibition attenuates photo-oxidative damage under conditions of
drought stress in plants cashew**

Lima, C. S.^a, Ferreira-Silva, S. L.^a, Silva, E. N.^a, Magalhães, R. A.^a, Silveira, J. A. G.^{a*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Metabolismo de Plantas, Universidade Federal do Ceará, CP 6004, CEP 60455-970, Fortaleza, Ceará, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55 8533669821; fax: +55 8533669821

E-mail: silveira@ufc.br (Silveira JAG.)

Abstract

The cashew (*Anacardium occidentale* L.) is a native plant of Brazil, widely cultivated in the Northeast, which has great economic importance. Cashew plants grown naturally coexist with high solar radiation intensity with low water availability in the soil and it makes arise a question how this species is able to tolerate such environmental conditions. Its photochemical apparatus would in fact resistant to drought and high light stress? To test the hypothesis, two experiments were conducted, initially cashew seedlings grown in irrigated conditions or irrigation suspension were exposed to increasing light conditions (200, 400, 800, 1600 and 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 24h and subsequently, cashew seedlings under the same conditions of moisture (irrigated or irrigation suspension) were exposed to high light (2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 24 hours followed by recovery (12 h light/12h dark) to 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with the rest controlled environmental conditions. Our study has shown that cashew plants showed photoinhibition in response to increased light intensity. This response that was enhanced in plants subjected to drought stress. Intriguingly the excess luminosity not induced excessive ROS production as indicated by the content of TBARS and H_2O_2 but this protection cannot be attributed to energy dissipation through NPQ. Under these conditions, photorespiration may have had this role of protection against high light, stresses as well as a reduction in chlorophyll content represented at least in part a constraint mechanism in energy capture and consequent attenuation of photodamage in these conditions. We hypothesized that induction of a new metabolic homeostasis, possibly conferred by photo-protective mechanisms present in this species were responsible for the effective cell protection even in the absence of photochemical

responses directly related to the protection of photo-damage, such as induction of NPQ. We suggest that the photoinhibition caused by moderate and high luminosity could provide a mechanism for the dynamic regulation of photosynthetic apparatus, avoiding the photo-damage response to increasing exposure time to high light.

Key words: abiotic stress, photooxidative stress, oxidative protection.

1. INTRODUÇÃO

A luz é essencial para o processo de fotossíntese, porém o excesso de energia luminosa pode ser deletério para a maquinaria fotoquímica (JIAO et al., 2004). Quando organismos fotossintéticos são expostos à luminosidade intensa, a atividade dos fotossistemas II (FSII) diminui rapidamente, caracterizando a ocorrência do fenômeno que é denominado de fotoinibição do PSII (KEREN e KRIEGER-LISKAY, 2011). As plantas estão frequentemente expostas a uma intensidade de luz solar que pode ultrapassar aquela requerida para o processo de fotossíntese. Nessas condições, o excesso de energia luminosa absorvida pelo aparelho fotossintético poderá causar uma redução da eficiência fotossintética, caso não seja dissipado rapidamente, induzindo a fotoinibição e danos fotooxidativos aos centros de reação do FSII (BAKER e ROSENQVIST, 2004; MURCHIE e NIYOGI, 2011).

Essa restrição da fotossíntese (P_N), induzida por excesso de luz, pode ser ainda intensificada caso haja interação com outros fatores ambientais, tais como temperaturas elevadas (POWLES et al., 2006), e estresses causados por seca (BJÖRKMAN E POWLES, 1984; POULSON et al., 2006) e salinidade (BLINDOW et al., 2003). Fotoinibição consiste na redução do rendimento quântico dos fotossistemas e pode ocorrer de forma dinâmica ou crônica, lentamente reversível associado com a perda de atividade de FSII (BJORKMAN e POWLES 1984, LONG et al.1994). Esse processo é caracterizado por reduções paralelas na P_N e rendimento quântico efetivo do fotossistema II e é acompanhada por um declínio na relação F_v/F_m e um aumento na fluorescência mínima (F_0) da clorofila (OSMOND e GRACE, 1995). Depois de uma exposição prolongada ao excesso de fótons, a taxa saturante de fótons diminui a P_N (LONG et al. 1994). Durante a estação seca, em ambientes tropicais, a elevada irradiância, a alta temperatura, e o déficit de água podem causar fotoinibição, determinando uma redução da capacidade fotossintética da planta (POWLES 1984).

A deficiência hídrica leva a uma redução substancial da taxa fotossintética líquida, devido ao fechamento dos estômatos, o que limita a difusão de CO_2 na folha (NAYYAR e GUPTA, 2006; YANG et al., 2006), ou fatores não-estomáticos, tais como a inibição da Rubisco ou síntese do ATP (YARDONOV et al., 2003; ZLATEV e YORDANOV, 2004). Em consequência, a deficiência de CO_2 , ATP ou Ribulose 1-5 bifosfato (RuBP) bem como a inibição da Rubisco irá diminuir a oxidação de NADPH no ciclo de Calvin (CHAVES et al., 2009). Consequentemente, o receptor primário para

os elétrons fotossintéticos, o NADP^+ , não é suficientemente disponível, e uma baixa irradiância é necessária para saturar a fotossíntese sob condições de estresse hídrico. Portanto, quando uma alta irradiância é imposta às plantas estressadas pela seca a susceptibilidade à fotoinibição pode ser aumentada (FLEXAS e MEDRANO, 2002).

Acredita-se que o fotossistema II (FSII) desempenhe um papel fundamental na resposta da fotossíntese aos estresses ambientais (BAKER, 1991). O FSII é o componente mais vulnerável do aparato fotossintético (ANDERSON e BARBER, 1996; YIN et al., 2010;). Estudos sugerem que o estresse hídrico pode causar danos consideráveis ao centro de reação do PSII, pelo aumento a degradação da proteína CP43 assim como da proteína D1, interferindo com a fosforilação de proteínas do núcleo do PSII (GIARDI et al., 1996; CORNIC, 2000). Durante o processo de reorganização, o turnover da proteína D1 é reforçado pelo estresse hídrico para reconstruir e manter o restante do FSII funcional. No entanto, a menor quantidade da proteína D1 em folhas sob estresse hídrico sugere que a síntese aumentada da proteína D1 pode não corresponder a sua degradação (GIARDI et al., 1996).

Vários fatores podem contribuir para a proteção contra a fotoinibição, incluindo mecanismos que diminuem a absorção de radiação – movimento de folhas, pilosidade, refletância –, a fotorrespiração, a redução do oxigênio no fotossistema I (FSI), que leva à formação de água (ciclo água-água), e a dissipação de energia por mecanismos não fotoquímicos – perda de calor ou dissipação não radiativa (KASAHARA et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2007). A fotorrespiração é mais efetiva na proteção contra a fotoinibição do que o transporte alternativo de elétrons para o oxigênio no ciclo água-água, pois a fotorrespiração dissipa o excesso de ATP e NADPH produzidos durante a fase fotoquímica da fotossíntese (WU et al., 1991).

Porém, sob excesso de luz, mais de 90% da luz absorvida pode ser dissipada via dissipação não fotoquímica. Nesse mecanismo, há a transferência de energia das clorofilas para alguns carotenóides do ciclo da xantofila que leva à dissipação de energia na forma de calor, que ocorre no complexo coletor de luz do FSII (DEMMIG-ADAMS e ADAMS, 1992; NILKENS et al., 2010). Apesar de existirem estudos sobre fotoinibição da fotossíntese, pouco é o conhecimento sobre como os fatores de estresse, tais como a seca, interagem com o excesso de luz para desencadear esse processo. O objetivo deste trabalho foi determinar os efeitos da luminosidade e da seca na atividade do FSII, caracterizando a susceptibilidade de processos associados à fotoinibição, além

de avaliar a dinâmica da recuperação da fotoinibição após a exposição à luminosidade excessiva na presença de estresse hídrico em mudas jovens de cajueiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Experimentos realizados

O presente estudo foi realizado com base em dois experimentos. Após a realização da caracterização das alterações fotossintéticas e oxidativas das mudas de cajueiro frente aos estresses de luminosidade elevada e seca, chegou-se a conclusão que seria interessante investigar o efeito fotoinibitório da alta luminosidade com 24 h de exposição. Baseado nisso, foi então implantado o experimento I, onde as mudas de cajueiro previamente cultivadas sob condições irrigadas ou submetidas ao estresse hídrico, foram expostas a intensidades crescentes de luminosidade durante 24 horas de forma contínua. Em seguida, foi realizado o experimento II no qual as mudas irrigadas e expostas à seca foram submetidas a luminosidade moderada ($700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ou elevada ($2000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), por 24 horas. Em seguida, as plantas submetidas ao tratamento de luminosidade elevada foram expostas a um período de recuperação de 12h esc/ 12h claro a $700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Descrição dos experimentos

Experimento I:

Obtenção das mudas e aplicação de tratamentos de seca e de luminosidade em casa câmara de crescimento

As plantas utilizadas nesse estudo foram obtidas como descrito no Experimento I, capítulo II. Para os tratamentos de luz as plantas controle ou submetidas à seca foram transferidas para uma câmara de crescimento com condições controladas, de temperatura e umidade relativa, e expostas a diferentes níveis de radiação (200, 400, 800, 1600 e $2000 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante 24 horas de forma contínua (Figura 1).

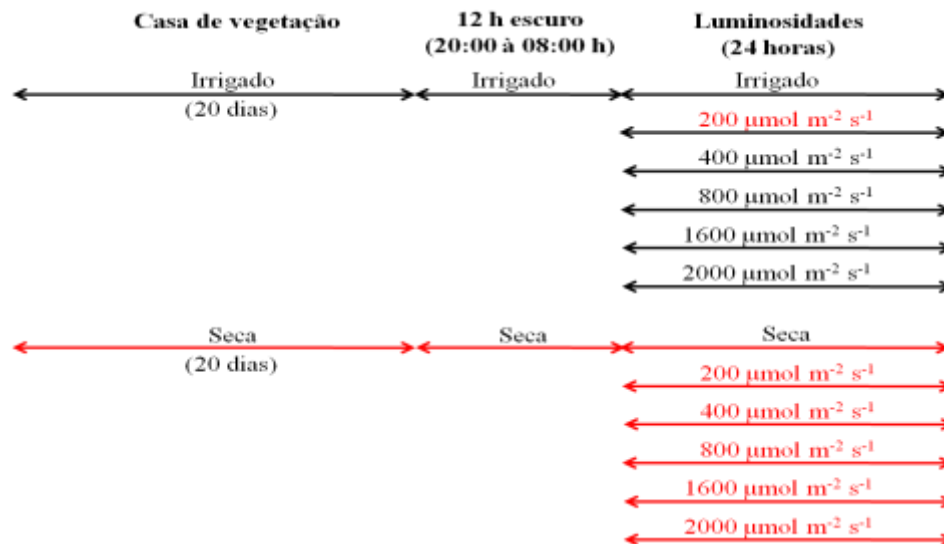


Figura 1. Desenho experimental utilizado para a exposição das plantas aos efeitos dos estresses de seca e de luminosidade. As plantas cultivadas em condições controle (irrigadas) ou expostas a seca, em casa de vegetação, foram submetidas à luminosidade crescentes (200, 400, 800, 1600 e 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 24 horas, de forma contínua. Para a exposição aos tratamentos de luminosidade as plantas foram acondicionadas no Fitotron, com umidade relativa de 60% \pm 5 e temperatura de 30 $^{\circ}\text{C} \pm$ 2.

Experimento II:

Aplicação de tratamentos da recuperação do estresse de luz

As plantas utilizadas nesse estudo foram obtidas como descrito no Experimento I. As mudas de cajueiro previamente crescidas em condições de casa de vegetação, sob condições irrigadas ou de seca (suspensão da rega) por 20 dias, foram submetidas aos tratamentos de luminosidade moderada (700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e elevada (2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em câmara de crescimento (Fitotron) por 24 h consecutivas, sob condições controladas. Em seguida, um grupo de plantas que passaram pelo tratamento de alta luminosidade foram submetidas ao tratamento de recuperação do estresse de luz pela exposição a 12 h de escuro seguido de 12 h de luminosidade moderada (700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 2).

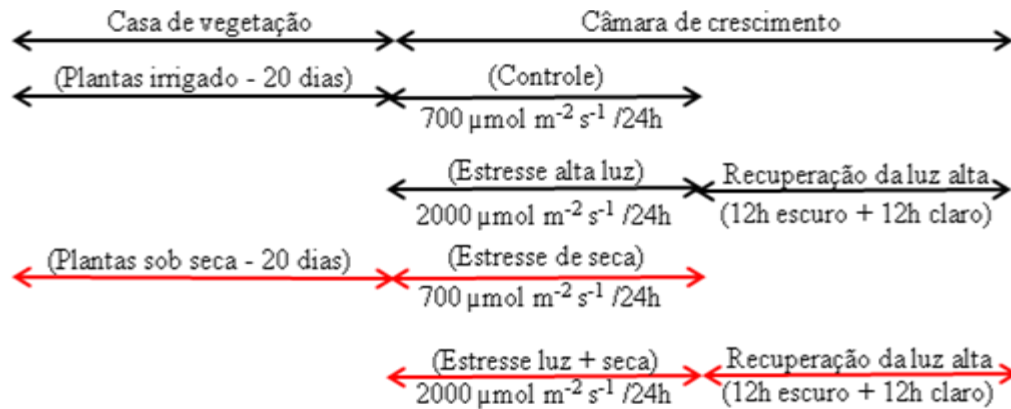


Figura 2. Desenho experimental utilizado para exposição das plantas a combinação dos estresses de seca e luminosidade elevada, seguido do tratamento de recuperação do estresse luz. As plantas cultivadas em condições controle (irrigadas) ou expostas a seca, em casa de vegetação, foram submetidas a uma luz moderada ($700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ou elevada ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 24h, de forma contínua. O tratamento de **recuperação** do estresse de alta luz foi realizado pela exposição das mudas a 12 horas de escuro (18:00 às 06:00h), seguido de 12 horas (06:00 às 18:00h) em luminosidade moderada ($700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 12h).

Delineamento estatístico e análise dos dados

O experimento I foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com os tratamentos dispostos num fatorial 2×5 , dois níveis de umidade, irrigado e seca, e 6 níveis de intensidades de luz, 200, 400, 800, 1600 e $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Cada tratamento foi representado por cinco repetições, num total de 50 parcelas experimentais. O experimento II também foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, dispostos num fatorial 2×3 , dois níveis de umidade, irrigado e seca, e 3 intensidades de radiação (luz moderada, luz elevada e luz de recuperação). Cada tratamento foi representado por cinco repetições, num total de 30 parcelas experimentais. Os dados foram submetidos ao teste F a 0,05 de significância, por análise de variância, e as médias das variáveis submetidas ao teste de Turkey no mesmo nível de probabilidade.

2.2. Medidas realizadas

2.2.1. Conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água (CRA) das folhas foi determinado pelas diferenças de pesos fresco, túrgido e seco, conforme metodologia descrita por Fidalgo *et al.* (2004). Durante a coleta das mudas foram amostrados 20 discos foliares (10 mm de diâmetro) e determinada a massa fresca (MF) imediatamente. Após a pesagem os discos foram imersos em água deionizada em placas de petri por 6 horas, até atingirem o peso túrgido. Após breve secagem com papel toalha, visando eliminar o excesso de água, foi determinada a massa túrgida (MT). Para determinar a massa seca (MS) os discos foram secados em estufa a 70°C durante 48 h. O CRA foi estimado pela seguinte relação: $[(MF - MS)/(MT-MS)] \times 100$.

2.2.2. Dano de membrana

Os danos de membranas foram determinados com base no vazamento de eletrólitos por medidas da condutividade elétrica, conforme proposto por Shanahan *et al.*, (1990). Ao final do ensaio foram coletados vinte discos foliares (10 mm de diâmetro) que foram imersos em 10 ml de água deionizada, em tubos fechados e incubados a 25 °C por 6 horas e determinada a condutividade elétrica da solução (C1). Em seguida, os tubos foram incubados a 100 °C por 1 h e após atingir a temperatura ambiente foi determinada a condutividade elétrica da solução (C2). Os danos de membranas (DM) foram estimados pela seguinte relação: $(C1/C2) \times 100$.

2.2.3. Conteúdo de clorofilas

Para extração destes pigmentos folhas frescas foram maceradas (aproximadamente 200 mg) com acetona 80% gelada, em almofariz de porcelana, sendo, posteriormente, os extratos filtrados em funil com papel de filtro e transferidos para tubos de ensaios (10 ml), protegidos da luz. Os teores dos pigmentos presentes nos extratos foram medidos, por meio de leituras de absorbâncias, em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 663 nm, 645 nm para o cálculo dos teores de clorofila total 470 nm para o cálculo dos teores dos carotenóides e calculados, conforme Lichtenthaler (1987), utilizando as seguintes equações, dadas em $\mu\text{g mL}^{-1}$:

$$\begin{aligned} \text{Clorofila total: } & 7,15 A_{663} + 18,71 A_{654} \\ \text{Carotenóides totais: } & \frac{(1000 A_{470} - 1,82 Chl_A - Chl_B)}{198} \\ \text{Clorofila a: } & 12,23 A_{663} - 2,79 A_{645} \\ \text{Clorofila b: } & 21,50 A_{645} - 5,10 A_{663} \end{aligned}$$

Os valores foram corrigidos para miligramas de pigmento fotossintético por grama de massa fresca através da multiplicação do resultado pelo volume final do extrato (mL), dividido pela massa fresca (g) e multiplicado por 0,001, sendo o resultado final expresso em miligramas de pigmento por grama de massa fresca (mg g^{-1} MF).

2.2.4. Conteúdo de antocianinas

A quantificação de antocianinas foi realizada segundo método proposto por Lees e Francis (1972). 100 mg de folhas frescas foram maceradas em almofariz de porcelana em banho de gelo com 3 ml de solução extratora (85% de Etanol concentrado + 15% de HCL 1,5N). O extrato foi transferido para tubos de ensaio, revestidos com papel alumínio, ficando em repouso em geladeira por 24 h. Posteriormente, os extratos foram filtrados em pano de seda de trama fina, com auxílio de 5 ml da solução extratora, deixando-se em descanso por mais duas horas. A leitura de absorvância foi realizada no comprimento de onda de 535 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar de 98,2 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

2.2.5. Medidas de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila

As medidas da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas em folhas maduras e completamente expandidas através do método do pulso de saturação (SCHREIBER *et al.*, 1994; van KOOTEN e SNEL, 1990) com um fluorômetro modulado (LI-6400-40, LI-COR, EUA), acoplado com IRGA. A partir dos dados de fluorescência foram calculados: eficiência quântica máxima do FSII, pela relação $[F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m]$, a eficiência quântica efetiva do FSII $[\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s)/F_m']$, coeficiente de dissipação fotoquímica $[q_P = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o)]$, coeficiente de dissipação não fotoquímica $[NPQ = (F_m - F_m')/F_m']$ e fluxo de ftons atual do FSII $[ETR = (\Delta F/F_m' \times PPDF \times 0.5$

x 0.84)]. Para determinar a taxa de transporte aparente a nível de FSII (ETR), 0.5 foi usado como a fração de energia de excitação distribuída ao FSII, e 0.84 foi usado como a fração de entrada da luz absorvida pelas folhas. O F_m , F_o e F_v representam a fluorescência máxima, mínima e variável após adaptação das folhas a 30 min de escuro, respectivamente, e aquelas de F_m' , F_o' e F_s representam a fluorescência máxima, mínima e no estado de equilíbrio dinâmico na presença de luz, respectivamente. As medidas realizadas na presença de luz foram feitas em folhas adaptadas às condições de irradiância prevalentes na câmara de crescimento, após exposição por 10s a um feixe de luz de $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecido pela própria fibra óptica do aparelho.

Após as medidas de fluorescência, foram realizadas as medidas de taxas de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E), com um Sistema Portátil de Fotossíntese (LI-6400XT, LI-COR, EUA) em folhas completamente expandidas submetidas à irradiância saturante ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fornecida por uma lâmpada de halogênio externa, para saturar os fotossistemas sem danos.

2.2.6. Peroxidação de lipídios (TBARS)

A peroxidação de lipídios foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme Heath e Packer (1968). Para isso, 0,1 g de folhas frescas foram macerados em almofariz na presença de N_2 líquido seguido da adição de TCA 5% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a $12.000 \times g$ durante 15 min em temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, 0,5 ml do sobrenadante foram adicionados a 2,0 ml da solução TCA 20% e TBA 0,5% (p/v) e aquecida em banho maria a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ em tubos hermeticamente fechados durante 1 hora. Em seguida a reação foi interrompida em banho de gelo, e foram realizadas leituras a 532 e 660 nm. O conteúdo de TBARS foi estimado utilizando o coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ após a subtração da absorbância obtida a 660 nm daquela a 532 nm.

2.2.7. Determinação do conteúdo de H_2O_2

O conteúdo de H_2O_2 foi determinado pelo método descrito por Gay et al. (1999). Neste ensaio, o peróxido de hidrogênio reage com Fe^{+2} a pH baixo, na presença do corante alaranjado de xilenol (XO) para a formação de Fe^{+3} . A concentração de Fe^{+3} gerada é calculada pelo aumento da absorbância, ocasionado pela formação do

complexo Fe-XO. Para isso, 500 mg de tecido fresco de folhas foram macerados na presença de nitrogênio líquido. Após a obtenção de farinha homogênea, 1,5 ml de tampão borato-bórax 50 mM pH 8,4, foram adicionados, seguido de maceração por mais 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 20 minutos, a 4 °C. Ao término, o sobrenadante foi coletado (H₂O₂ total) e o precipitado, descartado. Em seguida, alíquotas de 100 µl das amostras (diluídas, caso necessário) foram transferidas para tubos de ensaio e adicionado 900 µl de reagente contendo 0,25 mM de FeSO₄, 0,25 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,25 mM de H₂SO₄, 124 µM de alaranjado de xilenol e 99 mM de sorbitol. A mistura de reação foi incubada por 30 minutos, a 25 °C, e posteriormente, foram realizadas as leituras de absorbância, no comprimento de onda de 560 nm. As concentrações de H₂O₂ foram obtidas a partir de curva padrão e os dados serão expressos em µmol g⁻¹ MS.

2.2.8. Conteúdo de glioxilato

O conteúdo de ácido glioxilato foi determinado baseado em metodologias desenvolvidas por Hausler *et al.* (1996), a partir de extração por maceração de 100 mg MF em 1 ml de HCl 100mM. Os extratos foram centrifugados a 12.000 rpm/ 10 min/ 8 °C e o sobrenadante foi recolhido. Alíquotas de 200 µl do extrato foram acrescidas a 300 µl de Fenilhidrazina 1% em HCl 100mM e colocadas em banho- maria a 95°C por 2 min. A reação foi paralisada com banho de gelo e as leituras realizadas a 324 nm. O conteúdo de glioxilato foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar de 17 mM⁻¹ e expresso em µmol g⁻¹ MF min⁻¹.

2.2.9. Atividade da catalase

A atividade da catalase (CAT; EC: 1.11.1.6) foi determinada conforme Havir e McHale (1987). Alíquotas de 0,05 ml de extrato protéico foram adicionadas de 2,95 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 30 °C e acompanhado o decaimento da absorbância a 240 nm em espectrofotômetro durante 300 segundos, com leituras sucessivas a cada 30 seg. A atividade da enzima foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de 36 mM⁻¹ cm⁻¹, a 240 nm, para o H₂O₂ e expressa em µmol H₂O₂ g⁻¹ MF min⁻¹ ou de forma específica, µmol H₂O₂ mg⁻¹ prot. min⁻¹.

2.2.10. Curvas de resposta à CO₂

Foram realizadas curvas de resposta da fotossíntese à concentração de CO₂. A fotossíntese foi acompanhada em diversas concentrações de CO₂ na câmara de medida. Essas concentrações foram de 400, 300, 200, 100, 50, 400, 600, 800, 1200, 1600 e 2000 ppm. A partir dessa curva foram calculados a eficiência de carboxilação da rubisco (V_{cmax}), taxa de regeneração de RuBP (J_{max}), o ponto de compensação de CO₂, a fotossíntese máxima, a condutância do mesofilo (gm) e a respiração na presença de luz (Rd). Durante a curva de resposta ao CO₂, a radiação foi de 1000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (SHARKEY et al., 2007).

Para realização das duas curvas foi utilizado o IRGA (LI-6400XT, LI-COR, EUA) com suprimento de CO₂ e fonte de luz acoplados.

3. RESULTADOS

A alta intensidade de luz acentua a fotoinibição transiente e reduz a atividade do fotossistema II sob condições de deficiência hídrica em mudas de cajueiro

Para avaliar as respostas da atividade fotoquímica das mudas de cajueiro submetidas a seca em exposição a intensidade de luz crescente, foram medidos vários parâmetros da fluorescência da clorofila *a*. Tanto nas plantas controle como nas mudas expostas a seca foi verificada drástica queda da eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) em resposta ao aumento da intensidade luminosa, com registros de queda de 0.3 unidades, sugerindo forte indicativo de fotoinibição (Figura 3). O aumento de luminosidade não só causou reduções significativas na relação F_v/F_m como também na eficiência quântica efetiva (relação $\Delta F/F_m'$) do FSII (Figura 4B). Essa redução ocorreu associada com uma forte restrição da taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), principalmente nas plantas expostas a seca se comparado com aquelas irrigadas (Figura 4A). Esses resultados indicam que elevada radiação (acima de 1000 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) pode afetar intensamente o funcionamento do aparato fotoquímico da espécie, um efeito que é intensificado nas plantas expostas ao estresse hídrico.

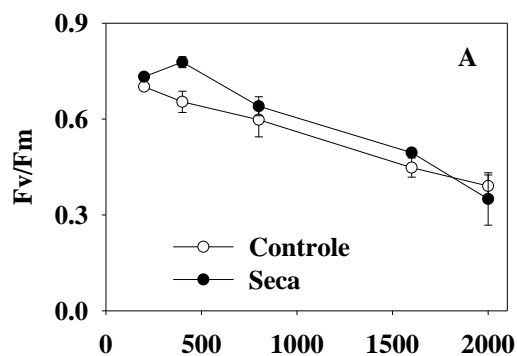


Figura 3. Mudanças na eficiência quântica potencial do fotossistema II (Fv/Fm) em mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas ou de estresse hídrico (suspensão da rega por 20 dias), após a exposição a intensidade crescente de luminosidade (200, 400, 800, 1600 e 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 24 horas de forma contínua. As medidas representam médias de três repetições \pm desvio padrão.

A dissipação do excesso de energia na forma de calor, pelo quenching não fotoquímico (NPQ), foi reduzida em respostas ao aumento da luminosidade nas plantas, na ausência e na presença do estresse de seca, sugerindo que esse mecanismo parece não ter tido grande importância para a proteção de fotodanos nessas condições (Figura 4C).

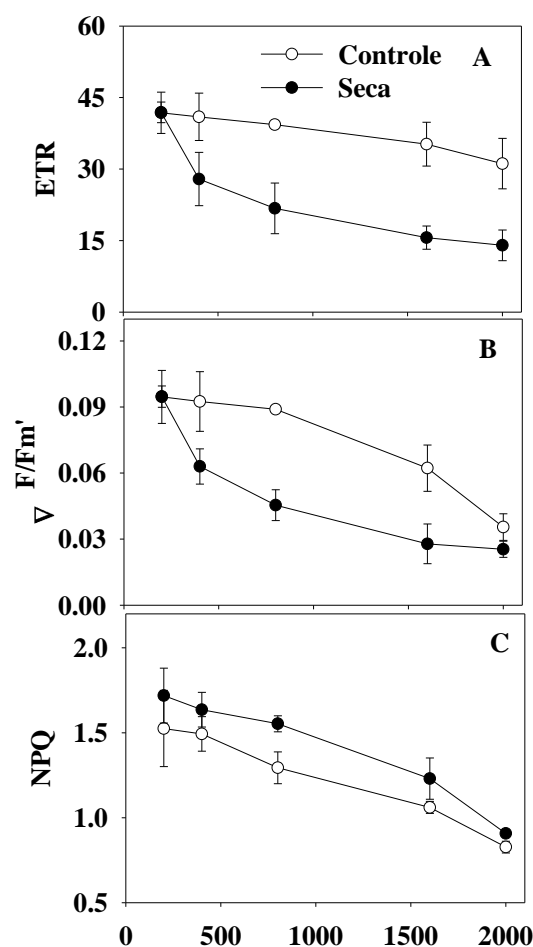


Figura 4. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: taxa aparente de transporte de elétrons (A), eficiência quântica efetiva do fotossistema II (B) e coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência (C) de mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas (círculo branco) ou suspensão de rega (círculo preto) e sob intensidades de luz crescentes (200, 400, 800, 1600 e 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), durante 24 horas. As medidas representam médias de três repetições \pm desvio padrão.

Pelo fato da luz não ter intensificado a fotoinibição nas mudas expostas a seca nós nos questionamos da reversibilidade dos danos causados pela luz e um experimento de recuperação do estresse de luz foi instalado para responder se os fotodanos causados pelo aumento da intensidade de luz poderiam ser reversíveis.

Conforme já havia sido observado, o estresse por luminosidade elevada causou aparente fotoinibição, como indicado pela redução da eficiência quântica potencial (relação F_v/F_m) (Figura 3). Na condição de luz moderada, plantas expostas a seca e irrigação não diferiram entre si. O efeito da luz não foi revertido nos dois tratamentos após recuperação. (Figura 5A). A alta luz induziu decréscimo significativo na eficiência fotoquímica potencial do

fotossistema II - FSII (F_v/F_m), sendo esse efeito ligeiramente maior nas mudas expostas a seca em comparação com mudas irrigadas (Figura 5A).

As medidas da taxa aparente do transporte de elétrons (ETR) e da eficiência quântica efetiva dos fotossistemas II ($\Delta F/F_m'$) nas plantas irrigadas indicaram que a luminosidade elevada reduziu os percentuais desses parâmetros em 16% e 50%, respectivamente, enquanto essas reduções atingiram cerca de 32% e 50% nas mudas previamente expostas ao estresse hídrico quando comparadas as plantas expostas a luz moderada (Figura 5B e 5C).

Nas plantas submetidas ao tratamento de recuperação para o estresse de radiação foi demonstrado tanto para os processos relacionados com a transferência de elétrons (indicado por ETR) quanto para os processos relacionados com a eficiência fotoquímica (indicados pela relação $\Delta F/F_m'$), que apenas o ETR, não se recupera do estresse de luminosidade elevada. O mais interessante é notar que nas plantas expostas ao estresse hídrico esses processos foram sempre mais afetados, tanto quando da exposição aos estresses quanto após o período de recuperação. Esses dados, em conjunto, indicam que os estresses por seca e por luminosidade excessiva isolados podem afetar severamente a capacidade dos processos fotoquímicos nessa espécie, e que esses efeitos são intensamente aumentados pela interação desses fatores abióticos (seca x luminosidade).

A dissipação do excesso de energia por meio da quenching não fotoquímico (NPQ) aparentemente teve pouco efeito na proteção fotoquímica em resposta ao estresse por elevada radiação, e esse efeito foi ainda mais restrito nas plantas expostas ao estresse hídrico (Figura 5D). Nas plantas irrigadas e naquelas pré-cultivadas na seca e expostas a luminosidade elevada ocorreu reduções significativas do NPQ em comparação com as plantas expostas a luminosidade moderada, destas, apenas as irrigadas recuperaram do estresse de luminosidade excessiva, retornando aos mesmos níveis daquelas expostas a luz moderada.

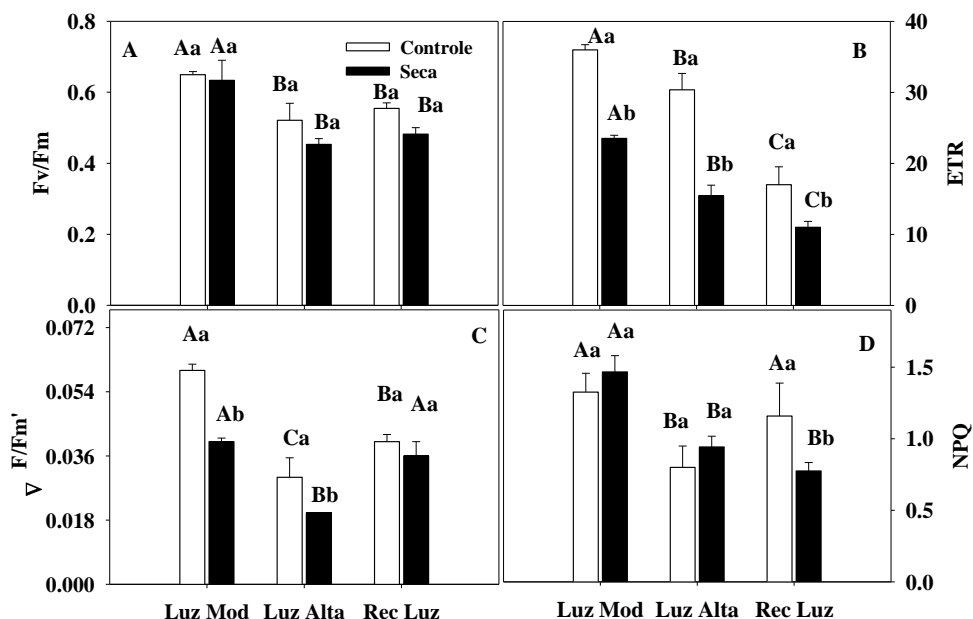


Figura 5. Medidas da eficiência quântica potencial do fotossistema II (A), da taxa aparente de transporte de elétrons (B), da eficiência quântica efetiva do fotossistema II (C) e do coeficiente de extinção não fotoquímica (D) em plantas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas (barras brancas) ou de seca (barras pretas) medidos após 24 h de exposição a luminosidade moderada ($700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ao estresse de radiação ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 24 horas após a recuperação do estresse de luz elevada. Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas pela mesma letra minúscula não diferem dentro de cada intensidade de luz, pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Não houve estresse oxidativo em plantas de cajueiro submetidos à seca em exposição a intensidades de luz crescentes.

As medidas dos conteúdos de dois indicadores da ocorrência de estresse oxidativo demonstram uma aparente ausência de danos oxidativos nos tecidos foliares de mudas controle e expostas à seca em resposta ao aumento da intensidade luminosa (Figura 6A e 6B). Os conteúdos de H_2O_2 e de TBARS nos tecidos foliares também foram mensurados no experimento de recuperação da intensidade luminosa e os resultados foram os mesmos, (redução dos conteúdos em respostas aos efeitos isolados dos estresses causados por luminosidade e por seca) (Figura 7A e 7B), sugerindo que não ocorreram danos oxidativos nessas condições.

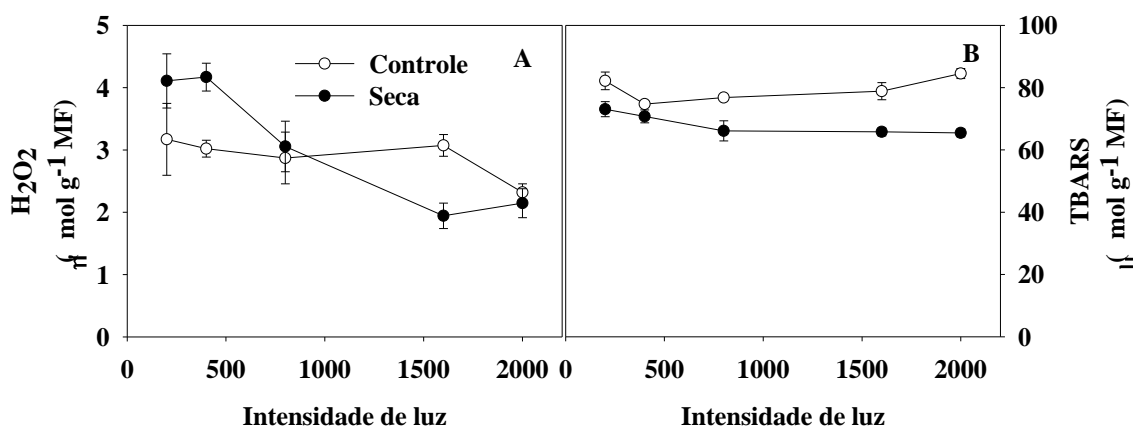


Figura 6. Conteúdo de peróxido de hidrogênio (A) e na intensidade da peroxidação lipídica (B) em folhas de plantas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas ou de estresse hídrico (suspensão da rega por 20 dias), após a exposição a intensidades crescentes de luminosidade (200, 400, 800, 1600 e 2000 μmol m⁻² s⁻¹) durante 24 horas de forma contínua. As medidas representam médias de três repetições ± desvio padrão.

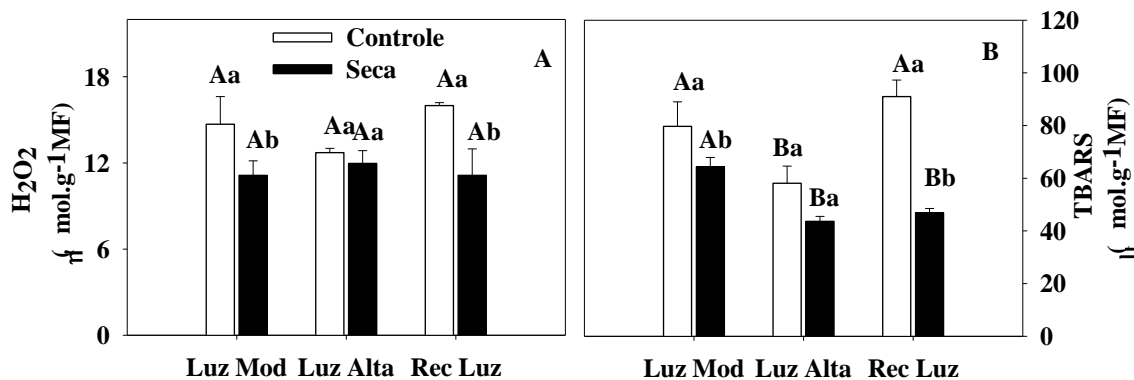


Figura 7. Conteúdos de peróxido de hidrogênio (A) e peroxidação de lipídios (B) em folhas mudas de cajueiro cultivadas sob condições irrigadas (barras brancas) ou de seca (barras pretas) após 24 h de exposição ao estresse de luminosidade elevada (2000 μmol m⁻² s⁻¹) e 24 horas após a recuperação ao estresse de luz. Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas pela mesma letra minúscula não diferem dentro de cada intensidade de luz, pelo teste de Tukey (P < 0.05).

O não aumento do conteúdo de H₂O₂ nas mudas de cajueiro pode ser explicado em parte pela atividade da CAT que foi relativamente maior nas mudas expostas ao estresse de luz se comparado com expostas a seca, indicado que atividade da enzima é bastante modulada pela luz (Figura 8). As enzimas catalases são as principais

peroxidases envolvidas na remoção do H_2O_2 produzido pela a atividade da GO nos peroxissomos (MITTLER, 2002; MHAMDI et al., 2010).

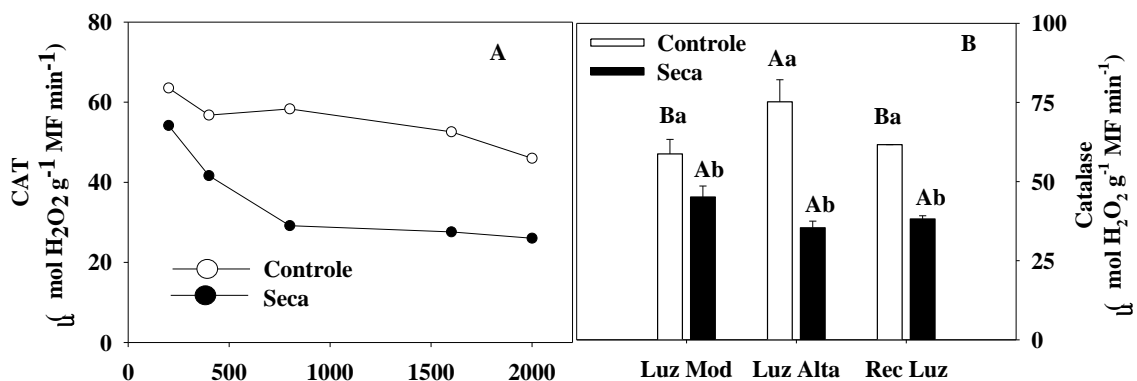


Figura 8. Atividade da enzima catalase, em folhas de plantas de cajueiro cultivadas sob condições irrigadas (círculo branco) ou sob suspensão da rega (círculo preto) e sob intensidades de luz crescentes (200, 400, 800, 1600 e 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A); em folhas de plantas de cajueiro cultivadas sob condições irrigadas (barras brancas) ou de seca (barras pretas) após 24 h de exposição ao estresse de luminosidade elevada (2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 24 horas após a recuperação ao estresse de luz (B). Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas pela mesma letra minúscula não diferem dentro de cada intensidade de luz, pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Caracterização morfo-fisiológica indica a susceptibilidade das plantas de cajueiro expostas a seca sob intensidades de luz crescente.

Análises comparativas de folhas maduras foram realizadas usando plantas controle e as que tiveram a suspensão da rega por 20 dias. Ambos os grupos de plantas foram submetidos à irradiância de luz crescente (200, 400, 800, 1600 e 2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) por 24 horas. Na figura 9, podemos observar alguns danos ocasionados pela seca. O déficit hídrico pode reduzir a fotossíntese de três maneiras e uma delas é pela redução da área foliar disponível pela interceptação da radiação solar. Em nossos resultados verificamos que a seca reduziu 51,5% a massa fresca das folhas (dados não mostrados), além disso, foi observado movimento foliar nas mudas submetidas a seca, que se mostraram mais inclinadas na vertical em relação às mudas controle, evidenciando uma possível fuga da exposição ao excesso de luz como mecanismo fotoprotetor em respostas a combinação da seca com o excesso de luz (Figura 9A).

Outro sintoma apresentado foi o roxeamento das folhas, indicando talvez a ativação do ciclo das antocianinas (Figura 9B-E). Esse acúmulo de pigmentos apresentou um comportamento antagônico. Quando as mudas eram expostas a luz baixa (200 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), a concentração de antocianina se mostrou bastante elevada apenas

nas mudas expostas a seca, contrariamente quando as mudas eram expostas a alta luminosidade a concentração de antocianinas era maior nas mudas irrigadas em comparação com aquelas pré- expostas a seca (Figura 9B-E e 11D).

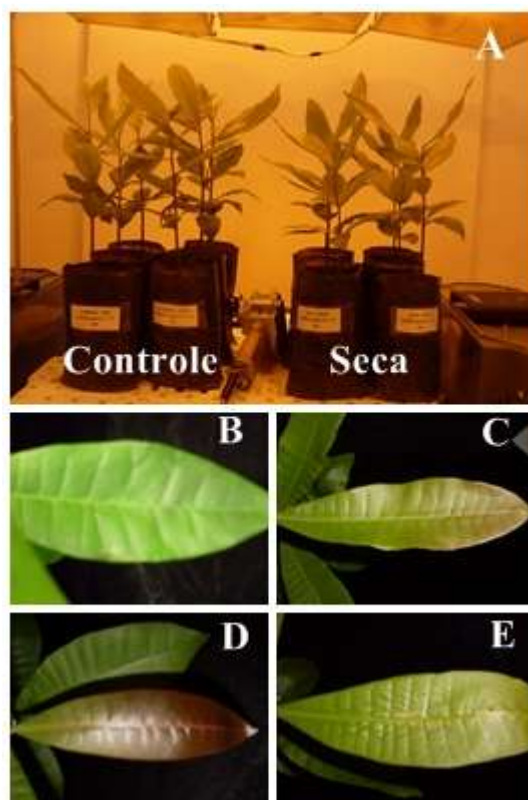


Figura 9. Aspectos morfológicos de mudas de cajueiro expostas aos estresses hídrico e de elevada radiação. A) Movimento foliar observado nas mudas submetidas a seca (folhas mais inclinadas na vertical) em relação as mudas controle (posição normal), evidenciando uma possível fuga da exposição ao excesso de luz como mecanismo fotoprotetor em respostas a combinação da seca com o excesso de luz; B-E) Maior acúmulo de pigmentos (coloração escura) no tecido foliar de mudas expostas a seca (C) em comparação ao controle (B) após a exposição a $200 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 24 horas; (D-E) Maior acúmulo de pigmentos (coloração escura) no tecido foliar em mudas controle (D) em relação as mudas estressadas pela seca (E) após a exposição a $2000 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 24 horas.

As plantas de cajueiro expostas à seca apresentaram redução do CRA foliar quando comparadas com o controle em todos os pontos da cinética de luz crescente (Figura 10A) e o dano de membrana, estimado com base na condutividade elétrica (CE), mostrou que a partir de 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de fótons de luz houve um efeito negativo sobre a integridade celular tanto das mudas controle como das mudas expostas a seca (Figura 10B).

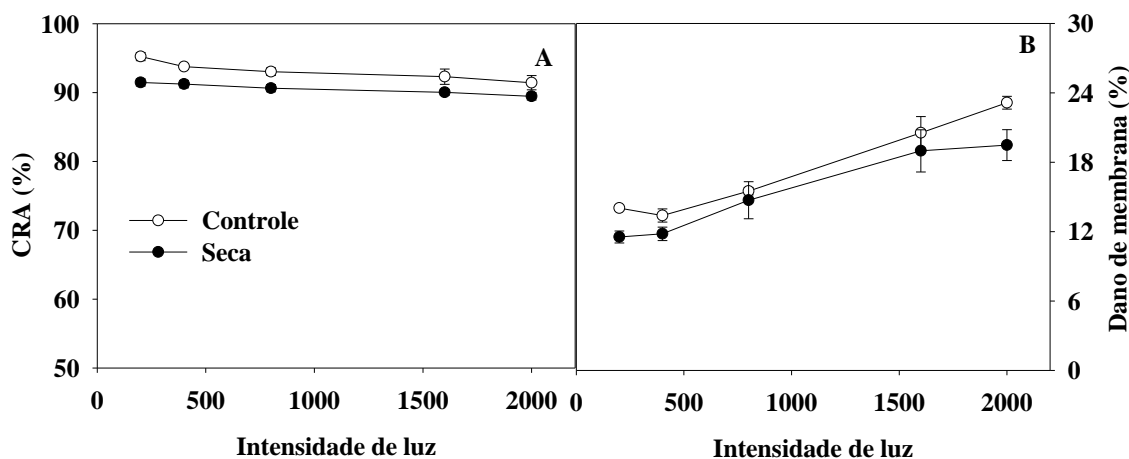


Figura 10. Mudanças do conteúdo relativo de água (A) e do dano de membrana (B) em folhas de mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas ou de estresse hídrico (suspensão da rega por 20 dias), após a exposição a intensidades crescentes de luminosidade (200, 400, 800, 1600 e 2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) durante 24 horas de forma contínua. As medidas representam médias de três repetições \pm desvio padrão.

Nas plantulas submetidas à seca, houve redução da clorofila total, como foram dos conteúdos de carotenóides e antocianinas em resposta ao aumento da intensidade luminosa (Figuras 11A-D). Contrariamente, nas mudas controle, os conteúdos de clorofilas totais não foram afetados em função do aumento da luminosidade, porém os conteúdos de carotenóides, e principalmente de antocianinas, demonstraram um significativo aumento em resposta ao aumento da luminosidade, sugerindo que nessas condições (irrigado) esses antioxidantes podem representar um importante mecanismo de proteção oxidativa. Esses resultados demonstram que nas mudas submetidas ao estresse hídrico a exposição a intensidades elevadas de luminosidade pode comprometer os conteúdos de clorofilas e conseqüentemente afetar o papel desses pigmentos nos processos de captação e utilização de energia luminosa.

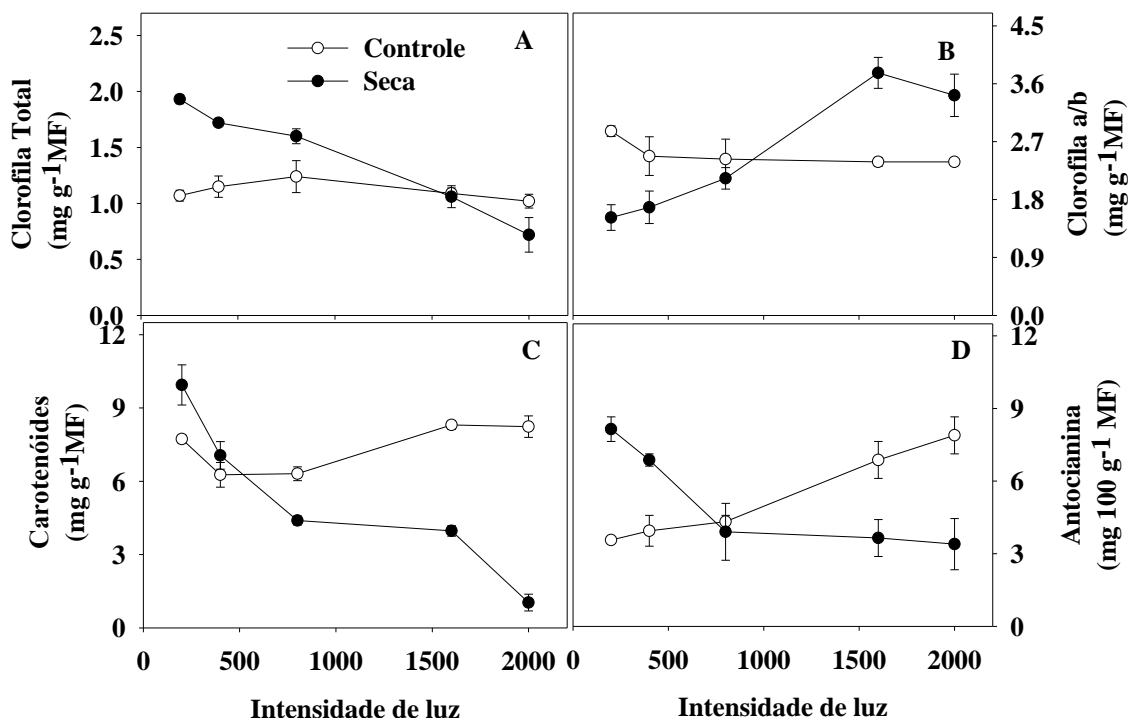


Figura 11. Mudanças nos conteúdos de clorofilas totais (A) e razão clorofilas *a/b* (B), e nos conteúdos dos pigmentos carotenóides (C) e antocianinas (D) em mudas de cajueiro cultivadas sob condições irrigadas ou de estresse hídrico (suspensão da rega por 20 dias), após a exposição a intensidades crescentes de luminosidade (200, 400, 800, 1600 e 2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante 24 horas de forma contínua. As medidas representam médias de três repetições \pm desvio padrão.

Fotorrespiração como mecanismo de fotoproteção utilizado pelas mudas de cajueiro submetidas à alta luz

O aumento da intensidade luminosa resultou em pouca variação no conteúdo de glioxilato, um importante indicador de atividade fotorrespiratória (Figura 12). A atividade da catalase, também outro importante indicador da atividade fotorrespiratória, respondeu ao aumento da intensidade de luz com um maior incremento na sua atividade, por outro lado, nas mudas expostas ao estresse de seca, o aumento da intensidade luminosa ocasionou pouco aumento da atividade desta enzima sugerindo que na condição de luminosidade elevada, as mudas irrigadas tiveram uma maior atividade fotorrespiratória se comparado com aquelas submetidas a seca (Figura 8 A e 8B).

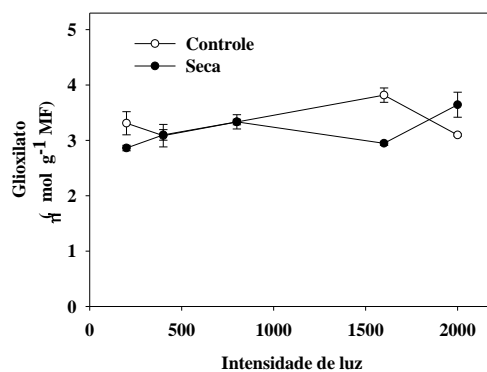


Figura 12. Conteúdo de glioxilato em mudas de previamente cajueiro cultivadas sob condições irrigadas (círculo branco) ou sob suspensão da rega (círculo preto) e sob intensidades de luz crescentes (200, 400, 800, 1600 e 2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). As medidas representam médias de três repetições \pm desvio padrão.

4. DISCUSSÃO

As plantas de cajueiro apresentaram fotoinibição em resposta ao aumento da intensidade luminosa, resposta esta que foi intensificada nas mudas submetidas ao estresse hídrico. Em condições extremas de alta luz, o aparato fotossintético pode ser danificado de forma irreversível. Uma das estratégias de sobrevivência das mudas expostas a alta luz é a eliminação do excesso de energia absorvida na forma de calor (dissipação térmica), a qual pode ser medida como o quenching não fotoquímico (NPQ) a partir da fluorescência da clorofila *a*. Entretanto, neste estudo essa proteção não pode ser atribuída a dissipação de energia por meio do NPQ, conforme mostrado nas figuras 4E e 5D.

Associado a mecanismos de dissipação do excesso de energia, por meio do NPQ, outros processos metabólicos como a fotorrespiração e a proteção oxidativa, conferidas por enzimas antioxidantes, podem contribuir para evitar foto-danos em plantas em condição de excesso de luminosidade. Aqui, o excesso de luminosidade também não induziu estresse oxidativo, conforme indicado pelo conteúdos de TBARS e de H_2O_2 (Figuras 6 e 7). Esses dados sugerem que a espécie é capaz de apresentar mecanismos de foto-proteção eficientes para evitar os foto-danos nessas condições. Os resultados reforçam assim a hipótese de que essa espécie deve induzir outros mecanismos de foto-proteção capazes de lidar com o excesso de energia luminosa, ao

ponto de evitar a ocorrência de danos oxidativos, mesmo frente a combinação de seca com luminosidade elevada.

A fotorrespiração pode ter tido esse papel de proteção frente a esses estresses de seca combinado a luz alta. É sabido que a atividade fotorrespiratória é considerada uma via metabólica que pode atuar como dreno de elétrons durante condições de restrição do processo de fotossíntese (PETERHANSEL e MAURINO, 2010). A fotorrespiração representa um importante dreno de elétrons sob condições em que ocorre estímulo da atividade de oxigenase da ribulose 1-5 bifosfato carboxilase oxigenase (FOYER et al., 2009), pelo consumo direto/indireto de poder redutor (NADPH) e consequente aumentos da relação $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, auxiliando na redução de sobrecarga da CTE cloroplástica (FOYER e NOCTOR, 2000). Por esse mecanismo a fotorrespiração pode atenuar a produção excessiva de EROs, embora represente *per si* a mais importante via metabólica produtora de H_2O_2 , uma importante espécie reativa de oxigênio, na célula vegetal (TAKAHASHI e BADGER, 2010).

Nas plantas irrigadas e expostas a alta luz, uma discreta, porém maior, atividade de fotorrespiração pode ter atuado como um mecanismo de dissipação de elétrons, o que teria restringido a produção de EROs e conseqüentemente atenuando os danos oxidativos. Além disso, o resultado inalterado do conteúdo de peróxido de hidrogênio pode sugerir uma sincronia entre as atividades de GO e de catalases (CAT). Conforme observado na figura 8, a atividade da CAT foi relativamente maior nas mudas irrigadas e expostas a luminosidade elevadas se comparado com aquelas submetidas a seca. Esse resultado pode explicar a ocorrência da maior atividade de CAT associada com o não aumento do conteúdo de H_2O_2 nas mudas irrigadas sob condição de luz alta. As enzimas catalases são as principais peroxidases envolvidas na remoção do H_2O_2 produzido pela atividade da GO nos peroxissomos (MITTLER, 2002; MHAMDI et al., 2010).

A proteção oxidativa celular é conferida por uma integração envolvendo protetores de natureza enzimática e não enzimática (MØLLER et al., 2007). Como demonstrado acima, a CAT apresentou papel importante na proteção contra o excesso de H_2O_2 gerado em função da atividade fotorrespiratória, particularmente nas mudas expostas ao estresse de luz isolado. Além dessa proteção, foi observada uma significativa redução no conteúdo de clorofilas, os principais pigmentos envolvidos na captação da energia luminosa para os processos fotoquímicos, principalmente nas mudas sob estresse de seca (Figura 10). Assim, essa redução no teor de clorofilas pode

representar, pelo menos em parte, um mecanismo de restrição na captação de energia e conseqüente atenuação dos fotodanos nessas condições.

Essa ausência de foto-danos nas mudas de cajueiro expostas ao excesso de luz isolada, ou em combinação com a seca, após 24 horas de tratamento contínuo de luz mostrou um resultado conflitante. Essa resposta nos levou a levantar a hipótese de que a indução de uma nova homeostase metabólica, possivelmente conferida por mecanismos foto-protetores presentes nessa espécie, foram responsáveis por essa efetiva proteção celular mesmo na ausência de respostas fotoquímicas diretamente relacionadas com a proteção à foto-danos, tais como a indução do NPQ. Sugerimos que a fotoinibição causada pela luminosidade moderada e elevada poderia fornecer um mecanismo para a dinâmica da regulação do aparato fotossintético, evitando os foto-danos em resposta ao aumento do tempo de exposição à luz elevada.

Referências

- ANDERSON, B.; BARBER, J. Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. In: Baker NR, editor. **Photosynthesis and the environment: advance in photosynthesis research**. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht; p. 102–21,1996.
- BAKER, A.L.; TOLBERT, N.E. Glycolate oxidase (ferredoxin-containing form). **Methods in Enzymology**, v.9, 339-340, 1966.
- BAKER, N.R. Possible role of photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. **Physiol Plant**;81:563–70, 1991.
- BAKER, N.R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **J. Exp. Bot.** 55:1607–21, 2004.
- BJÖRKMAN, O.; POWLES, S.B. . Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. **Planta** 161, 490–504, 1984.
- BLINDOW, I.; DIETRICH, J.; MÖLLMANN, N.; SCHUBERT, H. Growth, photosynthesis and fertility of *Chara aspera* under different light and salinity conditions. **Aquatic Botany**, v. 76, Issue 3, Pages 213–234, 2003.
- CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of botany**, v. 103, p. 551–60. 2009.
- CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture not by affecting ATP synthesis. **Trends Plant Science**, v.5, p. 187-188, 2000.
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS III, W.W. Carotenoid composition in sun and shade leaves of plants with different life forms. **Plant, Cell and Environment** 15, 411–19, 1992.
- FIDALGO, F., SANTOS, A., SANTOS, I. e SALEMA. R. Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. **Annals Applied Biology**, v. 145, p. 185-192, 2004.
- FLEXAS, J.; BARON, M.; BOTA, J.; DUCRUET, JEAN-MARC; GALLE, A.; GALMÉS, J.; JIMENEZ, M.; POU, A.; RIBAS-CARBÓ, M.; SAJNANI, C.; TOMÁS, M.; MEDRANO, H. Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid Richter-110 (*V. berlandieri*·*V. rupestris*). **Journal of Experimental Botany**, vol. 60, No. 8, pp. 2361–2377, 2009
- FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Energy dissipation in C₃ plants under drought. **Funct Plant Biol**, v. 29, p. 1209–1215. 2002.
- FOYER, C.H. e NOCTOR,G.Oxygen processing in photosynthesis. **New Phytologist**, v. 146, p. 359-388, 2000

FOYER, C.H., BLOOM, A.J., QUEVAL, G., NOCTOR, G. Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. **Annual Review Plant Biology**. v. 60, p. 455-484, 2009.

GAY, C., COLLINS, J. e GEBICKI, J. M. Hydroperoxide Assay with the Ferric-Xylenol Orange Complex. **Analytical Biochemistry**, v. 273, p.149–155, 1999.

GIARDI, M.T.; CONA, A.; GEIKEN, B.; KUCĚRA, T.; MASOJÍDEK, J.; MATTOO, A.K.; Long-term drought stress induces structural and functional reorganization of photosystem II, **Planta** 199 118–125, 1996.

GOVINDJEE. Chlorophyll a fluorescence: a bit of basics and history. In: Papageorgiou, G.G.; Govindjee (Eds.) Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. **Dordrecht: Springer**, p. 1-41. 2005.

HÄUSLER, R.E.; BAILEY, K.J.; LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C. Control of photosynthesis in barley mutants with reduced activities of glutamine synthetase and glutamate synthase. III. Aspects of glyoxylate metabolism and effects of glyoxylate on the activation state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase. **Planta** 200, 388–396, 1996.

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in Tobacco-Leaves. **Plant Physiology**. v. 84, p. 450-455, 1987.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys**. v. 125, p. 189-198. 1968.

KASAHARA, M.; KAGAWA, T.; OIKAWA, K.; SUETSUGU, N.; MIYAO, M.; WADA, M. Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. **Nature**, v. 420, p. 829–832, 2002.

JIAO, S.; EMMANUEL, H.; GUIKEMA, J. A. High light stress inducing photoinhibition and proteindegradation of photosystem I in Brassica rapa. **Plant Science** v. 167, p. 733–741, 2004.

KEREN, N.; KRIEGER-LISZKAY, A. Photoinhibition: molecular mechanisms and physiological significance. **Physiologia plantarum**, v. 142, p. 1–5. doi:10.1111/j.1399-3054.2011.01467.x 2011.

LEES, D.H.; FRANCIS, F.J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **HortScience**, v.7, p.83-84, 1972.

LICHTENTHALER , H.K Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymol** 148: 350–382 , 1987.

LONG, S.P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWISKI, P.G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Ann Rev. Plant. Physiol.* **Plant. Mol. Biol.**, v. 45, p. 633-661. 1994.

MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; CHAOUCH, S.; VANDERAUWERA, S.; van BREUSEGEM, F.; NOCTOR, G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-24, 2010.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci** 7: 405–410, 2002.

MØLLER, I. M., JENSEN, P. E., HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual review of plant biology**, v. 58, p. 459–81. 2007.

MURCHIE, E.H.; NIYOGI, K.K. Manipulation of photoprotection to improve plant photosynthesis. **Plant Physiol** 155: 86–92, 2011.

NAYYAR, H.; GUPTA, D. Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: association with oxidative stress and antioxidants, **Environ. Exp. Bot.** 58:106–113, 2006.

NILKENS, M.; KRESS, E.; LABREV, P.; MILOSLAVINA, Y.; MÜLLER, M.; HOLZWARTH, A. Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady state conditions in Arabidopsis. **Biochim Biophys Acta**;1797:466–75, 2010.

OSMOND, C.B.; GRACE, S.C. Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? **Journal of Experimental Botany**, v. 46, p. 1351-1362, 1995

PETERHÄNSEL, C.; MAURINO, V. G. Photorespiration redesigned. **Plant physiology**, v. 155, p. 49–55. 2010.

POULSON, M. E.; BOEGER, M. R. T.; DONAHUE, R. A. . Response of photosynthesis to high light and drought for *Arabidopsis thaliana* grown under a UV-B enhanced light regime. **Photosynthetic Research**, v. 90, p. 79-90, 2006

POWLES, S. B.; BERRY, J. A.; BJÖRKMAN, O. Interaction between light and chilling temperature on the inhibition of photosynthesis in chilling-sensitive plants. **Plant, Cell & Environment**, v.6, p.117-123, 2006.

BJÖRKMAN, O.; POWLES, S. B. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. **Planta**, Volume 161, Issue 6, pp 490-504, 1984.

SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. 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, p. 49-70. 1994.

SHANAHAN, J.F., EDWARDS, I.B., QUICK, J.S., FENWICK, J.R. Membrane thermostability and heat tolerance of spring wheat. **Crop Sci**. v. 30, p. 247-251. 1990.

SHARKEY, T.D.; BERNACCHI, C.J.; FARQUHAR, G.D.; SINGSAAS, E.L. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C(3) leaves. **Plant Cell Environment**, v. 30: 1035–1040, 2007

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

TAKAHASHI, S.; BAUWE, H.; BADGER, M. Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair process and not acceleration of damage process in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol**, v. 144, p. 487–494. 2007.

TAKAHASHI, S.; MURATA, N. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? **Trends in plant science**, v. 13, p. 178-82. 2008.

VAN KOOTEN O.; SNEL J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v. 25,p.147-150, 1990.

WU, J.; NEIMANIS, S.; HEBER, U. Photorespiration is more effective than the mehler reaction to protect the photosynthetic apparatus against photoinhibition. **Bot. Acta** 104, 283-291, 1991.

YANG, X., CHEN, X., GE, Q., LI, B., TONG, Y., ZHANG, A., LI, Z., KUANG, T., LU, C. Tolerance of photosynthesis to photoinhibition, high temperature and drought stress in flag leaves of wheat: A comparison between a hybridization line and its parents grown under field conditions. **Plant Science**, v.171, p.389-397, 2006.

YIN, Y.; LI, S.; LIAO, W.; LU, Q.; WEN, X.; LU, C. Photosystem II photochemistry, photoinhibition, and the xanthophyll cycle in heat-stressed Rice leaves. **Journal of Plant Physiology**, 167, p 959-966, 2010.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought and stress tolerance. **Bulg. J. Plant Physiol.**, SPECIAL ISSUE , 187–206, 2003.

ZHANG, L.T.; ZHANG, Z.-S.; GAO, H.Y.; XUE, Z.C.; YANG, C.; MENG, X.L.; MENG, Q.W. Mitochondrial alternative oxidase pathway protects plants against photoinhibition by alleviating inhibition of the repair of photodamaged PSII through preventing formation of reactive oxygen species in *Rumex K-1* leaves. **Physiologia plantarum**, v. 143, p. 396–407. 2011.

ZLATEV, Z.S.; YORDANOV, I.T. Effect of soil drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in bean plants. **Bulg. J. Plant Physiol.**, 30: 3-18. 2004.

Capítulo IV

Respostas da atividade fotoquímica à exposição a luz moderada e elevada e seus efeitos na fotoproteção de mudas de cajueiro sob deficiência hídrica

Respostas da atividade fotoquímica à exposição a luz moderada e elevada e seus efeitos na foto-proteção de mudas de cajueiro sob deficiência hídrica

Lima, C. S.^a, Ferreira-Silva, S. L.^a, Lima Neto, M. C.^a, Fontenele, A. V.^a, Silveira, J. A. G.^{a*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Metabolismo de Plantas, Universidade Federal do Ceará, CP 6004, CEP 60455-970, Fortaleza, Ceará, Brazil.

*Autor Correspondente: Tel.: +55 8533669821; fax: +55 8533669821

E-mail: silveira@ufc.br (Silveira JAG.)

Resumo

Neste estudo, pretendeu-se analisar o desempenho fotossintético e o metabolismo oxidativo em plantas de cajueiro submetidas ao estresse hídrico combinado com dois níveis de irradiância (moderado e elevado). Foram determinados atividade fotoquímica, conteúdo de pigmentos, peroxidação lipídica, detecção *in situ* de peróxido e superóxido e atividades enzimáticas de peroxidase do ascorbato e dismutase do superóxido. Plantas de cajueiro submetidas a suspensão de rega por 20 dias foram expostas aos diferentes tratamentos de luz. A fluorescência da clorofila foi determinada a cada três horas do tempo de exposição à luz e as análises bioquímicas ao final de cada tratamento de luz. As plantas de cajueiro irrigadas apresentaram fotoinibição apenas quando as plantas foram expostas a luminosidade elevada, ao contrário das plantas submetidas ao estresse hídrico, que já apresentavam ocorrência de fotoinibição a partir de seis horas de exposição a luz moderada, demonstrando que a luminosidade elevada *per se* afeta esse parâmetro, contudo não exacerba o efeito negativo sobre a condição de seca. A exposição à luz causou danos estruturais e disfunção da atividade do FSII, observados pelos valores de F_0 e F_m . Esses danos foram correlacionados com elevados níveis de degradação da proteína D1, particularmente em mudas expostas a seca e submetidas à luz elevada. Isso pode ter contribuído para diminuição na eficiência do FSII, observado pelos valores de $\Delta F/F_m'$ e ETR, nessas condições. Sob condições de seca o FSI também apresentou queda na sua eficiência, bem como uma menor taxa de transporte de elétrons. O imunoblot da PC, proteína responsável pelo fluxo de elétrons entre o FSII e

FSI, revelou menor expressão dessa proteína nas plantas expostas à seca combinadas com alta luz. O coramento por NBT revelou que nas mudas submetidas à seca a formação do radical O_2^- foi bem mais retardada, possivelmente pelo menor fluxo de elétrons observados nestas plantas. Esse conjunto de dados nos sugerem que a fotoinibição teve um papel importante para a proteção fotooxidativa atribuído ao efeito desse processo na redução da atividade do FSII e consequente menor atividade fotoquímica, o que resultou em menor transferência de elétrons. Essa sugestão foi ainda reiterada no presente estudo com base na redução do conteúdo da proteína D1, um dos principais componentes estrutural e funcional do FSII, e da plastocianina (PC), outro importante carreador de elétrons. A modulação do conteúdo dessas proteínas pode ter contribuído para restringir a formação de EROs e consequente danos oxidativos sob condições indutoras de estresse fotooxidativos, como a seca associada com luminosidades elevadas, nessa espécie.

Palavras-chaves: Estresse de seca, Estresse de Luminosidade Elevada, Fotoinibição, Fotossistema I, Fotossistema II e Fotoproteção.

Responses of photochemical activity to exposure to moderate and high light and its effects in the photo-protection of cashew seedlings under water deficit

Lima, C. S.^a, Ferreira-Silva, S. L.^a, Lima Neto, M. C.^a, Fontenele, A. V.^a, Silveira, J. A. G.^{a*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Metabolismo de Plantas, Universidade Federal do Ceará, CP 6004, CEP 60455-970, Fortaleza, Ceará, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55 8533669821; fax: +55 8533669821

E-mail: silveira@ufc.br (Silveira JAG.)

Abstract

In this study, we sought to analyze the photosynthetic performance and oxidative metabolism in cashew plants subjected to drought stress combined with two levels of irradiance (moderate and high). Photochemical activity, pigment content, lipid peroxidation, in situ detection of superoxide and peroxide and enzymatic activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase were determined. Cashew plants subjected to withholding the water supply for 20 days were exposed to different light treatments. The chlorophyll fluorescence was measured every three hours of exposure time to the light and biochemical analyzes after each light treatment. The cashew plants irrigated presented photoinhibition only when plants were exposed to high luminosity, unlike the plants subjected to drought stress, which has presented photoinhibition after six hours of exposure to moderate light, demonstrating that the high light per se cause affect about this parameter, however does not exacerbate the adverse effect on the drought stress condition. Light exposure caused structural damage and dysfunction of PSII activity, observed by the values of F_0 and F_m . These damages have been correlated with high levels of D1 protein degradation, particularly seedlings exposed to drought stress and subjected to high light stress. This may have contributed to a decrease in efficiency of PSII, observed by values of $\Delta F/F_m$ and ETR in these circumstances. Under drought stress condition the PSI also decreased in efficiency as well as presented lower electron transport rate. The immunoblot of the PC, this protein is responsible for electron flow between PSII and PSI, revealed lower expression of this protein in plants exposed to drought combined with high light. The staining by NBT revealed in this seedlings subjected to drought stress the O_2^- radical formation was much delayed, possibly due to lower electron flow observed in these plants. This set of data

suggests that the photoinhibition had an important role to photooxidative protection attributed to the effect of this process on the reduction of PSII activity and consequent lower photochemical activity, which resulted in lower transfer of electrons. This suggestion was further enhanced in this study based on the reduction of the content of D1 protein, a major structural and functional component of PSII, and plastocyanin (PC), another major carrier of electrons. The modulation of the content of these proteins may have contributed to restrict the formation of ROS and consequent oxidative damage under photooxidative stress-inducing conditions such as drought associated with high luminosities, in this species.

Key words: Drought stress, High Light Stress, Photoinhibition, Photosystem I, Photosystem II and Photoprotection.

1. INTRODUÇÃO

A fotoinibição é um processo fisiológico induzido em plantas quando os fótons absorvidos pelo aparato fotossintético excedem sua utilização na assimilação de carbono (BAKER e ROSENQVIST, 2004; MURCHIE e NIYOGLI, 2011). Usualmente, é observada uma depressão da capacidade fotossintética induzida pela luz (ANDERSON e BARBER, 1996) e isso afeta tanto a produtividade como o crescimento (ARO et al., 1993; LONG et al., 1994). A fotoinibição é reforçada quando as plantas são expostas a estresses ambientais como seca, salinidade, altas temperaturas e alta irradiância (MURATA et al., 2007). Seca severa restringe a produtividade e a distribuição territorial de plantas. Sob condições de campo, é geralmente caracterizada pela combinação de escassez de água, alta temperatura e alta irradiância (FLEXAS et al., 2002).

Estresse de seca leva a uma redução substancial na taxa fotossintética, devido ao fechamento estomático, que restringe a difusão do CO₂ na folha (CORNIC e MASSACCI, 1996; FLEXAS e MEDRANO, 2002), ou fatores não estomáticos, tais como inibição da Rubisco ou síntese de ATP (LAWLOR e CORNIC, 2002; FLEXAS e MEDRANO, 2002). Em consequência, a deficiência de CO₂ e ATP assim como a inibição da atividade da Rubisco diminuirá a oxidação de NADPH no ciclo de Calvin. Consequentemente, o acceptor primário de elétrons, NADP⁺, não é suficientemente acessível, e uma baixa irradiância é requerida para saturar a fotossíntese sob deficiência hídrica. Em contrapartida, quando a alta irradiância é imposta a plantas submetidas à seca, a suscetibilidade a fotoinibição pode ser aumentada (FLEXAS e MEDRANO, 2002).

Há diversos mecanismos de proteção da fotoinibição, tais como dissipação não fotoquímica, transporte de elétron para o oxigênio, nos processos de fotorrespiração e/ou reação de Mehler (ZHOU et al., 2007), e mudanças de concentração nos conteúdos de clorofila (PASTENES et al., 2005). O reforço da capacidade fotoprotetora, que compete com a fotoquímica pela energia absorvida, resulta em uma fraca regulação da fotossíntese, que é mostrada pela diminuição do rendimento quântico do fotossistema II (GENTY et al., 1989). No entanto, tem sido documentada em plantas nativas de regiões do semiárido, que o transporte de elétrons está associado com processos de elevada absorção de O₂ (reação de fotorrespiração e Mehler), o que, presumivelmente, mantém

um elevado ΔpH e NPQ, dissipando excesso de luz como calor e fornecendo fotoproteção ao aparato fotossintético (ZHOU et al., 2007).

Tanto a disponibilidade de luz como a de energia para biossíntese de moléculas são fatores críticos para o reparo da função fotossintética (ANDERSON et al., 1995; HUNER et al., 1998). A exposição a baixa ou moderada irradiância durante tratamento de curto prazo combinado com outros estresses ambientais é muitas vezes benéfico para as plantas, diminuindo a extensão de danos causados ao aparato fotossintético, especialmente o fotossistema II (FSII) (HAVAUX, 1994; HAVAUX et al, 1991).

A exposição à luminosidade elevada, no entanto, aumenta a magnitude de inibição da reparação dos danos ocasionados ao aparato fotossintético induzida por outros estresses ambientais (AL-KHATIB e PAULSEN, 1989; KRESLAVSKI e KHRISTIN, 2003). Por exemplo, a deficiência hídrica pode causar uma super redução ao longo da cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos (GOLDING e JOHNSON, 2003), limitando o fluxo de elétrons na CTE. O fluxo de elétrons cíclico em torno do FSI desempenha um papel importante como uma fonte extra de ATP, requerido para a síntese de proteínas e de reparação total do FSII (ALLAKHVERDIEV et al., 2005). Este pode ser um motivo para o qual o transporte de elétrons cíclico protege FSII da fotoinibição (MIYAKE e OKAMURA, 2003) visto que o acúmulo de elétrons ao redor do FSI pode levar a maior formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (NISHIYAMA et al., 2006). As EROS podem não só danificar diretamente o aparato fotossintético (ASADA, 1999; CHOW e ARO, 2005), mas também inibir a síntese proteica, a qual é necessária para a reparação de fotodano (NISHIYAMA et al. 2001, 2005, 2006, 2011, OHNISHI et al. 2005).

Neste estudo foram examinadas as respostas do metabolismo fotossintético ao estresse hídrico combinados com dois níveis de irradiância em folhas de cajueiro e como o aparato fotossintético lida com o excesso da entrada de energia. Nós estabelecemos a inter-relação entre a atividade e a tolerância do aparato fotossintético em plantas pré-expostas a deficiência hídrica. Nós hipotetizamos que a fotoinibição causada pela luminosidade elevada poderia fornecer um mecanismo para a dinâmica da regulação do aparato fotossintético, evitando os foto-danos em resposta ao aumento do tempo de exposição a luz elevada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Aplicação dos tratamentos de seca e luminosidade (alta e moderada) em curto intervalo de tempo

As plantas utilizadas nesse estudo foram obtidas como descrito no Experimento I e II, do capítulo anterior. Objetivando-se obter uma cinética de todos os parâmetros fotoquímicos, mas principalmente, a do excesso de energia e encontrar o período de tempo onde houve a máxima dissipação desse excesso de energia, plantas irrigadas e submetidas à seca foram expostas a duas intensidades de luz (700 e $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), desta vez em uma escala de tempo menor até 12h, conforme planejamento apresentado abaixo.

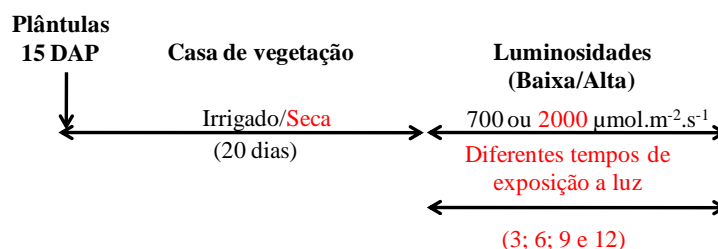


Figura 1. Desenho experimental utilizado para a exposição das mudas aos efeitos dos estresses de seca e de radiação. As plantas cultivadas em condições controle (irrigadas) ou expostas a seca, em casa de vegetação, foram submetidas a duas intensidades de luz (700 e $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 12 horas, com medições dos parâmetros fotoquímicos realizadas a cada 3h. Para a exposição aos tratamentos de luminosidade as mudas foram acondicionadas no Fitotron, com umidade relativa de $60\% \pm 5$ e temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$.

Delineamento estatístico e análise dos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com os tratamentos dispostos num fatorial $2 \times 2 \times 4$, dois níveis de umidade, irrigado e seca, duas intensidades de luz (700 e $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 4 intervalos de tempo: 3, 6, 9 e 12h. Cada tratamento foi representado por cinco repetições, num total de 80 parcelas experimentais. Os dados foram submetidos ao teste F a 0,05 de significância, por análise de variância, e as médias das variáveis submetidas ao teste de Tukey no mesmo nível de probabilidade.

2.2. Medidas realizadas

2.2.1. Medidas de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila

As medidas da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas em folhas maduras e completamente expandidas através do método do pulso de saturação (SCHREIBER *et al.*, 1994; van KOOTEN e SNEL, 1990) com um fluorômetro modulado (LI-6400-40, LI-COR, EUA), acoplado com IRGA. A partir dos dados de fluorescência foram calculados: eficiência quântica máxima do FSII, pela relação $[F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m]$, a eficiência quântica efetiva do FSII $[\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s)/F_m']$, coeficiente de dissipação fotoquímica $[qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')]$, coeficiente de dissipação não fotoquímica $[NPQ = (F_m - F_m')/F_m']$ e fluxo de ftons atual do FSII $[ETR = (\Delta F/F_m' \times PPDF \times 0.5 \times 0.84)]$. Para determinar a taxa de transporte aparente a nível de FSII (ETR), 0.5 foi usado como a fração de energia de excitação distribuída ao FSII, e 0.84 foi usado como a fração de entrada da luz absorvida pelas folhas. O F_m , F_o e F_v representam a fluorescência máxima, mínima e variável após adaptação das folhas a 30 min de escuro, respectivamente, e aquelas de F_m' , F_o' e F_s representam a fluorescência máxima, mínima e no estado de equilíbrio dinâmico na presença de luz, respectivamente. As medidas realizadas na presença de luz foram feitas em folhas adaptadas às condições de irradiância prevalentes na câmara de crescimento, após exposição por 10s a um feixe de luz de $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecido pela própria fibra óptica do aparelho.

Após as medidas de fluorescência, foram realizadas as medidas de taxas de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E), com um Sistema Portátil de Fotossíntese (LI-6400XT, LI-COR, EUA) em folhas completamente expandidas submetidas à irradiância saturante ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fornecida por uma lâmpada de halogênio externa, para saturar os fotossistemas sem danos.

2.2.2. Extração de proteínas

A extração de proteína foi realizada conforme Zimmermam *et al.*, (2006), com modificações. Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N_2 líquido seguido da adição de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), contendo 30 mM de DTT, 20% de glicerol e 3% de PEG-6000. Após a extração, o extrato foi centrifugado a $14.000 \times g$ em temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação das atividades enzimáticas, zimogramas e

imunoblots. O conteúdo de proteínas solúveis foi determinado conforme Bradford (1976) e estimado com base em curva padrão, utilizando BSA.

2.2.3. Imunoblot para Rubisco, plastocianina, proteína D1 e catalase

As mudanças no conteúdo da Rubisco, plastocianina, proteína D1 e catalase foram avaliadas por imunoblot, utilizando anticorpo específico contra a subunidade maior da rubisco, plastocianina, fragmentos C-terminal de PsbA e catalase respectivamente. Após a separação das proteínas por eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE) 12,5% (Rubisco, proteína D1 e catalase) e 15% (plastocianina), foi realizada uma eletrotransferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose em sistema úmido. Em seguida foi realizada a detecção das subunidades maior da Rubisco (SMR), plastocianina e fragmentos PsbA C-terminal por imunoblot utilizando os seguintes anticorpos específicos: (R4404, Sigma), (AS06 141, Agrisera), (AS05 084, Agrisera) e (AS09 501, Agrisera), respectivamente. Na revelação foi empregado um anticorpo secundário IgG (A 9046, Sigma) conjugado com peroxidase alcalina, conforme Lee et al. (2007). As imagens correspondentes às bandas reveladas foram escaneadas utilizando programa específico e apresentadas na forma de gráficos como valores relativos.

2.2.4. Indução da cinética rápida da fluorescência e parâmetros relacionados

As determinações relativas a emissão de fluorescência da Clorofila *a* foram efetuadas à temperatura ambiente ($\approx 27^{\circ}\text{C}$) *in vivo* e *in situ* empregando o fluorímetro DUAL PAM 100 (Heinz Walz GmbH., Alemanha).

A luz de excitação utilizada nos ensaios foi padronizada em $3000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na superfície da folha e a indução rápida da fluorescência da Chl *a* foi realizada no intervalo de tempo de 10 μs a 400 ms.

O material vegetal foi pré-adaptado no escuro por 30 minutos antes das determinações de fluorescência. O tempo de 30 minutos é suficiente, para o relaxamento de todo o sistema transportador de elétrons fotossintéticos (OLIVEIRA, 1995), garantindo o estado oxidado dos receptores de elétrons.

A partir do emprego de luz saturante ($3000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e da condição de completo relaxamento do sistema, o pico de fluorescência emitido foi considerado como F_M . A fluorescência a $50 \mu\text{s}$ foi considerado como valor F_0 (transiente O) e a fluorescência máxima obtida como F_M (transiente P), de acordo com Strasser et al. (2004). A curva de indução da fluorescência foi plotada em escala de tempo logarítmica permitindo a visualização de transição. A determinação do tempo de surgimento para transientes de fluorescência rápida J e I foi de 2 ms para o transiente J e 30 ms pra o transiente I, segundo Strasser et al. (2004).

Para uma análise detalhada da curva de indução de fluorescência, calculamos a área integrada entre o sinal de fluorescência medido e F_m , dada por:

$$\text{area} = \int_0^{T_m} (F_m - F_t) dt \quad (1)$$

T_m é o tempo necessário para se atingir a iluminação F_m . O parâmetro S_m , uma medida da energia necessária para fechar o CR FSII ativo e foi calculado dividindo-se a área por F_v : $S_m = \text{área} / F_v$ (Strasser et al, 2000).

2.2.5. Medidas dos parâmetros do FSI

Parâmetros do FSI foram determinados através do sistema Dual PAM-100 (Heinz Walz, Effeltrich, Alemanha) conectado a um computador com software “WinControl” usando modulação de amplitude de pulso (COOPMAN et al., 2010). Pulsos de saturação (PS), introduzidos principalmente para a medição de fluorescência PAM foram também aplicados para avaliar os parâmetros P700. Os sinais de P700 (P) podem variar entre nível mínimo (P700 totalmente reduzido) e o nível máximo (P700 totalmente oxidado). O sinal P máximo foi determinada através da aplicação de PS após pré-iluminação com vermelho distante. Sob condições limitadas do lado doador (produzido pela exposição vermelho-distante), PS transitoriamente induz a completa oxidação P700. Depois que o PS foi aplicado, o sinal P mínimo foi medido quando P700 se encontrava totalmente reduzido. A diferença do sinal entre os estados totalmente reduzidos e oxidados é denominada por P_m . A iluminação actínica foi iniciada, e PS foi fornecido cada 30 s, com os mesmos pulsos utilizados para fluorescência e análises P700. Cada PS foi seguido por um período de 1 s no escuro para determinar o nível de sinal mínimo P (P_0 ; P700 totalmente reduzido). P foi registrado antes da aplicação de PS e brevemente depois PS foi fornecido (P_m'), quando

foi observada a oxidação máxima de P700, e finalmente no fim do intervalo de 1 s no escuro após cada PS (determinação P_0). Os sinais P e P_m' foram comparados com P_0 . Deste modo, desvios de sinais inevitáveis (por exemplo, devido a alterações no estado da água) não interromperam as medidas reais dos parâmetros de P700.

Três tipos de rendimentos quânticos complementares de conversão de energia em FSI foram calculados de acordo com os métodos descritos por Erhard et al. 2008: Y (I), Y (ND) e Y (NA). Rendimento quântico fotoquímico efetivo $[Y (I)] = (P_m' - P)/P_m$. Y (ND) (limitação do lado dos doadores) representa a fração do P700 global que se torna oxidado em um dado estado, que é reforçada por um gradiente de próton trans-tilacóide (controle fotossintético no complexo *cytb / f*, bem como a baixa regulação do FSII) e fotodano ao FSII. Y (ND) foi calculada utilizando a fórmula $Y (ND) = (P - P_0) / P_m$.

O Y (NA) (limitação lado acceptor) representa a fração do P700 total que não pode ser oxidado pelo PS num dado estado devido a falta de receptores, e é reforçada por adaptação ao escuro (desativação de enzimas-chave do ciclo de Calvin-Benson) e dano no local de fixação de CO_2 . Y (NA) foi determinada com base na equação $Y (NA) = (P_m - P_m') / P_m$.

2.2.6. Detecção *in situ* de peróxido e superóxido

A detecção *in situ* de peróxido (H_2O_2) foi determinado baseado na metodologia proposta por Thordal-Christensen et al., (1997). Discos foliares foram infiltrados a vácuo sob condições de escuro com 10 mM de tampão fosfato de potássio, 10 mM $NaNO_3$ e 0.1% (w/v) 3,3'-diaminobenzidina (DAB), pH 7.8. Os discos foliares foram incubados por aproximadamente 16h em condições de escuro e então descorados com 0.15% (w/v) de ácido tricloroacético em 4:1 (v/v) etanol:clorofórmio por 48h antes de serem fotografadas. A detecção de superóxido (O_2^-) foi feita essencialmente como descrito por Jabs et al., (1996). Folhas destacadas foram infiltradas a vácuo com 10 mM de tampão fosfato de potássio, 10 mM $NaNO_3$ e 0.1% (w/v) azul de nitrotetrazólio (NBT) e 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7.8. As folhas destacadas, infiltradas e tratadas com NBT foram mantidas por 30 minutos sob condições de luz, antes do descoramento que segue o mesmo método descrito acima para detecção de H_2O_2 .

2.2.7. *Atividade enzimática*

A atividade da catalase (CAT; EC: 1.11.1.6) foi determinada conforme Havir e McHale (1987). Alíquotas de 0,05 ml de extrato protéico foram adicionadas de 2,95 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 30 °C e acompanhado o decaimento da absorbância a 240 nm em espectrofotômetro durante 300 segundos, com leituras sucessivas a cada 30 seg. A atividade da enzima foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de 36 mM⁻¹ cm⁻¹ a 240 nm, para o H₂O₂ e expressa em ηmol H₂O₂ g⁻¹ MF min⁻¹ ou de forma específica.

A atividade da peroxidase de ascorbato (APX; EC: 1.11.1.1) foi determinada conforme método descrito por Nakano e Asada (1981). Alíquotas de 0,1 ml de extrato protéico foram adicionadas ao meio de reação composto de 2,7 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0), contendo 0,5 mM de ácido ascórbico. A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ (30 mM) ao meio de reação e acompanhada pelo decaimento da absorbância a 290 nm em espectrofotômetro durante 300 s, com leitura sucessivas em intervalos de 30 s. A atividade da APX foi estimada utilizando o coeficiente e de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ para o ascorbato, em 290 nm, e expressa como μmol AsA g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da dismutase de superóxido (SOD; EC: 1.15.1.1) foi determinada conforme metodologia descrita por Gianopolitis e Ries (1977). Alíquotas de 0,1 ml do extrato protéico foram transferidas para meio de reação, em tubos protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 75 μM de NBT. A reação foi iniciada pela adição de 2 mM de riboflavina e rápida transferência dos tubos, sem a proteção da luz, para câmara iluminada por lâmpada de 30 wats (30 μmol de fótons m⁻² s⁻¹), durante 6 minutos. A reação foi interrompida pelo desligamento da luz, os tubos foram revestidos por filme escuro e realizadas leituras a 540nm. A atividade foi estimada com base na inibição da redução do NBT, definindo-se uma unidade de atividade como a quantidade da enzima necessária para inibir 50% da fotoredução (BEAUCHAMP e FRIDOVICH, 1971). A atividade foi expressa em U.A. g⁻¹ MF min⁻¹.

Tendo em vista que a umidade, ou seja, a relação MF/MS, não variou entre os tratamentos, as atividades enzimáticas foram expressas na base de MF.

2.2.8. Atividade da oxidase do glicolato

A atividade da oxidase do glicolato (GO: EC; 1.1.3.15) foi determinada conforme o princípio de reação do método descrito por Baker e Tolbert (1966). Esse método se baseia na produção do complexo glioxilato-fenilhidrazona, produzido a partir da conversão do glicolato para glioxilato pela GO no meio. Alíquotas de 100 μL do extrato foram adicionadas a 2,9 mL de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 8,3, adicionado de glicolato de sódio 40 mM, L-cisteína 100 mM, fenilhidrazina-HCl 100 mM e FMN 1 mM. O incremento da produção do complexo (glioxilato-fenilhidrazona), referente à atividade da enzima, será medido a 324 nm em espectrofotômetro durante 5 min. A atividade da GO foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 17 mM^{-1} e expressa em μmol de glicolato $\text{g}^{-1} \text{ MF min}^{-1}$.

2.2.9. Zimograma da catalase (CAT)

Após a separação das proteínas em gel de poli-acrilamida a 7,5% os géis foram revelados para atividade de catalases conforme Thorup et al., (1961). Alíquotas (50 μl) de extrato protéico foram misturadas ao tampão de aplicação (Tris 25 mM/glicina 190 mM, pH 8,3), na proporção 1/1 (v/v) e 20 μl da mistura foi submetido à PAGE nativa (125 V, 20 mA e 10 W por gel). Após a eletroforese os géis foram pré-incubados em H_2O_2 0,3% (p/V) por 20 min, em agitação suave, seguido de rápida lavagem com água destilada e imersão em solução de FeCl_3 0,5% (p/v) e $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN}_6)$ 0,5% (p/v). Após o surgimento das bandas acromáticas sobre o fundo verde dos géis a reação foi interrompida por lavagens com água destilada. As soluções de FeCl_3 e $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN}_6)$ foram preparadas isoladamente, mantidas no escuro, e misturadas somente no momento da aplicação sobre os géis.

2.2.10. Conteúdo de glioxilato

O conteúdo de ácido glioxilato foi determinado baseado em metodologias desenvolvidas por Hausler *et al.* (1996), a partir de extrações por maceração de 100 mg MF em 1 ml de HCl 100mM. Os extratos foram centrifugados a 12.000 rpm/ 10 min/ 8 °C e o sobrenadante foi recolhido. Alíquotas de 200 μl do extrato foram acrescidas a 300 μl de Fenilhidrazina 1% em HCl 100mM e colocadas em banho- maria a 95°C por 2 min. A reação foi paralisada com banho de gelo e as leituras realizadas a 324 nm. O

conteúdo de glioxilato foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar de 17 mM⁻¹ e expresso em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$.

3. RESULTADOS

O tempo de exposição à luz per se compromete as trocas gasosas de mudas de cajueiro

Os resultados de trocas gasosas demonstraram que as plantas irrigadas até as 6h da exposição a luz elevada apresentaram os maiores valores da taxa de assimilação líquida de carbono do que aquelas expostas a seca, atingindo o máximo da taxa fotossintética líquida, nesse período. Além disso, nas plantas submetidas à seca, a fotossíntese permaneceu constante durante todo o período de exposição a luz. Contudo, ao fim das 12 h de exposição a luz elevada, a taxa fotossintética de mudas irrigadas e submetidas a seca se equiparam, indicando que o maior tempo de exposição à luz alta possa estar comprometendo o funcionamento do aparato fotossintético das mudas irrigadas (Figura 2A). As variações na fotossíntese líquida foram compatíveis com o fechamento estomático e com a perda de água por transpiração observadas nas mudas (irrigadas e expostas a seca). De modo que as taxas da transpiração e condutância estomática (embora não significativas) foram maiores nas mudas irrigadas do que nas mudas expostas a seca, independente do regime lumínico (Figuras 2B e 2C).

A relação ETR/P_N não variou em resposta ao tempo de exposição a luz, os resultados indicam que a assimilação de CO_2 foi aparentemente suficiente para drenar eletrons da fase fotoquímica, portanto outros drenos importantes tais como fotorrespiração foram provavelmente pouco utilizados nas condições de alta luz e seca (Figura 2 D).

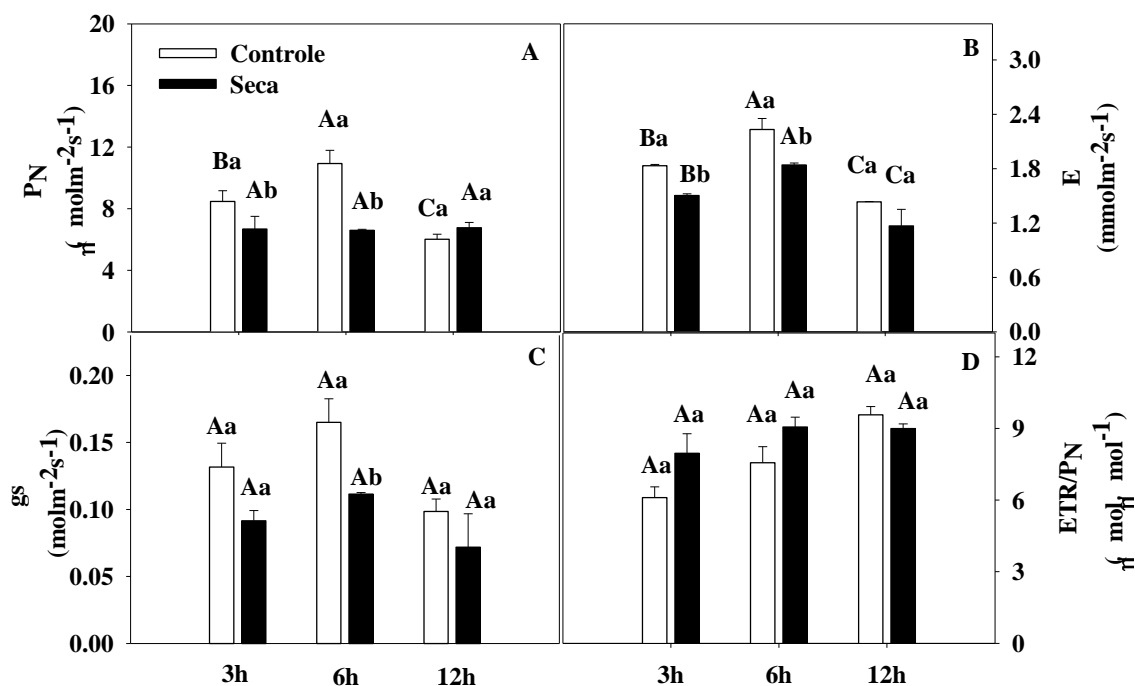


Figura 2. Mudanças na fotossíntese líquida (A), transpiração (B), condutância estomática (C) e relação ETR/P_N (D) em mudas de cajueiro submetidas às condições controle ou a suspensão de rega por 20 dias, seguido de submissão a radiação elevada. Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas pela mesma letra minúscula não diferem dentro de cada intensidade de luz, pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Respostas da atividade fotoquímica logo nas primeiras horas de exposição à luz alta é crucial para entendimento dos mecanismos de foto-proteção em cajueiro sob deficiência hídrica

As análises de fluorescência da clorofila *a* revelaram que as mudas irrigadas, sobretudo na luz moderada apresentaram valores de eficiência quântica máxima do FSII (F_v/F_m) próximos de 0,8, ao contrário das mudas submetidas ao estresse hídrico que apresentaram valores de F_v/F_m próximos de 0,6 a partir das seis horas de exposição a luz moderada (Figura 3A). Na luminosidade elevada, as mudas expostas à seca mantiveram os valores baixos da relação F_v/F_m , porém as mudas controle demonstraram discreta tendência da redução desse parâmetro em resposta ao aumento do tempo de exposição a luz alta (Figura 3B), demonstrando que a luminosidade elevada por se afeta esse parâmetro (F_v/F_m), contudo não exacerba o efeito negativo sobre a condição de seca, como pensávamos em experimentos anteriores, visto que em luz moderada as mudas de seca já apresentavam valores baixos de F_v/F_m .

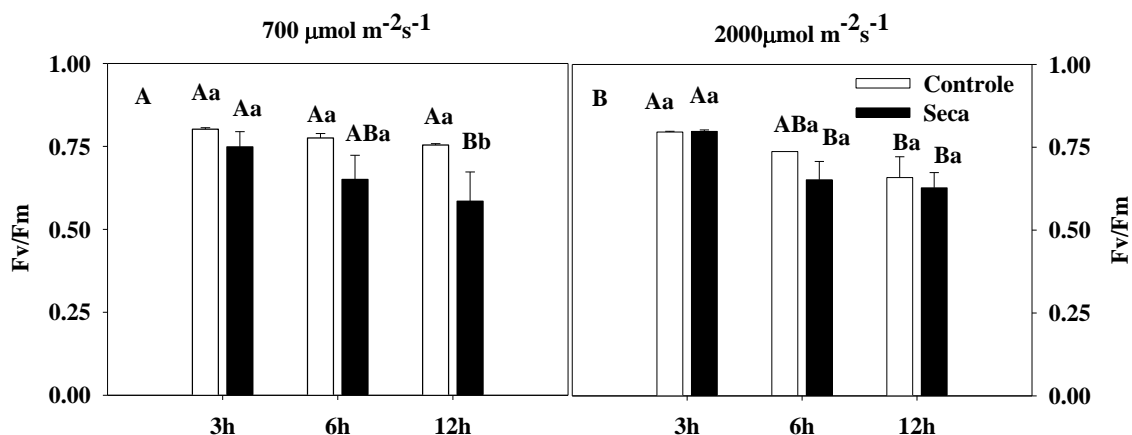


Figura 3. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: eficiência quântica potencial do fotossistema II (A e B) das mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas (barras brancas) ou sob suspensão de rega (barras pretas) em exposição a luminosidade moderada (A) ou em exposição a alta luminosidade (B). As medidas representam médias de três repetições \pm desvio padrão. As letras maiúsculas representam a interferência da luz nos tratamentos e as letras minúsculas representam as diferenças entre os tratamentos em exposição à mesma intensidade de luz, pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

A fluorescência mínima (F_0) aumentou claramente a partir das 6h de exposição a luz moderada e a partir das 3h de exposição a luz elevada nas mudas expostas a seca, enquanto que nas plantas controle esse parâmetro permaneceu constante, demonstrando a ocorrência de danos na estrutura da membrana tilacóide com parcial dissociação de LHCII de FSII apenas naquelas expostas a seca (Figura 4A e 4B). Em contraste, a fluorescência máxima (F_m), nas plantas expostas a seca, reduziu abruptamente no período de 3-6h de exposição a luz moderada ou elevada, permanecendo constante depois desse período. Nas plantas controle a fluorescência máxima tendeu a uma leve redução durante a exposição a luz moderada, mas na luz elevada essa redução chegou aos mesmos níveis daquelas expostas a seca, indicando que a fotoinibição nas plantas expostas a seca e irrigadas se equiparam as 12 h de exposição a luz elevada devido a inibição da atividade fotossintética pela disfunção da atividade do FSII (Figuras 4C e 4D).

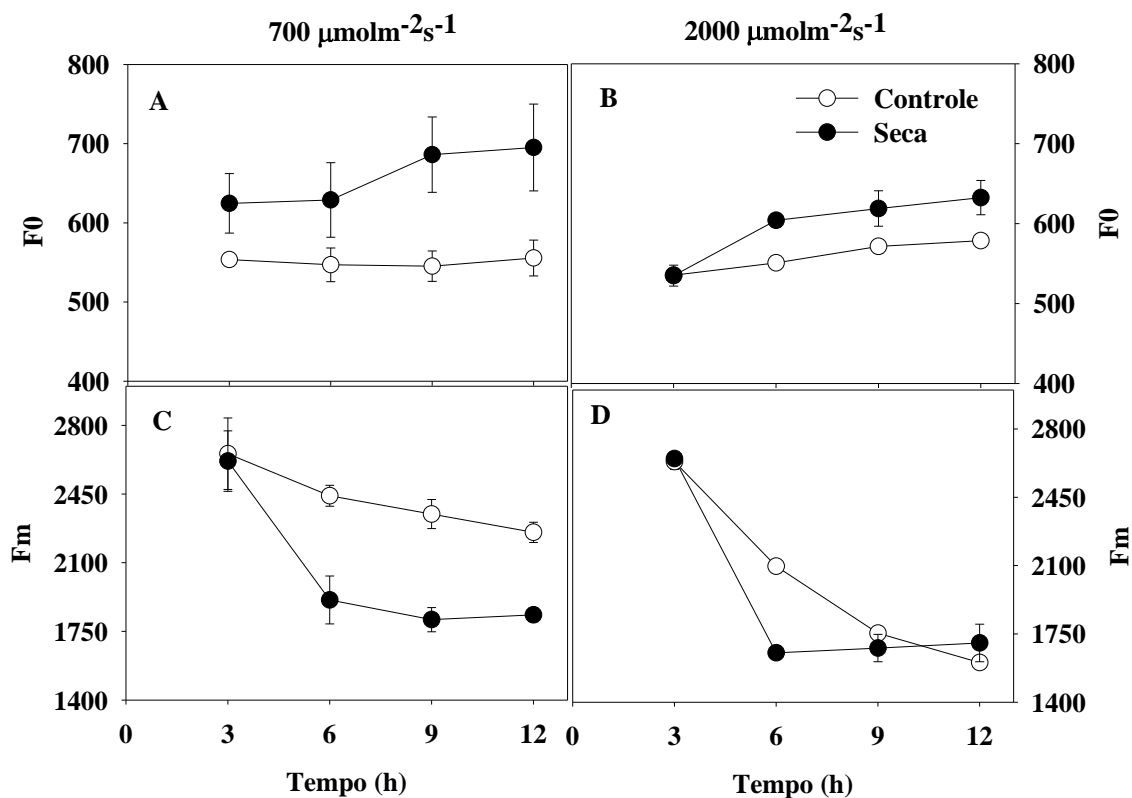


Figura 4. Fluorescência mínima (A e B) e máxima no escuro (C e D) das mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas (círculo branco) ou sob suspensão de rega (círculo preto) em exposição a luminosidade moderada (A e C) ou em exposição a alta luminosidade (B e D). As medidas representam médias de três repetições \pm desvio padrão.

Além disso, nos momentos iniciais de exposição à luz ocorre uma rápida indução da dissipação não-fotoquímica (NPQ), mostrando uma modulação desse processo fotoquímico, uma resposta que é ausente após um período prolongado (24 h) de exposição a luz (experimentos anteriores). Foi observado que apenas nas plantas expostas à seca ocorreu uma indução da dissipação de energia por meio desse processo durante as seis horas iniciais de exposição à luz moderada, e por três horas em resposta a luminosidade elevada, respostas estas que foram ausentes nas plantas controle (Figura 5A e B).

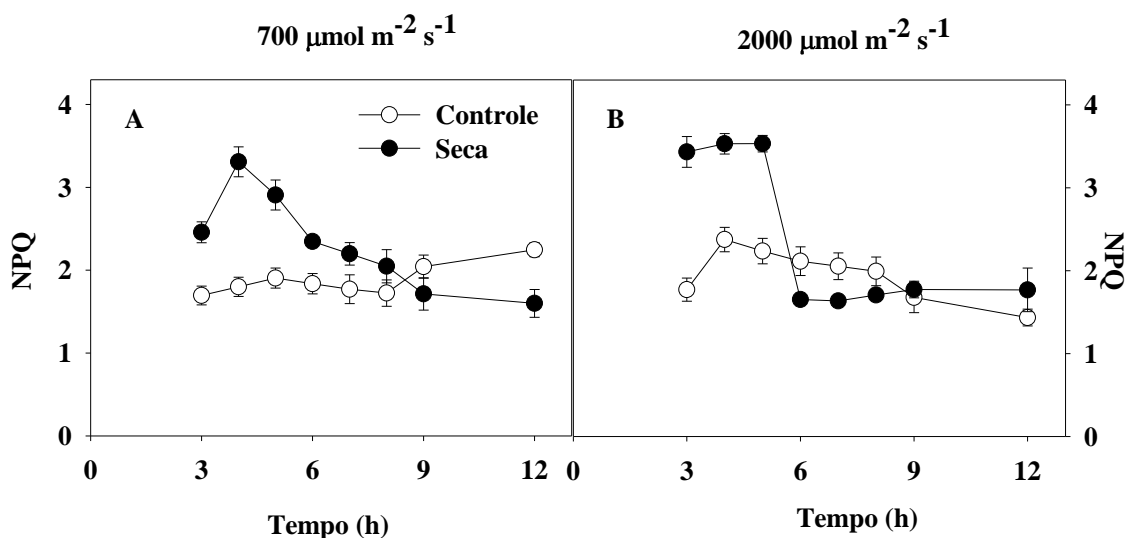


Figura 5. Coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência (A e B) das mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas (círculo branco) ou sob suspensão de rega (círculo preto) em exposição a luminosidade moderada (A) ou em exposição a alta luminosidade (B). As medidas representam médias de três repetições \pm desvio padrão.

Os resultados relacionados aos processos de dissipação de energia por meio do NPQ mostram que o papel desses processos, em respostas ao estresse por luminosidade, ocorre de forma temporal em mudas de cajueiro. Após a exposição das plantas à luminosidade esse processo fotoquímico é extremamente ativo, principalmente a dissipação de energia via NPQ, e que com o tempo de exposição à luz torna-se ineficiente. Esses dados estão compatíveis com as mudanças que ocorreram em processos diretamente relacionados com a atividade fotoquímica dos fotossistemas, como a taxa aparente do transporte de elétrons e a eficiência quântica efetiva do FSII (Figura 6).

A taxa de transporte de elétron (ETR) em resposta a luz ocorreu de forma sincronizada com a eficiência quântica efetiva do FSII ($\Delta F/F_m'$), tanto na luminosidade moderada como na elevada (Figura 6A-D). Nas plantas irrigadas, os valores de ETR e $\Delta F/F_m'$ foram relativamente elevados nas horas iniciais da exposição à luz, entre 3 e 9 h os valores desses parâmetros reduzem para quase a metade ou menos que isso, permanecendo contantes a partir desse ponto quando as mudas foram expostas a luminosidade elevada e apresentaram um discreto aumento quando expostas a luz moderada. Por outro lado, nas mudas sob o estresse de seca, os valores se apresentaram sempre reduzidos mostrando pouco fluxo de elétrons durante todo o tempo de exposição à luz moderada e elevada, provavelmente devido ao fechamento estomático bastante limitado nestas mudas.

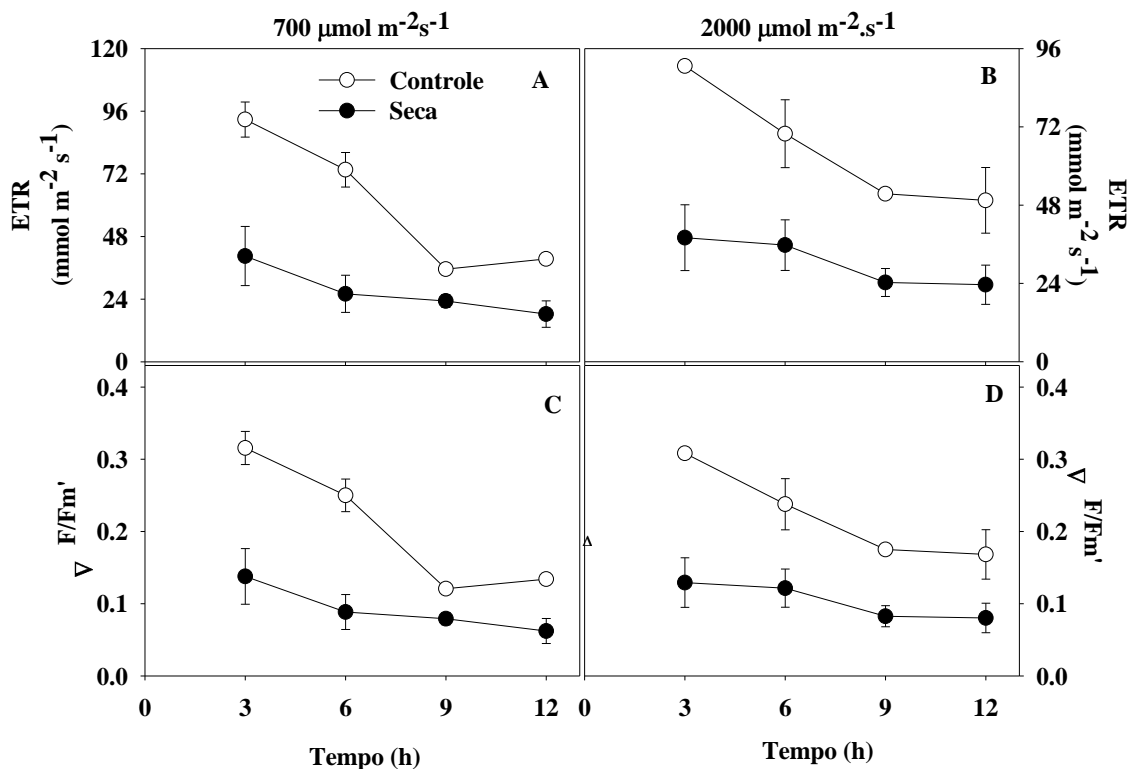


Figura 6. Taxa aparente de transporte de elétrons (A e B) e eficiência quântica efetiva do fotossistema II (C e D) de mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas (círculo branco) ou sob suspensão de rega (círculo preto) em exposição a luminosidade moderada (A e C) ou em exposição a alta luminosidade (B e D). As medidas representam médias de três repetições \pm desvio padrão.

Padrão de expressão de proteínas associadas com a eficiência fotossintética

O imunoblotting de RLS indicou aumento progressivo na quantidade da proteína Rubisco, proteína solúvel mais abundante do cloroplasto, em resposta a alta luz atingindo os maiores níveis após as 12 h de exposição a luz alta nas mudas controle. Nas plantas expostas à seca a quantidade de proteína também aumentou, porém só até as 6 h de exposição a luz alta. Após esse período a quantidade de rubisco foi reduzida para menos da metade (Figura 7A). Apesar do papel da Rubisco de fixar CO_2 , os aumentos das quantidades da proteína observados não induziram aumentos nas taxa de assimilação de CO_2 . No entanto, como tem sido observado ao longo deste trabalho, a RuBisCO não é o único fator a contribuir para a diminuição de fotossíntese, como demonstram os resultados de fluorescência da clorofila. O conjunto de todos os processos, desde a captação da luz até à fixação do carbono, formam uma rede

complexa de interações, as quais serão afetadas pelos estresse hídrico e de luz em diferentes graus, contribuindo de formas diferentes para a redução de fotossíntese.

Outra proteína, cujo papel é essencial no processo de fotossíntese, analisada aqui, foi a plastocianina (PC). A detecção por imunoblotting da PC revelou decréscimos da quantidade da proteína em resposta à luz e essa redução foi mais acentuada em resposta a seca combinada com a luz alta (figura 7B). A mesma resposta foi observada para a detecção da proteína D1, ou seja, a seca e/ou a luz causam efeitos negativos na quantidade da proteína, revelando altos níveis de degradação da mesma, particularmente nas mudas expostas à seca associada com a luminosidade elevada (Figura 7C).

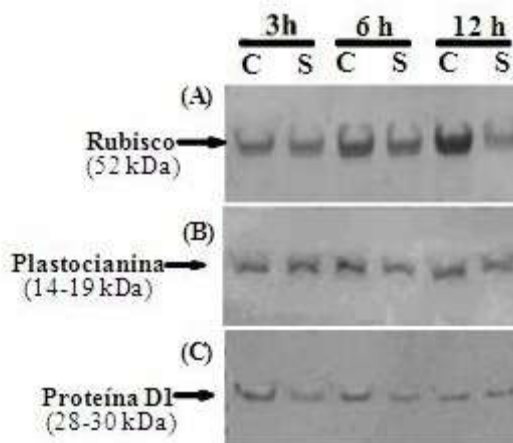


Figura 7. *Western blot* da Rubisco (A) plastocianina (B) e da proteína D1 (C) em mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas (C) ou sob suspensão de rega (S) e expostas à luminosidade elevada ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 3h, 6h e 12h.

Indução da cinética rápida da fluorescência e parâmetros relacionados

Foi realizado uma curva O-J-I-P em mudas controle e submetidas à seca, cujos dados da curva representam a etapa fotoquímica da fotossíntese dependente da intensidade luminosa, mais precisamente, a redução de Q_A para Q_A^- , a partir da reoxidação do centro de reação do FSII (inflexão O-J, na curva) e os transientes “J-I-P” correspondem a fase não fotoquímica da fotossíntese, mas ainda sob a influência da acumulação de Q_A^- . A fase J-I revela a simples redução da plastoquinona (PQ) e a fase I-P revela a quantidade de PQ duplamente reduzida (HILL et al., 2004). Quando toda Q_A estiver no estado reduzido (Q_A^-), a fluorescência atinge o transiente “P”.

Os resultados da figura 6 representam a cinética da emissão da fluorescência da clorofila pelos transientes ‘O-J-I-P’ nas mudas controle e submetidas a seca, e mostra que, apesar das curvas polifásicas O-J-I-P das mudas de cajueiro expostas a luz moderada e elevada apresentarem tendências semelhantes, as taxas de crescimento e as amplitudes de suas três fases individuais foram diferentes. Nas mudas submetidas a seca e expostas a luz moderada, ocorreu uma menor redução de Q_A^- em comparação com as mudas controle, representado pela menor amplitude da subida do sinal de fluorescência entre “O” e “J” (Figura 8A). Contrariamente, nas mudas que estavam expostas a luz elevada, a amplitude do sinal da fluorescência entre O e J foram equivalentes entre controle e submetidas a seca (Figura 8B). A causa provável para isto, seria uma limitação por parte da segunda quinona transportadora de elétron (Q_B) em aceitar os elétrons transferidos por Q_A , além também, da influência causada pelo lado doador de FSII (HSU, 1993). Nas fases posteriores, J-P, tanto após a exposição da luz moderada como a elevada, as mudas controle demonstraram um aumento mais rápido da fluorescência em relação as mudas submetidas a seca, representado pelo distanciamento entre as duas curvas. Os dados da tabela 1 também mostraram limitação no pool de PQ visto que os menores valores de S_m nas mudas submetidas a seca estão indicando que na cadeia transportadora de elétrons dessas mudas tem menos aceptores de elétrons por centro de reação (CR) do FSII. Paralelamente as menores taxas de S_m/T_m nas mudas submetidas a seca sugerem que essas mudas tem um menor pool de PQ, reflexo das menores taxas de transporte de elétrons dessas mudas sob luz elevada (Figura 6B).

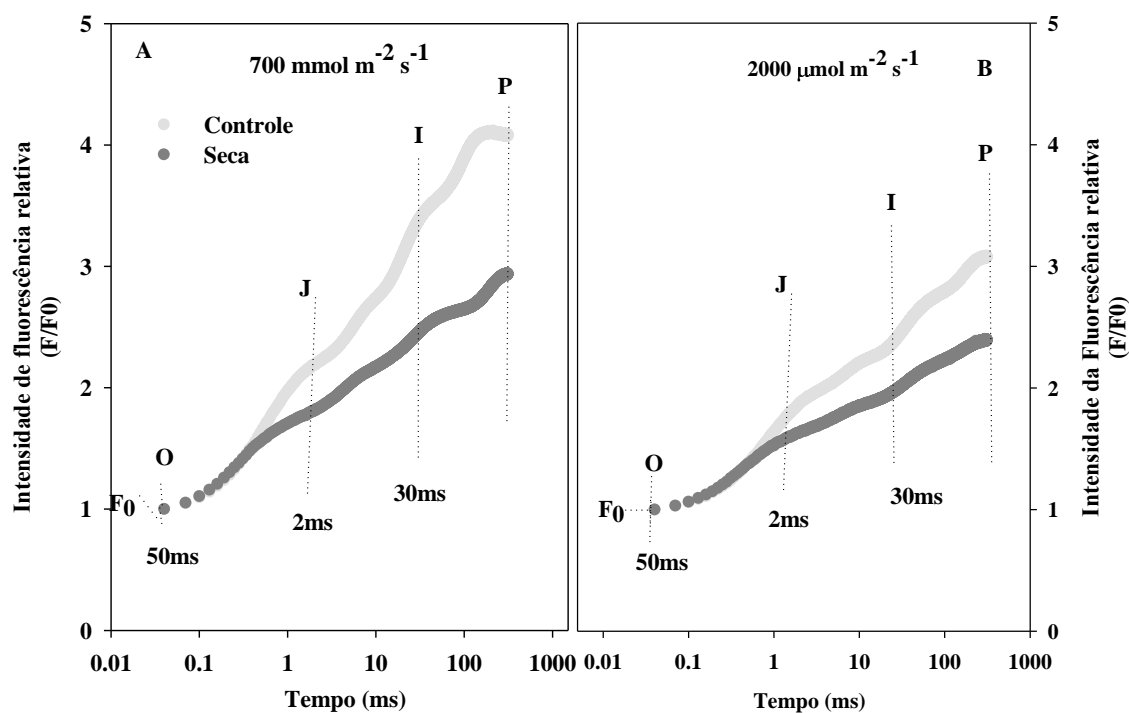


Figura 8. Cinética da fluorescência da clorofila *a* em folhas de mudas de cajueiro sob condições controle e submetidas a seca em exposição a intensidade de luz moderada (A) e elevada (B). As curvas estão representadas na forma dos transientes (OJIP) da fluorescência.

Tabela 1. Outros parâmetros da fluorescência da clorofila *a* calculados a partir da curva OJIP de mudas de cajueiro

	Luz Alta			
	Controle		Seca	
F_0	0,93	$\pm 0,06a$	1,08	$\pm 0,10a$
S_m	33,95	$\pm 1,83a$	18,20	$\pm 2,64b$
S_m/T_m	0,110	$\pm 0,006a$	0,059	$\pm 0,009b$

Os valores na tabela são expressos como as médias \pm SD ($n = 3$). Médias seguidas da mesma letra não diferem dentro de cada tratamento, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Fotoinibição no fotossistema I

Os resultados da figura 9A demonstraram que as plantas submetidas a seca tiveram um menor rendimento do FSI, representado pelos menores valores de $Y(I)$. Esses valores baixos são principalmente devido a taxa de transporte de elétrons reduzida durante a exposição a luz elevada (Figura 9B), além disso, após 12 h de exposição a luz elevada há uma limitação do lado acceptor de eletrons, representado pelo alto valor de $Y(NA)$ nessas mudas (Figura 9D). Acredita-se que a inativação do lado acceptor de eletrons do FSI pode ser usado como marcador de fotoinibição do FSI (MUNEKAGE et al. 2002, 2004). A instalação de uma super redução do lado acceptor de elétrons do FSI pode ser atribuída em parte pela redução dos aceptores de elétrons do FSI como os centros FeS, Fd e NADP. A redução desses aceptores se dá pela formação de EROS, uma vez que a interação entre ferredoxina e oxigênio molecular (reação de Mehler) leva a formação de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e H_2O_2 , e por sua vez a interação do H_2O_2 com aglomerados FeS reduzidos (reação de Fenton) resulta na formação radical hidroxila (OH^{\bullet}) que destrói clusters FeS. Os aglomerados FeS inativos (FeS_{in}) induzem alterações conformacionais de proteínas do complexo do núcleo FSI, facilitando o acesso a proteases e, posteriormente a degradação dos produtos de gene de proteínas componentes dos FS como a PsaA e PsaB, prejudicando dessa forma a eficiência do FSI (YORDANOV e VELIKOVA, 2000).

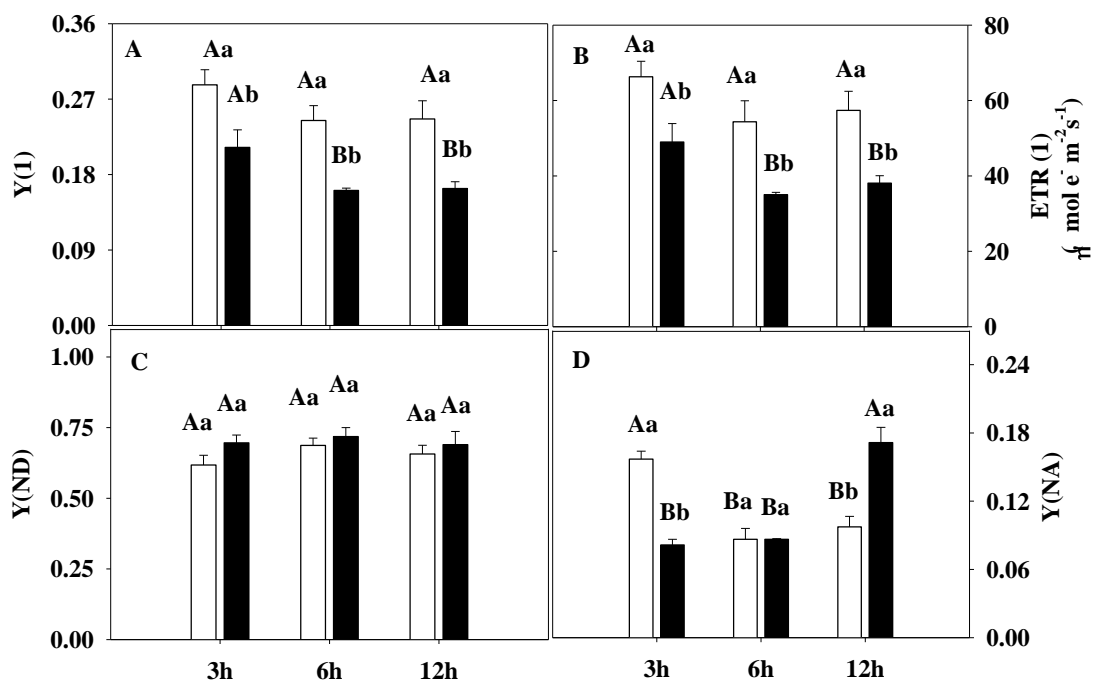


Figura 9. Parâmetros de regulação do FSI de mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas ou sob suspensão de rega. Mudas controle e submetidas a seca foram iluminadas com luz actínica azul (AL) de $550 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ durante 5 minutos. Fluorescência da clorofila a e mudanças da absorbância P700 foram registradas em paralelo. A partir de dados de fluorescência, os rendimentos correspondentes em FSI foram obtidos a partir de medições de P700: Y(I): utilização de energia fotoquímica (A); ETR (I): taxa de transporte de elétrons no FSI; Y (ND): dissipação de energia não fotoquímica, devido à limitação do lado do doador (C) e Y (NA): dissipação de energia não foto-química, devido à limitação do lado receptor (D). As letras maiúsculas representam a interferência da luz nos tratamentos e as letras minúsculas representam as diferenças entre os tratamentos em exposição à mesma intensidade de luz, pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Danos oxidativos em resposta ao aumento da exposição à luz alta

A análise da acumulação de EROs em resposta ao aumento do tempo de exposição à luz alta foi feita *in situ* pelo coramento das folhas usando NBT e DAB como indicadores de O_2^- e H_2O_2 . Os níveis do radical superóxido foi significativamente maior às 3h e 6h de exposição a luz nas mudas irrigadas se comparadas com as mudas submetidas ao estresse hídrico (Figura 10A). As 12h, a concentração de O_2^- reduz significativamente. Nas mudas submetidas à seca a formação do radical O_2^- é bem mais retardada, se acumulando apenas após 12 h de exposição à luz elevada. Esses resultados demonstram que a manutenção do fluxo de elétrons nas mudas irrigadas, na presença de luminosidade elevada ($2000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), levou a uma maior produção de O_2^- em relação as mudas sob seca (Figura 10 B).

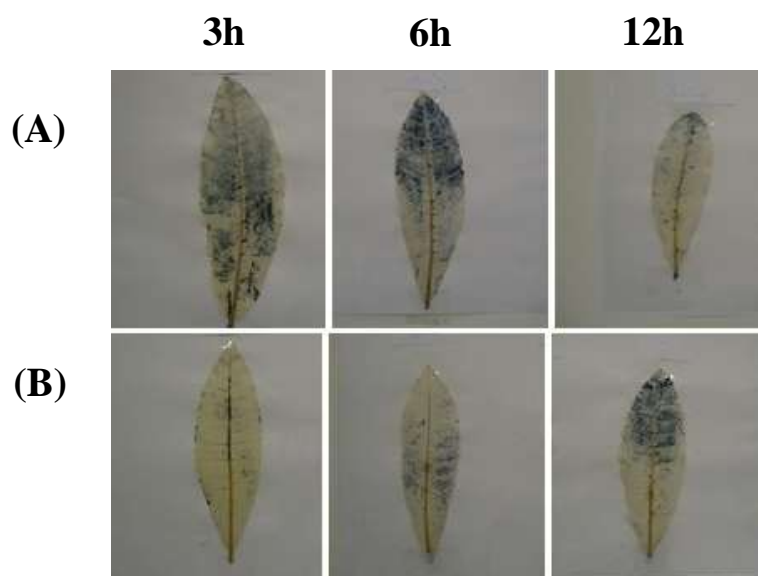


Figura10. Detecção *in situ* da formação do radical superóxido em folhas de mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas (A) ou submetidas ao estresse hídrico (B), por suspensão de rega, e expostas à luminosidade elevada ($2000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) por 2h, 6h e 12h.

Em contraste, H_2O_2 foi detectado em todos os tratamentos, mas os níveis mais altos foram detectados apenas nas mudas irrigadas, particularmente as 3h de exposição à luminosidade elevada, havendo pouco acúmulo desta EROs nos outros tratamentos de luz (Figura 11). Para evitar esses danos oxidativos, a célula possui um complexo sistema protetor composto por componentes enzimáticos, constituído pelas enzimas SODs, APXs e CATs (NOCTOR e FOYER, 1998). As SODs são consideradas a

primeira linha de defesa oxidativa da célula e catalisam a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ para H_2O_2 e O_2 (ALSCHER et al., 2002). No presente estudo, ocorreu elevada atividade da SOD nas mudas expostas à seca até as 6h de exposição à luz elevada, no entanto após a exposição à 12 horas de luz elevada, estas plantas apresentaram um decréscimo de 40% na atividade da SOD (Figura 12A), indicando a eficiência da atividade da SOD na remoção do $O_2^{\cdot-}$ acumulado.

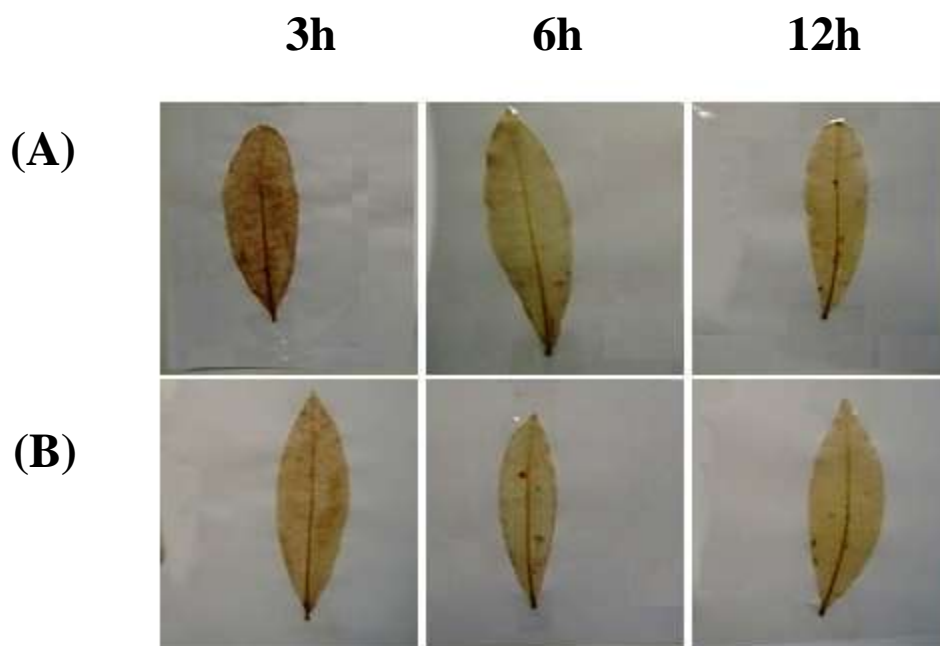


Figura 11. Detecção *in situ* da formação do radical peróxido em folhas de mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas (A) ou submetidas ao estresse hídrico (B), por suspensão de rega, e expostas à luminosidade elevada ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 2h, 6h e 12 h.

Por sua vez, as APXs são as principais peroxidases que removem H_2O_2 na célula (FOYER, 1996), e atuam em sincronia com as enzimas redutases do deidroascorbato (DHAR), do monodeidroascorbato (MDHR) e da glutathiona (GR), removendo H_2O_2 no ciclo do ascorbato-glutathiona (HALLIWELL, 1987). Os resultados da figura 12B, demonstraram que a atividade da APX nas mudas irrigadas foi similar a das mudas expostas a seca apenas após as 6h de exposição. Por outro lado, após exposição de 3 e 12 h à luz alta, essas mudas apresentaram atividade de aproximadamente 50% superior daquelas submetidas a seca.

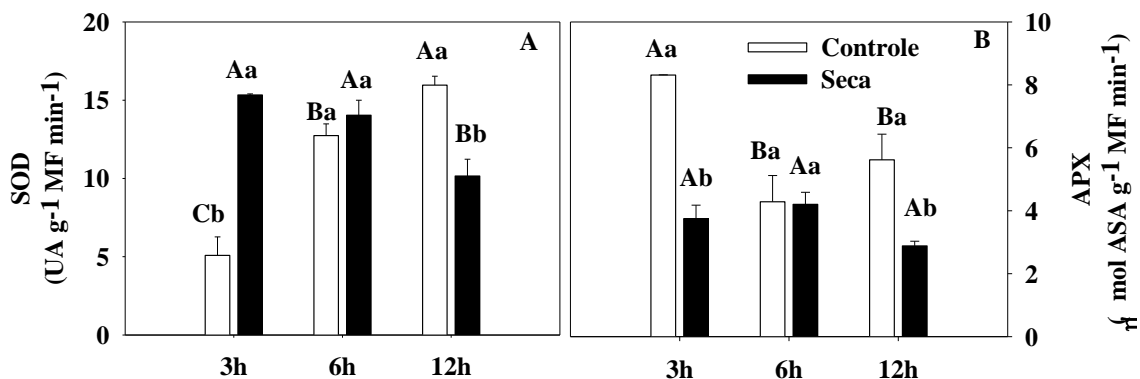


Figura 12. Atividade da dismutase do superóxido (A) e peroxidase do ascorbato (B) em mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas (barras brancas) ou sob suspensão de rega (barras pretas) e expostas à luminosidade elevada ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 2h, 6h e 12h. As letras maiúsculas representam a interferência da luz nos tratamentos e as letras minúsculas representam as diferenças entre os tratamentos em exposição à mesma luz, pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Fotorrespiração como mecanismo de foto-proteção utilizado pelas mudas de cajueiro submetidas à luz alta

Os parâmetros utilizados para avaliar os indicadores de fotorrespiração variaram muito pouco, exceto a atividade da catalase, que mostrou um aumento gradativo em resposta ao tempo de exposição a luz alta, alcançando os maiores níveis as 12h de exposição a luz. Nas mudas submetidas à seca a tendência foi a mesma, porém em menor escala. Esses dados foram confirmados por western blot e zimograma e estão mais relacionados com seu papel de proteção contra o excesso de H_2O_2 gerado, particularmente nas mudas irrigadas onde o efeito da luminosidade foi mais negativo (Figura 13 A e B). As catalases, apesar de possuírem menor afinidade pelo H_2O_2 se comparado as APXs, são essenciais na remoção de H_2O_2 oriundo da fotorrespiração (FOYER e NOCTOR, 2000). Assim, o baixo conteúdo de H_2O_2 no tecido foliar além de estar relacionado com atividade das APXs pode também estar relacionado com a atividade da catalase, que mostrou variações significativas.

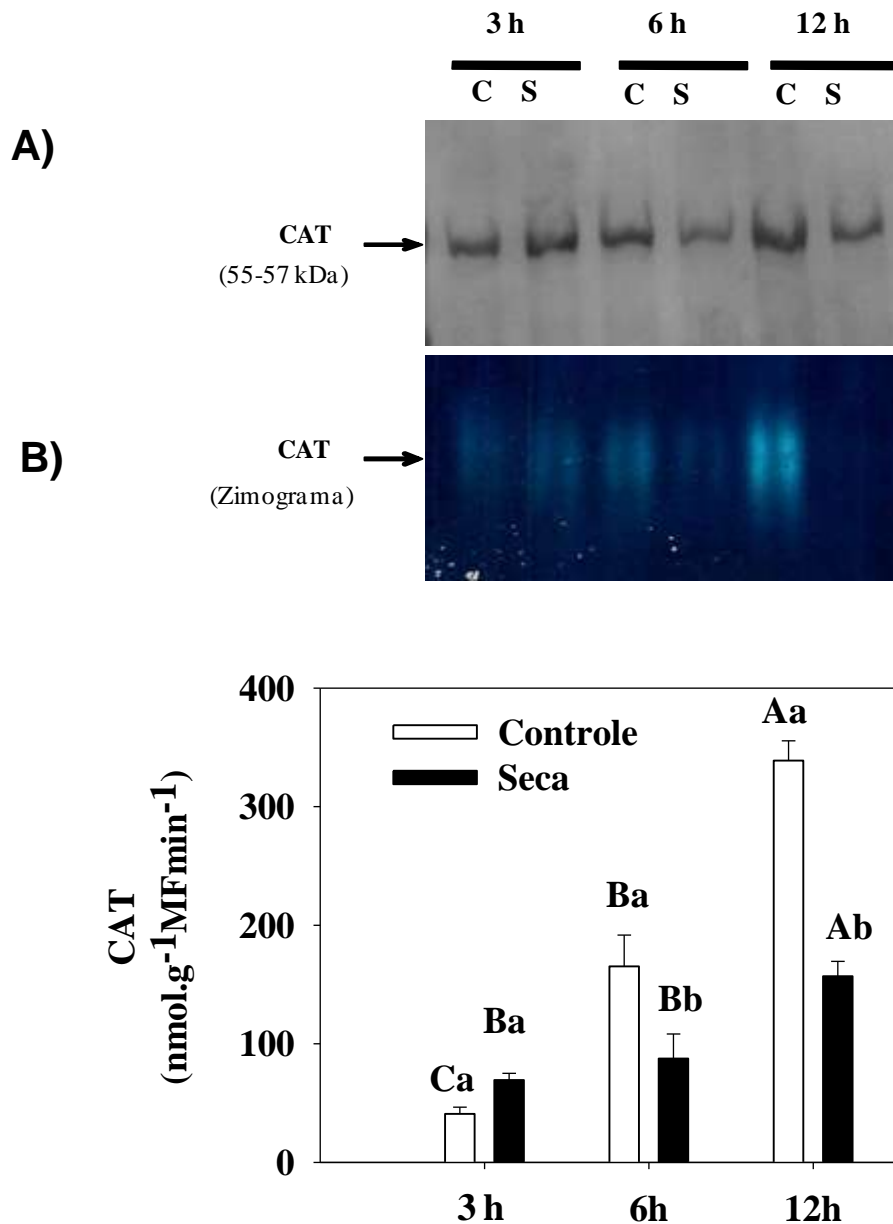


Figura 13. Western blot da catalase (A) e determinações das atividades enzimáticas da catalase em gel (B) e *in vitro* (C) em mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas (barras brancas) ou sob suspensão de rega (barras pretas) e expostas à luminosidade elevada ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 2h, 6h e 12h. As letras maiúsculas representam a interferência da luz nos tratamentos e as letras minúsculas representam as diferenças entre os tratamentos em exposição à mesma luz, pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Os outros parâmetros indicativos de fotorrespiração, como o conteúdo de glioxilato e atividade da oxidase do glicolato se mantiveram constantes tanto nas mudas controle como nas submetidas a seca, exceto para a pequena redução, porém não significativa, da atividade de GO as 12h de exposição a luz elevada (Figura 14 B e C).

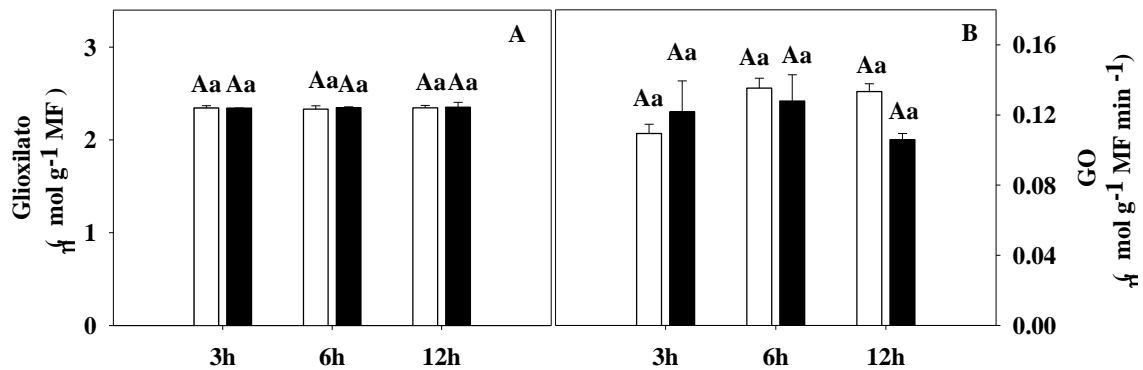


Figura 14. Medidas de indicadores da atividade de fotorrespiração: conteúdos de glioxilato (A) e atividade da oxidase do (B) glicolato em mudas de cajueiro cultivadas em condições irrigadas (barras brancas) ou sob suspensão de rega (barras pretas) e expostas à luminosidade elevada ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 2h, 6h e 12h. As letras maiúsculas representam a interferência da luz nos tratamentos e as letras minúsculas representam as diferenças entre os tratamentos em exposição à mesma luz, pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

4. DISCUSSÃO

A fotoinibição em mudas submetidas à seca ocorreu indiferente a combinação da luz empregada, resultado corroborado pela insuficiência da performance fotossintética nessas mudas (figura 2A e 3A e B). Por um lado, nas mudas irrigadas a fotoinibição só ocorreu sob a exposição elevada da luz. Por outro lado, a combinação de luz associada a seca só reforçou os prejuízos causados ao aparato fotossintético. A alta irradiância induz a fotoinibição e fotooxidação em mudas tropicais (WISE, 1995).

As análises das respostas fotoquímicas do FSII demonstraram que nas primeiras seis horas de exposição a luz (moderada e elevada) houveram respostas atribuídas a foto-proteção (Figura 5 A e 5 B) nas mudas expostas a condição de seca, mas a partir deste período as mudas apresentaram um maior estresse oxidativo (Figura 10). Ficou evidente que as melhores performance fotoquímicas (maior dissipação não fotoquímica, menores valores de ETR e $\Delta F/F_m'$) e menores danos oxidativos não só ocorriam de forma mais rápida, mas também de forma mais precisa nas mudas submetidas a seca até as seis horas de exposição a luz elevada (Figura 5,6 e 10). Esses achados suportam o argumento de que o estresse de seca, associado ao estresse de luz alta ou moderada, pelo menos no cajueiro, até as 6h de exposição a luz elevada manteve aparato fotossintético não danificado, porém essa condição não pode ser mantida com o aumento do tempo de exposição a luz, como podemos inferir pela degradação de proteínas componentes dos FSs, indicando danos ao aparato fotossintético (Figura 7).

A atividade fotoquímica relacionada com a função da ETR nas mudas irrigadas expostas a luminosidade moderada e elevada foi bastante ativa nas horas iniciais (até 6 horas) de exposição a luz (Figura 6 A e B). Esses resultados indicam que durante esse período de exposição a luz a atividade fotoquímica nas mudas irrigadas foi mantida, incluindo a captação e a transdução de energia luminosa pelos FSII e o fluxo de elétrons via CTE cloroplástica.

No entanto, o transporte de elétrons, indicado pela ETR, nas mudas sob condições de seca foi severamente afetado. Esse fator foi responsável pela queda e baixo valor na eficiência do rendimento quântico do FSII nas mudas irrigadas e expostas a seca, respectivamente (Figura 6 A - D).

A análise do transporte de elétrons do lado aceptor do FSII, na curva OJIP, revelou um fenômeno similar, de que o transporte de elétrons sob luz moderada ou alta é limitado nas mudas expostas a seca (Figura 8A e B). Os valores de S_m representa o

pool de PQ do centro de reação do FSII porque ele reflete a energia necessária para reduzir completamente Q_A . (STRASSER et al., 2000). Os resultados da Tabela 1 obviamente revelaram uma menor disponibilidade do *pool* de PQ (Plastoquinona) oxidadas nas mudas de seca expostas a luz moderada ou alta.

O estado redox do *pool* de plastoquinona é um fator de regulação do transporte de elétrons da membrana do tilacóide. Quando o *pool* de PQ está super reduzido, desencadeia uma série de mecanismos que regulam a distribuição de energia de excitação e diferentes vias de transporte de elétrons (KRUSE, 2001 e PUTHIYAVEETIL, 2011). A super redução do *pool* de plastoquinona diminuiu o transporte de elétrons a partir de Q_A a PQ, resultando em uma taxa reduzida do transporte linear de elétrons via FSII, demonstrados pelos valores de S_m e S_m/T_m , que representam um menor número de aceptores de elétrons e menor pool de PQ, indicando que nessas mudas houve um menor requerimento de transferência de elétrons sob a exposição à luz alta (Tabela 1), o que se refletiu numa menor atividade do FSII.

Uma outra razão importante para diminuição da atividade do FSII sob a exposição ao estresse por longo tempo é o prejuízo no reparo da proteína D1, uma subunidade do CR do FSII. Na nossa pesquisa, observou-se uma diminuição no conteúdo da proteína D1 em todos os tratamentos, mas muito mais pronunciada quando as mudas foram expostas a seca combinadas com luz alta (Figura 7C). Os resultados obtidos na pesquisa sugerem que os elevados níveis de degradação da D1, particularmente em mudas expostas a seca e submetidas a luz elevada, pode ter contribuído para restringir a formação de EROs e consequente danos oxidativos sob condições indutoras de estresse fotooxidativos, como a seca associada com luminosidades elevadas, visto que a proteína D1 está envolvida na separação de carga primária e transporte de elétron, portanto, os danos estruturais da proteína D1 poderá levar a mudanças de conformação do centro reação de FSII, impedimento de transferência de elétrons e consequente inativação parcial ou total do centro de reação PSII (YAMAMOTO et al., 2008) e menor formação de EROs.

Dessa forma, a análise da expressão da proteína D1, foi um bom indicativo quanto aos danos provocados na estrutura do fotossistema II, bem como da ocorrência de foto-oxidação, visto que a proteína D1 esta envolvida com o processo de transferência de elétrons entre P680 (Centro de reação do FSII) e PQ, levando a limitação da transferência de elétrons. Essa limitação na transferência de elétrons foi avaliada dentro do CR do FSI (Figura 9B). Além da taxa de elétrons reduzida nas

mudas expostas a seca, a análise dos parâmetros do P700 demonstrou limitação do lado receptor do FSI, representado pelo elevado valor de $Y(NA)$ as 12h de exposição a luz elevada nas mudas expostas a seca (Figura 9D).

Contrariamente, os valores de $Y(ND)$, que indicam limitação do lado doador do FSI, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, mas apesar disso, outros dados indicaram que houve uma restrição na transferência de elétrons no lado doador de FSI. Por exemplo, o imunoblot de plastocianina (Figura 7B), revelou diminuição do conteúdo desta proteína nas mudas expostas a seca combinado a luminosidade elevada. Além disso, os valores de S_m e S_m/T_m , indicativos de menor número de aceptores de elétrons e menor *pool* de PQ indicam também limitação do lado doador de elétrons para o FSI (Tabela 1). Esses dados são indicativos da ocorrência de fotoinibição do FSI.

Em muitas espécies de planta, a fotoinibição pode ocorrer nos dois fotossistemas simultaneamente (SONOIKE, 2010). A causa para a inativação do FSI por fotoinibição pode ocorrer de três maneiras: i) inativação do lado receptor; ii) destruição do CR do FSI e iii) degradação de subunidades dos polipeptídeos do CR do FSI ligados a clorofila (YORDANOV; VELIKOVA, 2000). Os três casos estão relacionados a geração de EROs. Sendo o FSI o sítio de formação de H_2O_2 , O_2^- e OH^\bullet , a sequência de eventos para inativação do FSI é interação das EROs como OH^\bullet , e destruição dos complexos FeS, inativando-os e dessa forma induzindo mudanças conformacionais nas proteínas do complexo FSI facilitando o acesso de proteases, o que posteriormente levará a degradação de subunidades de polipeptídeos do CR do FSI (YORDANOV; VELIKOVA, 2000).

A principal fonte de geração de EROs nos cloroplastos é o fluxo de elétrons na CTE dessa organela. Os elétrons carregados são transferidos ao $NADP^+$ para produzir NADPH, numa reação envolvendo as enzimas ferredoxina e NADPH oxirredutase após os FSI (FOYER e NOCTOR, 2000). Essa transferência de elétrons pode ser comprometida sob condições em que o conteúdo do receptor ($NADP^+$) for limitante, o que comumente acontece sob momentos em que ocorre limitação fotossintética (FOYER et al., 2009).

Nessas condições, os elétrons podem ser desviados para a redução do oxigênio molecular (O_2) e gerar o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), umas das principais EROs produzidas na célula vegetal (ASADA, 2006; SUZUKI et al., 2011). No presente estudo, foi observado que as mudas irrigadas além de apresentarem maior ETR, a

detecção de radical superóxido no tecido foliar até as 6h de exposição a luz foi significativamente maior se comparado com as mudas submetidas ao estresse hídrico (Figura 6A e B). Esses resultados demonstram que a manutenção do fluxo de elétrons nas mudas irrigadas, na presença de luminosidade elevada ($2000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), levou a uma maior produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em relação as mudas sob seca (Figura 10).

Com relação aos baixos níveis de outra EROs analisada no nosso estudo (H_2O_2), os dados indicam que houve uma correlação de potencial tolerância a formação do H_2O_2 com o potencial da atividade da catalase para dissipá-lo e assim reduzir os danos fotooxidativos nas mudas expostas a luz moderada ou elevadas, irrigadas e expostas a seca (Figuras 11 e 13). Organismos fotossintéticos possuem duas formas de superar os efeitos danosos da luz e outros estresses oxidativos: um eficiente sistema de enzimas antioxidantes, como a catalase (ASADA, 2006) ou através do reparo do fotossistema II (ANDERSSON e ARO, 2001; ARO et al., 1993).

Os dados sugerem que a fotoinibição teve um papel importante para a proteção fotooxidativa atribuído ao efeito desse processo na redução da atividade dos FSII e consequente menor atividade fotoquímica, o que resultou em menor transferência de elétrons. Essa sugestão é ainda reinterada no presente estudo com base na redução do conteúdo da proteína D1, um dos principais componentes estrutural e funcional do FSII, e da plastocianina (PC), outro importante carreador de elétrons. A modulação do conteúdo dessas proteínas pode ter contribuído para restringir a formação de EROs e consequente danos oxidativos sob condições indutoras de estresse fotooxidativos, como a seca associada com luminosidades elevadas, nessa espécie.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tomados juntos nossos dados sugerem fortemente que as mudas de cajueiro são adaptadas a condição de seca combinada com alta luz, pela manutenção de um bom grau de hidratação foliar e baixo dano de membrana.

A adaptação às condições de seca é associada com uma eficiente modulação nas atividades dos fotossistemas I e II, por meio do balanço entre atividade fotoquímica e as taxas de carboxilação. Aparentemente, as plantas de cajueiro adaptadas à seca desenvolvem mecanismos para aclimatação a luminosidade elevada (“endurecimento ou tolerância cruzada”).

Na condição irrigada as plantas de cajueiro sofrem foto-danos induzido por luz elevada associado com fotoinibição.

Tanto as plantas irrigadas, como as sob seca sofrem fotoinibição em alta luz, provavelmente como um mecanismo de proteção. No caso das irrigadas, esse mecanismo é associado com o aumento dos pigmentos clorofilas, carotenóides e antocianinas. Inversamente, as plantas sob seca apresentam redução nesses pigmentos, possivelmente como um mecanismo de menor captação de luz;

As plantas de cajueiro sob condições irrigadas e de seca possuem mecanismos diferentes em termos das enzimas SOD, CAT e APX, mas tanto a seca como a luz elevada não induzem aparentemente danos oxidativos indicados pelos níveis de peroxidação de lipídios e peróxido de hidrogênio.

Os nossos dados reforçam as observações de campo no sentido de que cajueiro é capaz a suportar condições extremas de seca combinado com intensidade de luz elevada. Novos estudos são necessários para elucidar o quanto à incidência desses fatores adversos contribui para redução da produtividade dessa cultura.

Referências

- ALSCHER, R.G., ERTURK, N. e HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341. 2002.
- AL-KHATIB, K.; PAULSEN, G.M. Enhancement of thermal injury to photosynthesis in wheat plants and thylakoids by high light intensity. **Plant Physiology**; 90:1041–8, 1989.
- ALLAKHVERDIEV, S.I.; NISHIYAMA, Y.; TAKAHASHI, S.; MIYAIRI, S.; SUZUKI, I.; MURATA, N. Systematic analysis of the relation of electron transport and ATP synthesis to the photo-damage and repair of photosystem II in *Synechocystis*. **Plant Physiol**;137:263–73, 2005.
- ANDERSON, B.; BARBER, J. Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. In: Baker NR, editor. **Photosynthesis and the environment: advance in photosynthesis research**. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht; p. 102–21,1996.
- ANDERSSON, B.; ARO, E-M. Photoinhibition of photosystem II. In: Aro, E-M and Andersson B(Eds). **Regulation of Photosynthesis**, PP. 377-393, Klumer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2001.
- ANDERSON, J.M.; CHOW, W.S.; PARK, Y-I. The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. **Photosynthesis. Research**, 46 (1995), pp. 129–139
- ARO, E-M; VIRGIN, I.; ANDERSON, B. Photoinhibition of photo-system II: inactivation, protein damage and turnover.**Biochimica Biophysica Acta**;1143:113–34, 1993.
- ASADA, K. Production and Scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v.141, p. 391-396. 2006.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, 50: 601-639 , 1999.
- BAKER, A.L.; TOLBERT, N.E. Glycolate oxidase (ferredoxin-containing form). **Methods in Enzymology**, v.9, 339-340, 1966.
- BENDALL, D.S.; MANASSE, R.S. Cyclic photophosphorylation and electron transport. **Biochimica Biophysica Acta** 1229:23-38, 1995.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals Botany (Lond)** 91:179-94, 2003

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 722, p. 248–254. 1976.

CHAVES, M.M.; PEREIRA, J.S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M.L.; RICARDO, C.P.P.; OSÓRIO, M.L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. **Annals Botany** 89: 907–916, 2002.

CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal Experimental Botany**. 42: 1-16, 1991.

CHOW, W.S.; ARO, E.M. Photoinactivation and mechanisms of recovery. In: Wydrzynski T, Satoh K (eds) Photosystem II: the light-driven water: plastoquinone oxidoreductase. **Advances in photosynthesis and respiration**. Springer, Dordrecht, pp 627–648, 2005.

COOPMAN, R.E.; FUENTES-NEIRA, F.P.; BRICENO, V.F.; CABRERA, H.M.; CORCUERA, L.J.; BRAVO, L.A. Light energy partitioning in photosystems I and II during development of *Nothofagus nitida* growing under different light environments in the Chilean evergreen temperate rain forest, **Trees-Structure and Function** 24247–259, 2010.

CORNIC, G.; MASSACCI, A. Leaf photosynthesis under drought stress. In: Baker NR, editor. **Photosynthesis and the environment: advance in photosynthesis research**. Kluwer Academic Publishers pp: Dordrecht; . p. 347–66, 1996.

CORNIC, G. Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis. *In* Photoinhibition of Photosynthesis From Molecular Mechanisms to the Field. Eds. N.R. Baker and J.R. Bowyer. **BiosScientific Publishers**, Oxford, pp 297–311, 1994.

ERHARD, P.; CHRISTOF, K.; ULRICH, S. Monitoring the effects of reduced PS II antenna size on quantum yields of photosystems I and II using the Dual-PAM-100 measuring system, **PAM Application Notes** 1 21–24, 2008.

CRUZ, J.A.; AVENSON, T.J.; KANAZAWA, A.; TAKIZAWA, K.; EDWARDS, G.E.; KRAMER, D.M. Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection. **Journal Experimental Botany** 56:395-406, 2005.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W.W. Photoprotection and other responses of plants to light stress. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology** 343:599-626. 1996.

DIETZEL, L.; BRÄUTIGAM, K.; PFANNSCHMIDT, T. Photosynthetic acclimation: state transitions and adjustment of photosystem stoichiometry--functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants. **FEBS J** 275:1080-8., 2008.

EVANS, J.R. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. **Oecologia** 78: 9–19, 1989.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; GALME, S. J.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBO, M. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. **Physiologia Plantarum** 127, 343–352, 2006b.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Energy dissipation in C₃ plants under drought. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 1209–1215. 2002.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; ESCALONA, J.M.; SAMPOL, B.; MEDRANO, H. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. **Functional Plant Biology** 29: 461–471, 2002.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of photo-synthesis in C₃ plants: stomatal and non-stomatal limitation revisited. **Annual Botany-London** 89: 183–189, 2002.

FOYER, C.H., BLOOM, A.J., QUEVAL, G., NOCTOR, G. Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. **Annual Review Plant Biology**. v. 60, p. 455-484, 2009.

FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Tansley Review No. 112 Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologist**, v. 146, p. 359-388. 2000.

FOYER, C.H. Free radical processes in plants. **Biochemical Society Transactions**, v. 24, p. 427–434. 1996

GENTY, B., BRIANTAIS, J.M., BAKER, N.R.. The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta** 990, 87–92, 1989.

GOLDING, A.J.; JOHNSON, G.N. Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. **Planta** 218:107–114, 2003.

HALLIWELL, B. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 44, p. 327–340. 1987.

HÄUSLER, R.E.; BAILEY, K.J.; LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C. Control of photosynthesis in barley mutants with reduced activities of glutamine synthetase and glutamate synthase. III. Aspects of glyoxylate metabolism and effects of glyoxylate on the activation state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase. **Planta** 200, 388–396, 1996.

HAVAUX, M. Temperature-dependent modulation of the photoinhibition sensitivity of photosystem II in *Solanum tuberosum*. **Plant Cell Physiology**;35:757–66, 1994.

HAVAUX, M.; GREPPIN, H.; STRASSER, R.J. Functioning of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat stress in the presence or absence of light. **Planta**;186:88–98, 1991.

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in Tobacco-Leaves. **Plant Physiology**. v. 84, p. 450-455, 1987.

HUNER, N. P.A.; ÖQUIST, G.; SARHAN, F. Energy balance and acclimation to light and cold. **Trends in Plant Science**, Volume 3, Issue 6, p. 224–230, 1998.

YORDANOV,I.; VELIKOVA, V. Photoinhibition of photosystem 1. **Bulgarian Journal of Plant Physiology** ., 26(1–2), 70–92, 2000.

JABS, T.; DIETRICH, R.; DANG, J. Initiation of runaway cell death in an Arabidopsis mutant by extracellular superoxide. **Science** 273: 1853–1856, 1996

KRESLAVSKI, V.D.; KHRISTIN, M.S. Aftereffect of heat shock on fluorescence induction and low-temperature fluorescence spectra of wheat leaves. **Russian Journal Biophys**; 48:806–13, 2003.

KRIEGER-LISZKAY, K Singlet oxygen production in photosynthesis. **Journal Experimental Botany** 56:337-346., 2005.

KRUSE, O. Light-induced short-term adaptation mechanisms under redox control in the PSII–HCII supercomplex: LHCI state transitions and PSII repair cycle. **Naturwissenschaften** 88:284–92, 2001.

LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant Cell and Environment**; 25: 275–94, 2002.

LEE, D.G.; AHSAN, N.; LEE, S.H.; KANG, K.Y.; BHAK, J.D.; LEE, I.J.; LEE, B.H. A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. **Proteomics**, v.7, p.3369-3383, 2007.

LONG, S.P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWISKI, P.G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annual Review Plant. Physiology Plant Molecular Biology**., v. 45, p. 633-661. 1994.

MELIS, A. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulate the rate of photodamage in vivo? **Trends Plant Science**; 4:130–5. 1999

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science** 7:405-405, 2002.

MIYAKE, C.; OKAMURA, M. Cyclic electron flow within PSII protects PSII from its photoinhibition in thylakoid membranes from spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**; 44:457–62, 2003.

MUNEKAGE, Y.; HOJO, M.; MEURER, J.; ENDO, T.; TASAKA, M.; SHIKANAI, T. PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in Arabidopsis. **Cell** 110:361–371, 2002.

MUNEKAGE, Y.; HASHIMOTO, M.; MIYAKE, C.; TOMIZAWA, K.I.; ENDO, T.; TASAKA, M.; SHIKANAI, T. Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. **Nature** 429:579–582, 2004.

MURATA, N.; TAKAHASHI, S.; NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S.I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, p 414-421, 2007.

NIINEMETS, U.; VALLADARES, F. Photosynthetic acclimation to simultaneous and interacting environmental stresses along natural light gradients: optimality and constraints. **Plant Biology** (Stuttg) 2004 6: 254-68, 2004.

NISHIYAMA, Y.; YAMAMOTO, H.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; INABA, M.; YOKOTA, A.; MURATA, N. Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. **EMBO Journal**. 20, 5587– 5594, 2001.

NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; MURATA, N. Inhibition of the repair of photosystem II by oxidative stress in cyanobacteria. **Photosynthesis Research** 84:1–7, 2005.

NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; MURATA, N. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photo system II. **Biochimica Biophysica Acta** 1757:742–749, 2006.

NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; MURATA, N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Physiology Plant** 142:35–46, 2011.

NIYOGI, K.K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology** 50:333-359, 1999.

NOCTOR, G. e FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249–79. 1998.

OLIVEIRA, J.G. **Acompanhamento da fotossíntese líquida e da cinética de emissão de fluorescência da clorofila a de plantas de café (Coffea arabical.) submetidas a um ciclo de suspensão e restabelecimento da irrigação.** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, tese de Mestrado.

OHNISHI, N.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; TAKAHASHI, S.; HIGASHI, S.; WATANABE, M.; NISHIYAMA, Y.; MURATA, N. Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step one occurs at the oxygen-evolving complex and step two occurs at the photochemical reaction center. **Biochemistry** 44:8494–8499, 2005.

PASTENES, C.; PIMENTEL, P.; LILLO, J. Leaf movements and photoinhibition in relation to water stress in field-grown beans, **Journal Experimental Botany**. 56 425–433, 2005.

PUTHIYAVEETIL, S. A mechanism for regulation of chloroplast LHCII kinase by plastoquinol and thioredoxin. **FEBS Lett**;585:1717–21,2011.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; SANTOS, M.G.; OLIEIRA, R.F. Photosynthesis and water relations of well-watered Orange plants as affected by winter and Summer conditions. **Photosynthetica**, v. 47, p.215-222, 2009.

SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E.D., Caldwell, M.M. (Ed.). **Ecophysiology of photosynthesis**. Springer, Berlin, p. 49-70. 1994.

SCHUR, R. U.; WALTER, A.; RASCHER, U. Functional dynamics of plant growth and photosynthesis—from steady-state to dynamics—from homogeneity to heterogeneity. **Plant Cell Environment** 29:340-52., 2006.

SHARKEY, T. D. Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. **Plant, Cell and Environment** 28 , 269–277, 2005.

SILVA, E. N.; FERREIRA-SILVA, S. L.; FONTENELE, A. D. V.; RIBEIRO, R. V.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. **Journal of plant physiology**, v. 167, p. 1157-1164. 2010a.

SINGH, S. K. E REDDY, K. R.. Regulation of photosynthesis, fluorescence, stomatal conductance and water-use efficiency of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under drought. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 105 (2011) 40–50

STRASSER, A., TSIMILLI-MICHAEL, M., SRIVASTAVA, A. Analysis of the fluorescence transient, in: Papageorgiou, G. C.; Govindjee (eds.), Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis. **Advances in Photosynthesis and Respiration** Series. Springer, Dordrecht, p. 32-362,2004.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M, Pathre U, Mohanty P, editors. **Probing photosynthesis: mechanism regulation and adaptation**. London: Taylor and Francis Press; p. 445–83,2000.

SUZUKI, N.; KOUSSEVITZKY, S.; MITTLER, R.; MILLER, G. Chloroplast and mitochondrial ROS signaling in the response of plants to abiotic stress. **Plant Cell Environment** (Invited Review), 2011

TAKAHASHI, S.; MURATA, N. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? **Trends Plant Science** 13:178-82., 2008.

TEIXEIRA, A.R.N., RICARDO C.P.P. Fotossíntese. **Didática Editora**. Lisboa, Portugal. 1983.

THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y.; COLLINGE, D.B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. **Plant J** 11: 1187–1194, 1997.

THORUP, O.A., STROLE, W.B., LEAVELL., B.S. A method for the localization of catalase on starch gels. **J Lab Clin Med.** v. 58, p. 122-128. 1961.

VAN KOOTEN O.; SNEL J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v. 25,p.147-150, 1990.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta** 218:1-14, 2003

WALTERS , R.G. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. **J Exp Bot** 56:435-47. , 2005.

WISE, R.R.,Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light, **Photosynthesis Research** 45, p. 79–97, 1995.

YAMAMOTO, Y.; AMINAKA, R.; YOSHIOKA, M.; KHATOON, M.; KOMAYAMA, K. Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. **Photosynth Res** 98: 589–608, 2008.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V. Photoinhibition of photosystem 1. **Bulg . J. Plant Physiol .**, 26(1–2), 70–92, 2000.

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**, Vol. 58, No. 5, pp. 1207–1217, 2007

ZIMMERMAM, P., HEINLEIN, C., ORENDI, G. e ZENTGRA, U. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, p. 1049-1060, 2006.