



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**JOÃO VICTOR ABREU CERQUEIRA**

**Fotoproteção do PSI induzida por estresses abióticos que restringem a  
assimilação de CO<sub>2</sub> é contrastante em *J. curcas* e *R. communis***

**FORTALEZA  
2016**

**JOÃO VICTOR ABREU CERQUEIRA**

**Fotoproteção do PSI induzida por estresses abióticos que restringem a assimilação de CO<sub>2</sub> é contrastante em *J. curcas* e *R. communis***

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

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio  
Gomes da Silveira

**FORTALEZA  
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- C394 Cerqueira, João Victor Abreu.  
Fotoproteção do PSI induzida por estresses abióticos que restringem a assimilação de CO<sub>2</sub> é contrastante em *J. curcas* e *R. communis* / João Victor Abreu Cerqueira. – 2016.  
108 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. Joaquim Gomes da Silveira.  
Coorientação: Prof. Dr. Milton Costa Lima Neto.
1. Fluxo cíclico de elétrons. 2. Ciclo de Calvin. 3. Poder redutor. 4. pool de P700. I. Título.
- CDD 572
-

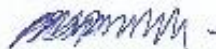
JOÃO VICTOR ABREU CERQUEIRA

**Fotoproteção do PSI induzida por estresses abióticos que restringem a assimilação de CO<sub>2</sub> é contrastante em *J. curcas* e *R. communis***

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

Aprovada em 28/07/2016

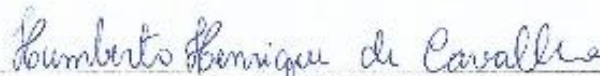
BANCA EXAMINADORA



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



Dr. Fabricio Eulálio Leite Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Professor Humberto Henrique de Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a qualquer entidade ou consciência superior que por acaso venha a existir se existir.

Em seguida eu gostaria de agradecer aos professores doutores Joaquim Gomes Albenísio da Silveira e Milton Costa Lima Neto pela orientação e paciência para com a minha pessoa.

Aos CNPq e a CAPES pela bolsa e os recursos necessários para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos professores do DBBM que contribuíram para a minha formação.

Agradeço à banca examinadora.

Agradeço a todos os colegas e amigos do Labplant que passaram pelo laboratório entre os anos de 2014 a 2016, sem os quais eu provavelmente jamais conseguiria. Prefiro não citar nomes por correr o risco de acidentalmente esquecer alguém que tenha sido de grande importância. Entretanto, faço questão de enaltecer a importância dos amigos Fabrício Eulálio, Marcio Martins, Ana Karla Moreira Lobo, Milton e Juliana (Lima Neto) e Adilton Fontenele não apenas pelo convívio mais próximo, mas também pelas contribuições para meu crescimento como pesquisador e pessoa (por menor que pareça meu delta sem eles teria sido pior).

Agradeço aos amigos novos e antigos que passaram comigo esse período. Novamente, não quero depreciar os de mais colegas, mas me sinto na obrigação de ressaltar Adolph Anderson, Beatriz Caroline Nishi, Camila Tauane, Dalton, José Roberto, Vinícius Osterne e os membros da ZP!

E por fim, um agradecimento muito especial a minha família, principalmente aos membros mais próximos. Meus pais, Giovanni Menezes Cerqueira e Silvia Maria de Abreu Cerqueira, minha irmã Giovanna, minhas avós (avó e bisavó, ambas Maria Luiza) e meu tio Juliano (e família) e a Cléo.

“I can accept failure, but I can’t accept not trying”

- Michael Jordan

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo I

<b>Figura 1</b> Cloroplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i> visualizado por microscopia de eletrotransmitância.....	22
<b>Figura 2</b> Representação da cadeia transportadora de elétrons no tilacoides.....	23
<b>Figura 3</b> Esquema da via linear de elétrons nos tilacóides de plantas superiores.....	26
<b>Figura 4</b> Arquitetura do LHCII.....	27
<b>Figura 5</b> Superestrutura do dímero do PSII.....	29
<b>Figura 6</b> Um esquema simplificado do fluxo linear de eletron e das vias cíclicas....	32
<b>Figura 7</b> Protonação da PsbS e mecanismo de funcionamento do NPQ.....	34
<b>Figura 8</b> Locais de produção de ROS e enzimas de remoção de ROS .....	37
<b>Figura 9:</b> Gráfico da taxa de crescimento de espécies sensível e resistentes ao sal em estresse salino.....	39
<b>Figura 10:</b> Esquema do mecanismo de abertura e fechamento de uma célula-guarda.....	40

### Capítulo II

<b>Figura 1:</b> Fotoquímica do PSII de <i>Ricinus communis</i> e <i>Jatropha curcas</i> exposta ao o tratamento salino.....	73
<b>Figura 2:</b> NPQ <sub>f</sub> e NPQ <sub>s</sub> de plantas <i>Ricinus communis</i> e <i>Jatropha curcas</i> exposta ao o tratamento salino .....	74
<b>Figura 3:</b> Fotoquímica do PSI de <i>Ricinus communis</i> e <i>Jatropha curcas</i> exposta ao o tratamento salino.....	75
<b>Figura 4:</b> Cinética do (P700*/P700 total)normalizada.....	76
<b>Figura 5:</b> Cinética do P700 <sup>+</sup> normalizada em luz vermelho-distante.....	76
<b>Figura 6:</b> Decréscimo do rendimento quântico dos PS.....	77
<b>Figura 7:</b> Concentração de peróxido de hidrogênio em folhas fotoinibidas.....	77

### Capítulo III

<b>Figura 1:</b> Diagrama esquemático da relação entre o PSI e o PSII sobre fotoinibição.....	85
<b>Figura 2:</b> Plantas de <i>Ricinus communis</i> após o tratamento de deficiência hídrica.....	93
<b>Figura 3:</b> Parâmetros relacionados à fotoquímica no escuro.....	94
<b>Figura 4:</b> Eficiência quântica dos fotossistemas e NPQ.....	95
<b>Figura 5:</b> Cinética do P700 <sup>+</sup> normalizada em luz vermelho-distante.....	96
<b>Figura 6:</b> Decréscimo do rendimento quântico dos fotossistemas após o tratamento de fotoinibição.....	97
<b>Figure 7:</b> Concentração de peróxido de hidrogênio em folhas fotoinibidas.....	98

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo II

<b>Tabela 1:</b> Parâmetros de estresse mensurados em plantas de <i>Jatropha curcas</i> e <i>Ricinus communis</i> em estresse salino .....	72
<b>Tabela 2:</b> Parâmetros trocas gasosas em plantas de <i>Jatropha curcas</i> e <i>Ricinus communis</i> em estresse salino .....	72
<b>Tabela S1:</b> CEF mensurado pela inibição do LEF em estresse salino.....	73

### Capítulo III

<b>Tabela 01:</b> Parâmetros associados a estresse de plantas em deficiência hídrica .....	94
--	----



## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ABA - Ácido Abscísico

ADP - Difosfato Adenosina

APX - Peroxidase do Ascorbato

ATP - Trifosfato Adenosina

CAT - Catalase

CEF - Fluxo Cíclico de Elétrons

Chl – Clorofila(s)

Ci - Pressão Interna de CO<sub>2</sub>

CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono

Cty - Citocromo

$\Delta$ pH - Gradiente de Próton (Diferença de pH entre o lumén do tilacoides e o estroma)

$\Delta\psi$  - Potencial de Membrana

DCMU – 3 - (3',4'-diclorofenicol)-1,1-dimetiluréia

E - Transpiração

ETR - Taxa de Transporte de Elétrons do PSII

F<sub>0</sub> - Fluorescência Mínima

F<sub>M</sub> - Fluorescência Máxima

FNR – Ferredoxina – NADP - Desidrogenase

FR - Vermelho Distante

FQR - Ferridoxina Plastoquinona Redutase

Fv/Fm - Máxima Eficiência Quântica do PSII

Gs - Condutância Estomática

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de Hidrogênio

Jc-C – *Jatropha curcas* controle

Jc-S – *Jatropha curcas* sal

LHCI - Complexo Coletor de Luz do PSI

LHCII - Complexo Coletor de Luz do PSII

LEF - Fluxo Linear de Elétrons

NADP/NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (Fosfato)

NDH - NADH *Dehydrogenase-like*

NIR - Próxima ao Infra-Vermelho (*Near Infra- Red*)

NPQ- *quenching* não-fotoquímico

O<sup>2-</sup> - Superóxido

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> - Oxigênio Singleto

O<sub>3</sub> - Ozônio

PGR5 - *Proton Gradient Regulation 5*

PGRL1 - *PGR5-Like Photosynthetic Phenotype 1*

Pi - Fosfato inorgânico

PMC - α-Tocoferol 2, 2, 5, 7,8 - Pentametil-6-Cromanol

Pmf - Força Próton Motriz

P<sub>N</sub> - Fotossíntese de Rede (taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>)

PsbS - Subunidade S do fotossistema II

PSI - Fotossistema I

PSII - Fotossistema II

PQ - Plastoquinona

Q<sub>A</sub> - Quinona A

Q<sub>B</sub> - Quinona B

qE - *Quenching* de Energia

qI- *Quenching* Fotoinibitório

qT- *Quenching* do Estado de Transição

RC - Centro de Reação

Rc-C- *Ricinus communis* controle

Rc-S- *Ricinus communis* sal

ROS - *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigênio)

SOD - Superóxido Dismutase

VDE - Violaxantina De-epoxidase

Y(I) - Rendimento Quântico Efeito do PSI

Y(II) - Rendimento Quântico Efeito do PSII

Y(NA) - Limitação do Lado Aceptor de Elétrons

Y(ND) - Limitação do Lado Doador de Elétrons

Y<sub>Z</sub>- Tirosina z (da Proteína D1 do PSII)

## SUMÁRIO

### Capítulo I – Justificativa e Estado da Arte

<b>1 JUSTIFICATIVA/INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. ESTADO DA ARTE</b> .....	22
<b>2.1 Estrutura dos Cloroplastos</b> .....	22
<b>2.2 Complexos Coletores de Luz</b> .....	25
<b>2.3 Fotossistema II (PSII): Estrutura e Importância</b> .....	28
<b>2.4 Fotossistema I (PSI) e Fotoinibição</b> .....	30
<b>3. MECANISMOS DE FOTOPROTEÇÃO</b> .....	31
<b>3.1 Fluxo Cíclico de Elétrons</b> .....	31
<b>3.2 Quenching não Fotoquímico (NPQ)</b> .....	33
<b>3.3 Metabolismo redox</b> .....	36
<b>4. ESTRESSES ABIÓTICOS E SUAS CONSEQUÊNCIAS</b> .....	38
<b>4.1. Estresse Salino</b> .....	38
<b>4.2. Estresse Hídrico</b> .....	41
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	44

### Capítulo II – Modulação do PSI induzida por NaCl favorece fotoproteção de *Ricinus communis* mas não de *Jatropha curcas*.....

Resumo	54
Introduction.....	55
Material and methods.....	58
Results and discussion.....	62
References.....	68

### Inter-Capítulos ..... 78

### Capítulo III – Impairment in CO<sub>2</sub> assimilation induced by water deficit mitigates PSI photoinhibition in *Ricinus communis*..... 80

Resumo.....	81
1. Introduction.....	83
2. Material and methods.....	88
3. Results.....	92
4. Discussion.....	99
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PESPECTIVAS.....	102
6. References.....	104
Anexo.....	108

## RESUMO

Diversos estresses abióticos induzem o fotodano ao fotossistema II (PSII). Esse fotodano é gerado por um desbalanço entre o poder redutor gerado pela fase redutora da fotossíntese e o consumo desses redutores pelo ciclo de Calvin promovendo dano aos fotossistemas. Caso esses estresse se prolonguem, o dano pode induzir a fotoinibição. Ambos os fotossistemas podem sofrer fotoinibição. Apesar disso, poucos grupos estudaram a fotoinibição do PSI em plantas devido a uma série de dificuldades para estudar esse complexo. Por outro lado, análises *in vitro* sugerem que a fotoinibição do PSI é mais severa do que a fotoinibição do PSII, pois esse fenômeno é irreversível. *Ricinus communis* e *Jatropha curcas* são duas espécies ditas adaptadas a regiões áridas e semiáridas. Ambas as plantas desenvolveram mecanismos para lidar com o desbalanço de energia gerado pela deficiência hídrica e pela salinidade. Por essa razão, essas plantas foram selecionadas como modelos. Nesse estudo, ambas as espécies foram submetidas ao estresse salino e as repostas foram analisadas por meio de métodos biofísicos como trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e absorvância do P700. Surpreendentemente, as plantas de *Ricinus communis* apresentaram um maior potencial de oxidação do *pool* de P700 em estresse mesmo tendo reduzido o fluxo cíclico de elétrons (CEF) enquanto a *Jatropha curcas* apresentou uma redução no *pool* de P700 e um aumento no CEF. A oxidação do P700 tem sido apresentada pela literatura como uma forma de evitar a fotoinibição do PSI, no entanto esse mecanismo é geralmente atribuído ao aumento no  $\Delta pH$  gerado por um aumento na CEF. Posteriormente, as plantas de *Ricinus communis* de ambos os tratamentos tiveram o PSI inibido artificialmente. As plantas que previamente sofreram com estresse salino, conseguiram tolerar melhor a fotoinibição do PSI apesar de terem aumentado a síntese de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Outro estudo foi realizado apenas com plantas de *Ricinus communis* com deficiência hídrica. Os resultados apresentados pelas plantas em estresse salino e com o PSI inibido foram similares aos de plantas estressadas pelo estresse de deficiência hídrica e com o PSI inibido. Em conclusão, o trabalho sugere que plantas de *Ricinus communis* expostas a estresses que limitam o ciclo de Calvin ativam mecanismos fotoprotetores que possivelmente aumentam a pmf e oxidam o P700, mas esse mecanismo não é dependente do CEF.

**Palavras-chaves:** Fluxo cíclico de elétrons, ciclo de Calvin, Poder redutor, *pool* de P700

## ABSTRACT

Several abiotic stresses induced photodamage to photosystem II (PSII). This photodamage is generated by an imbalance between the reducing power generated by the reductive stage of photosynthesis and limitations in consumption of the Calvin cycle. Stresses that promote stomatal closure with salinity and water deficiency are well known for this purpose. When the stress is prolonged, damage can induce photoinhibition of PSII. However, PSI can also be inhibited. *In vivo*, studies have revealed that the PSI is more resistant than PSII. Moreover, *in vitro* studies show that PSI in isolated thylakoid membranes suffers inhibition even at low light levels (50  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). This suggests that PSI *in vivo* requires photoprotective mechanism to prevent a collapse of the plant. Also, due to the low turnover rate of PSI protein complex, photoinhibition is more severe in PSI than in PSII, because this phenomenon is irreversible. On the other hand, there have been few studies of the photoinhibition of PSI in plants due to three factors: the difficulty of measuring the activity of PSI, the limited combination of plant species and environmental conditions in which the phenomenon could occur, and the non-regulatory aspect of photoinhibition of PSI. However, new methodologies capable of measuring *in vivo* the PSI and capable of inducing the PSI photoinhibition techniques have been developed and used to better understand how plants avoid this phenomenon. *Ricinus communis* and the *Jatropha curcas* are two said species adapted to arid and semi-arid regions. Both species have developed mechanisms to deal with the energy imbalance generated by drought and salinity. For this reason, these two species were selected. In this study, both species were subjected to salt stress and the answers were analyzed using biophysical methods such as gas exchange, chlorophyll fluorescence, absorbance of P700. Surprisingly, the plant *Ricinus communis* had a larger pool of oxidation potential of P700 under stress even having reduced the cyclic electron flow (CEF). *Jatropha curcas* showed a reduction in the pool P700 and an increase in the EFC. The oxidation of P700 is displayed in the literature as a way of avoiding photoinhibition PSI, however this mechanism is generally attributed to the increase in proton motive force (PMF) generated by an increase in the EFC. The pmf actually increase because there was an increase in power dissipation as heat measured by the non-photochemical quenching (NPQ). The plant *Ricinus communis* had the PSI inhibited artificially. The plants under salt stress, better able to tolerate the photoinhibition of PSI despite having increased the hydrogen peroxide synthesis ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Subsequently, the experiment was repeated in *Ricinus communis* changing treated water deficit. The results presented by plants in salt stress and inhibited PSI were similar to stressed plants by water deficit stress and inhibited PSI. In conclusion, the study suggests that plant *Ricinus communis* under stresses which limit the Calvin cycle activate photoprotective mechanisms possibly increase the pmf oxidize P700, but this mechanism is not dependent on CEF.

**Keywords:** Cyclic electron transport; Calvin cycle; reducing power ; P700 pool.



## **Capitulo I -Justificativa e estado da arte**

## 1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

O surgimento das reações fotoquímicas consiste em um evento biológico de extrema importância para a evolução da vida na Terra (NELSON *et al*, 2013). De fato, atualmente a maioria dos organismos superiores é dependente de oxigênio, o qual é produzido pelas plantas, algas e cianobactérias por meio da fase fotoquímica da fotossíntese (MAMEDOV *et al*, 2015). Essa importante etapa da fotossíntese consiste em um conjunto de reações biofísicas e bioquímicas, por meio das quais os organismos fotossintetizantes podem produzir poder redutor, especialmente na forma de NADPH, e ATP, a partir de energia quântica da luz (WILHELM; SELMA, 2011). O poder redutor gerado nas etapas fotoquímicas é por sua vez empregado como fonte de energia para as demais reações metabólicas inerentes à sobrevivência do organismo, especialmente a assimilação de CO<sub>2</sub> (RUBAN, 2014).

Em condições ótimas de crescimento, existe um equilíbrio entre a quantidade de energia capturada pelos fotossistemas e o consumo desta através da demanda metabólica celular (FOYER *et al*, 2012). Entretanto, condições ótimas de crescimento são exceções na natureza (WILHELM; SELMA, 2011). Ao contrário, diversas condições de estresse abiótico tais quais: alta luz, alta salinidade e seca podem induzir um desequilíbrio energético, levando ao acúmulo de poder redutor nas cadeias transportadoras de elétrons fotossintéticos (Murata *et al*, 2007). Nessas condições o excesso de energia pode reduzir o O<sub>2</sub> gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) (Murchie e Niyogi, 2011). De fato, as ROS são produtos inevitáveis da fotossíntese aeróbica, porém condições de estresse podem levar ao seu acúmulo excessivo, gerando adversidades para o funcionamento saudável do metabolismo celular como o fotodano ou mesmo a fotoinibição (FOYER; SHIGEOKA, 2011).

Na literatura, as ROS são frequentemente descritas como subprodutos indesejáveis da fotossíntese, pois têm o potencial de causar danos irreversíveis aos componentes da cadeia transportadora de elétrons (TAKAHASHI; MURATA, 2008; MURCHIE; NIYOGI, 2011; FOYER *et al*, 2012). Por outro lado, as ROS também atuam como moléculas sinalizadoras para processos biológicos complexos da planta como morte celular programada, defesa contra patógenos e respostas aos estresses ambientais (GRELLET; BOURNONVILLE; DÍAZ - RICCI, 2011). Portanto, a

regulação da produção e remoção de ROS é essencial para a sobrevivência das plantas (TAKAHASHI; MURATA, 2008).

Dentre as principais ROS, o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), o superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) são gerados nos tecidos das plantas em resposta a uma ampla variedade de estresses (FOYER *et al.*, 2002). Em comparação as outras ROS, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  possui um tempo de meia vida alto, o que pode permitir que ele difunda-se para outras organelas. Alguns estudos têm evidenciado que o acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos cloroplastos pode levar à inibição da síntese *de novo* da proteína D1, a qual é crucial para o funcionamento do fotossistema II (PSII) (SEJIMA *et al.*, 2014; GURURAN *et al.*, 2015). Esse processo é descrito como fotoinibição do PSII e representa um importante parâmetro de sintomatologia do estresse abiótico de plantas (MURATA; TAKAHASHI, 2007). Contudo, as outras ROS têm uma maior reatividade e já foram mostradas como indutoras da fotoinibição. Ambos o oxigênio singlete e o superóxido são produzidos no PSII e podem induzir a fotoinibição pela inibição do reparo da proteína D1 (TAKAGI, 2016).

Em contraste, ao PSI foi creditada uma maior resistência em comparação ao PSII, principalmente devido ao fato das proteínas do complexo coletor de luz de seu centro de reação (RC) serem capazes de dissipar o excesso de energia na forma de calor de maneira extremamente eficiente (ZIVCAK *et al.*, 2015). De acordo com esses estudos clássicos, a fotoinibição do PSI estaria, portanto, limitada apenas a condições de estresse de baixas temperaturas (SONOIKE *et al.*, 2011). O efeito do estresse de baixa temperatura não é completamente entendido, entretanto Sonoike (2011) destacou uma indução do fluxo cíclico de elétrons do PSI (CEF) que leva a uma redução do *pool* de P700 e do decréscimo da atividade de enzimas antioxidativas como a peroxidase do ascorbato (APX) nas plantas susceptíveis a baixas temperaturas e que sofreram com processo de fotoinibição do PSI. Em adição a esses fatores, a eficiência do PSI apresenta dificuldade em ser mensurada devido à sua baixa emissão de fluorescência em temperatura ambiente. (WEIS, 1984).

Entre os anos de 1990 e 1994 foram propostas técnicas que seriam capazes de detectar a oxidação do *pool* de P700<sup>+</sup>. Entretanto, apenas recentemente, estudos pioneiros conduzidos por Sejima *et al.* (2014) evidenciaram que folhas de girassol podem ter o PSI inibido *in vivo* devido às constantes variações de intensidade e

incidência de luz em curtos intervalos de tempo. Tais alterações podem ocorrer, por exemplo, em decorrência do sombreamento de folhas em virtude do movimento de galhos superiores pelo vento, movimento das nuvens e a movimentação do sol durante o dia.

Interessantemente, a inibição do PSI só ocorre em presença de O<sub>2</sub>, o que sugeriu um possível envolvimento das ROS nesse processo (SEJIMA *et al.*, 2014). Posteriormente, Zivcak *et al.* (2015) mostraram que a fotoinibição do PSI compromete a assimilação de CO<sub>2</sub> e que, ao contrário do RC do PSII, a recuperação do PSI é muito lenta. Adicionalmente, esses dados fortalecem a hipótese de que a degradação da proteína D1 é um mecanismo fotoprotetor que evita que o PSI tenha que lidar com o excesso de energia oriundo do PSII (TIKKANEN *et al.*, 2014). Entretanto, a significância fisiológica da fotoinibição do PSI ainda permanece por ser elucidada (SEJIMA *et al.*, 2014).

O excesso de energia e a consequente produção de ROS nos fotossistemas são condições facilmente encontradas em plantas cultivadas em regiões áridas e semiáridas que enfrentam, frequentemente, deficiência hídrica, salinidade e alta luminosidade. (WANG *et al.*, 2013; ALLBED; KUMAR, 2013). Desse modo é possível que plantas adaptadas a essas regiões tenham desenvolvido mecanismos capazes de evitar a fotoinibição do PSI. *Jatropha curcas* e *Ricinus communis* são duas espécies que pertencem à família das euforbiáceas e que são adaptadas a regiões semiáridas. Por outro lado, quando submetidas a condições de estresse, essas espécies atingiram uma homeostase acionando mecanismos de reposta contrastantes uma da outra (LIMA NETO *et al.*, 2014; LEI *et al.*, 2014).

Portanto, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de compreender como esses organismos mantêm a homeostase redox dos dois fotossistemas, principalmente em relação à modulação do estado redox do PSI frente a estresses de deficiência hídrica e salinidade. Para alcançar tais objetivos, foram utilizadas técnicas de mensuração de parâmetros relacionados à fluorescência da clorofila *a*, absorvância do P700 e indicadores do metabolismo oxidativo em folhas de plantas de *Jatropha curcas* e *Ricinus communis* submetidas a estresses de salinidade e déficit hídrico. As características e funções dos diferentes componentes que integram a maquinaria

fotoquímica bem como os estresses estudados são o alvo da revisão de literatura do presente trabalho de dissertação.

## 2. ESTADO DA ARTE

### 2.1 Estrutura dos Cloroplastos

Como organismos fotossintéticos representam a base da nossa vida diária (alimentação, energia, materiais, etc), os efeitos sobre a produtividade primária (a fotossíntese) têm um impacto sobre a sociedade em vários aspectos, incluindo a economia, sustentabilidade ecológica e até mesmo o nosso estilo de vida (SPETEA; RINTAMA, 2014). Nos organismos eucariontes a fotossíntese ocorre em organelas denominadas cloroplastos. Esses plastídios especiais contêm por volta de 120 genes, os quais codificam proteínas do aparato fotossintético (JENSEN; LEISTER, 2014), além de possuírem toda uma gama de funções que incluem a síntese de aminoácidos, clorofila e vários lipídeos (ROBINSON; MANT, 2005). A figura 1 mostra a microscopia de um cloroplasto. Observa-se que essas organelas possuem extensos sistemas de membranas internas.

**Figura 01:** Estrutura representativa de cloroplastos de *Arabidopsis thaliana* visualizado por microscopia de eletro-transmitância.

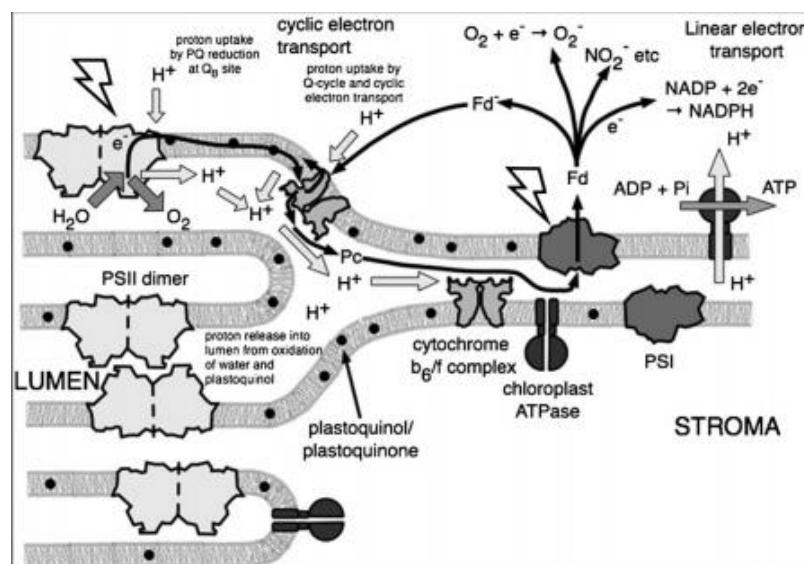


**Fonte:** HIGAKI *et al.*, 2014.

Essas membranas são conhecidas como tilacoides, os quais frequentemente estão empilhados uns sobre os outros formando as lamelas granais (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os tilacoides possuem proteínas integrais de membrana que desempenham a função no transporte de elétrons (cadeia transportadora de elétrons), na produção de

ATP e na geração de um gradiente de pH entre a região interna dos tilacoides (lúmen) e a parte externa (estroma) (ROBINSON; MANT, 2005; FOYER *et al.*, 2012). Como esquematizado na figura 2 os fotossistemas se localizam em regiões distintas da membrana do tilacoides. O PSII se localiza nas lamelas granais, entretanto, o PSI se localiza nas lamelas estromais e nas margens das lamelas (regiões onde não há empilhamento dos tilacoides). Como consequência dessa divisão espacial entre os fotossistemas existem proteínas carreadores que transportam os elétrons do PSII para o PSI, o que permite a regulação desse transporte (FOYER *et al.*, 2012). A regulação do transporte de energia entre os fotossistemas permite que o fornecimento de ATP e NADPH a partir das membranas do tilacoides seja regulado de maneira precisa, de modo a permitir o uso otimizado do poder redutor pelo organismo, o que reduz a produção de oxigênio singlete no PSII e de superóxido no PSI como mostrado na figura 02 (FOYER *et al.*, 2012).

**Figura 02:** Representação da cadeia transportadora de elétrons no tilacoides. A Ferredoxina dependente de elétrons (Fd) associado à via de transporte de prótons. O transporte linear de elétrons corre da água para a Fd via fotossistema II (PSII), *pool* de plastoquinol/plastoquinona (PQ), complexo citocromo  $b_6/f$  e PSI. Os prótons são liberados no lúmen do tilacoides pela quebra da água e pela oxidação do  $PQH_2$ . Esses prótons voltam para o estroma devido ao gradiente de concentração gerando energia para a formação de ATP a partir de ADP e Pi.



Fonte: FOYER *et al.*, 2012

A região dos cloroplastos externa aos tilacoides é preenchida por uma fase aquosa, denominado estroma (TAIZ; ZEIGER 2004). Essa região apresenta diferença marcante quanto à sua composição proteica em relação aos tilacoides. O estroma possui proteínas hidrossolúveis as quais estão envolvidas no ciclo de Calvin como a ribulose –

1,5 –bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) a qual catalisa a fixação de CO<sub>2</sub> (Sharwood et al,2016). Dois fatores são essenciais para o ciclo de Calvin: a concentração de CO<sub>2</sub> e a razão entre ATP/NADPH (FOYER *et al.*, 2012).No início da iluminação das folhas o ciclo de Calvin é limitado pelas baixas concentrações de CO<sub>2</sub> devido ao fechamento estomático. No entanto, com a iluminação contínua a abertura estomática é estimulada, aumentando a concentração de CO<sub>2</sub> livre e progressivamente se tornando alta para a quantidade de Rubisco no estroma (Foyer et al, 2011). Para cada CO<sub>2</sub> fixado pela Rubisco são necessários 3 ATPs e 2 NADPH, sendo importante que a razão de ATP/NADPH seja mantida próximo a 1,5 (TAKAHASHI *et al.*,2013). Desse modo a cadeia transportadora de elétrons pode regular a quantidade de CO<sub>2</sub> fixada e a proporção do ATP/NADPH pode ser regulada por processos como fotorrespiração e pela dissipação de energia pela mitocôndria (NOCTOR; FOYER, 2000).

Conceitualmente, a fotossíntese é o processo no qual o CO<sub>2</sub> e a água são convertidos em carboidratos e oxigênio (WILHELM; SELMA, 2011). Como já foi exposto, não se trata de uma reação química simples. Os organismos fotoautotróficos tiveram que evoluir complexas cascatas de transporte de energia para tornar essa tarefa energeticamente possível e eficiente (RUBAN, 2012). Isso porque a remoção de elétrons da água requer um grande consumo de energia e pode gerar uma grande quantidade moléculas instáveis (SPETEA; RINTAMA, 2014). A operação integrada entre absorção de luz, dissipação de energia e balanço entre a síntese de ATP e redutores compõem o cerne da regulação fotoquímica e suas respostas ao ambiente (FOYER *et al.*, 2012).

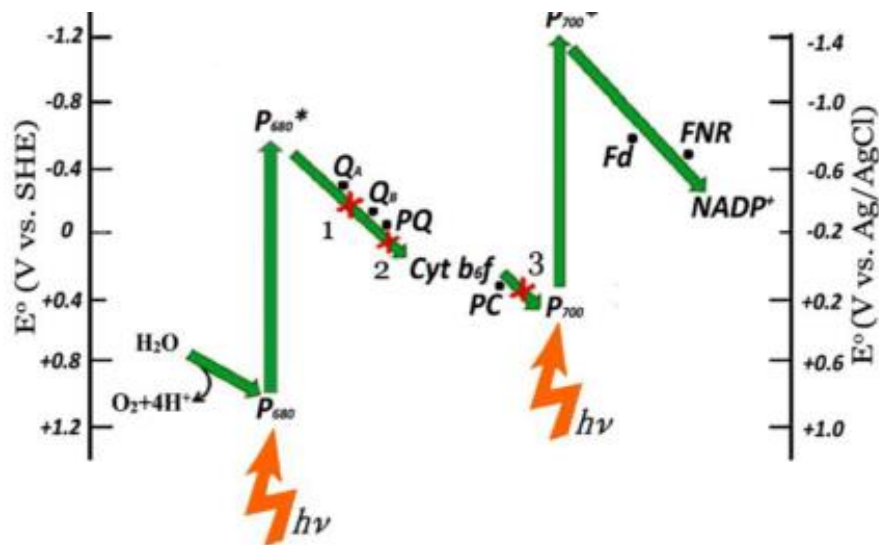
As reações da cadeia transportadora de elétrons do tilacóides que levam os elétrons do PSII ao PSI também são ligadas a passagem de prótons para o lúmen dos tilacóides, resultando em um gradiente de prótons ( $\Delta\text{pH}$ ) que é um dos componentes da força motriz de prótons (a sigla em inglês é pmf) (YAMORI; SHIKANAI, 2016). O pmf é formado por dois componente, o gradiente de prótons ( $\Delta\text{pH}$ ) e o potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) (YAMORI; SHIKANAI, 2016). A formação do pmf entre o lúmen do tilacoide e o estroma tem duas funções: primeiramente, converter ADP e fosfato inorgânico (Pi) em ATP (FOYER *et al.*, 2012). Além disso, a pmf também acidifica o lúmen do tilacoide, o que permite a ativação do mecanismo de dissipação de energia na forma de calor ou *non-photochemical quenching* (a sigla em inglês NPQ) como é resumido na figura 2.

As reações da fotossíntese podem ser divididas em duas etapas: a etapa oxidativa e a redutora. A etapa oxidativa ocorre nas membranas dos tilacoides e compreende o transporte linear de elétrons (LEF), necessário para a formação de NADPH e ATP, e o fluxo cíclico de elétrons (CEF), para formar apenas ATP. Posteriormente, a etapa redutora compreende as reações do ciclo de Calvin-Benson (região estromal), as quais consomem o poder redutor formado na etapa fotoquímica (NADPH e ATP) em um conjunto de reações bioquímicas relacionadas à fixação do CO<sub>2</sub>. Nas plantas, as reações da fase oxidativa ocorrem dentro das membranas dos tilacoides. Essas reações são catalisadas por dois centros de reação (RC) independentes (PHUTHONG *et al.*, 2015). O P700 é o RC localizado no complexo fotossistema I (PSI) e P680 localizado no complexo fotossistema II (PSII) (GOVINDJEE, 2004; WIENTJES *et al.*, 2009). Para realizar suas funções, ambos os RC devem estar associados a complexos coletores de luz (sigla em inglês LHC e o LHCI, associado ao PSI e LHCII, associado ao PSII) (PHUTHONG *et al.*, 2015).

Durante os processos da fase oxidativa, os sistemas envolvidos operam sobre os mais extremos potenciais redox (de +1,2 V para -1,4 V) (Figura 3). Proteínas expostas aos extremos de potencial são suscetíveis a danos por oxidação, formação de radicais livres e/ou quebra de ligações químicas (NELSON, 2013). Acredita-se que os complexos que compõem a cadeia fotoquímica não têm como objetivo apenas aumentar a eficiência, mas também diminuir ao máximo os danos potenciais (NELSON, 2015). Em seguida serão discutidas a estrutura e a função dos complexos mais importantes envolvidos na fotoquímica das plantas de forma mais detalhada.



**Figura 03:** Esquema da via linear de elétrons nos tilacoides de plantas superiores e os potenciais redoxes dos componentes da cadeia transportadora de elétrons.



Fonte: VOLOSHIN *et al.*, 2015.

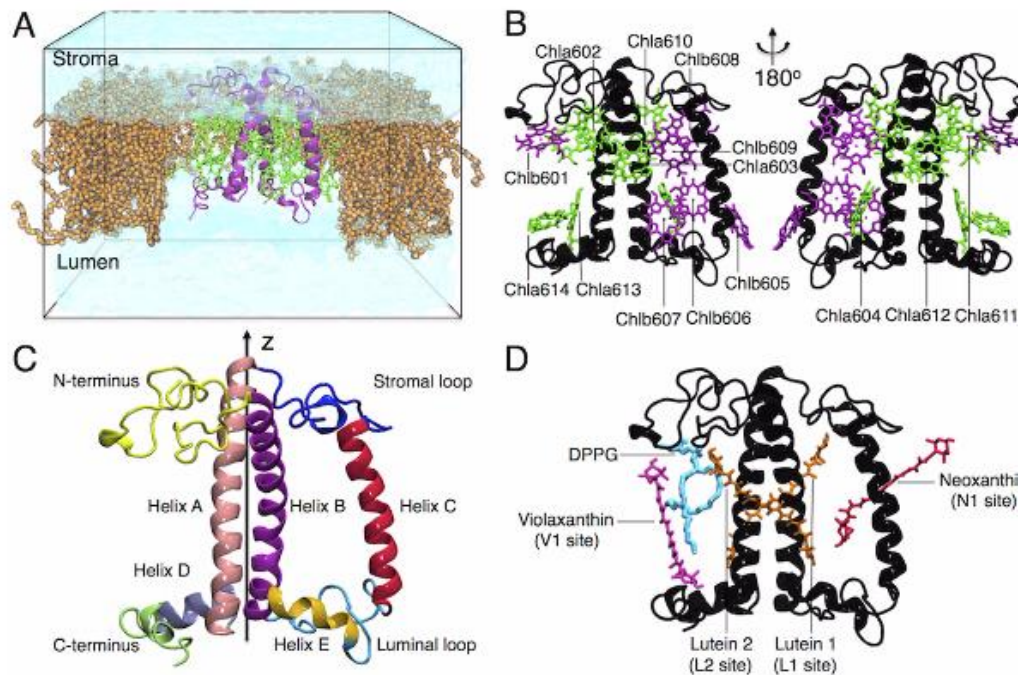
## 2.2 Complexos Coletores de Luz

O LHCI é codificado pelos genes da família *lhca* (*lhca1*, *lhca2*, *lhca3* e *lhca4*). Analisando cristais de proteínas do PSI de plantas de ervilha é possível afirmar que essas proteínas estão organizadas na ordem *lhca1*, *lhca4*, *lhca2* e *lhca3* (WIENTJES *et al.*, 2009). Por outro lado, o LHCII é composto pelas proteínas traduzidas dos genes da família *lhcb* (1-6) (JANSSON, 1999). Esses complexos se associam a pigmentos que capturam luz, mas que precisam estar ligados a proteínas que maximizam sua função (RUBAN, 2014). Isso ocorre porque a ligação com proteínas evita que os pigmentos se associem de forma aleatória (RUBAN, 2014).

A fotoabsorção mediada pelos LHCs é um processo altamente eficiente que atinge valores de rendimento acima de 95% e ocorre em uma escala de tempo de picossegundos ( $10^{-12}$  s) (LEVI *et al.*, 2015). De fato, os LHCs são tão eficientes que podem aumentar a taxa de energia direcionada aos centros de reação em duas ou mais ordens de magnitude (RUBAN *et al.*, 2014). No entanto, transportar eficiente de energia para os centros de reação não é a única função das antenas. Dependendo das condições ambientais, a conformação do complexo LHC pode ser alterada de modo que a conformação determina diretamente como a energia será convertida, em energia fotoquímica ou dissipada em forma de calor (RUBAN, 2014). Desse modo, é compreensível que todos os LHCs partilhem uma alta homologia na sequência proteica

e que possuam um enovelamento muito similar (LIGUORI *et al.*, 2015). Na figura 4 é mostrada a arquitetura de um típico monômero de LHCII com 6 clorofilas b (figura 4B), 8 clorofilas a (figura 4B) e 4 carotenóides (figura 5D).

**Figura 04:** (A-D) Arquitetura do LHCII. (A) Esquema do LHCII contendo água (azul-esverdeado), membrana fosfolipídica (laranja) e todos os pigmentos ligados ao LHCII. (B) Dois ângulos diferentes do complexo LHCII mostrando as ligações com as clorofilas. Oito clorofilas A em verde, seis clorofilas b em purpuras e a apoproteína em preto. (C) Diferentes domínios da estrutura de apoproteínas. (D) Esquemática dos pontos de ligação dos carotenóides e do lipídeo (DPPG).



Fonte: Liguori et al, 2015.

Os LHCs também tem como função dissipar energia em excesso (o que será abordado mais a frente) e também de compensar desbalanços entre os fotossistemas. O espectro de absorção do PSII não se sobrepõe com espectro de absorção do PSI, particularmente em comprimentos de onda mais longos como 690 nm, levando ao fenômeno *red drop* (PAPAGEORGIU; GOVINDJEE, 2014). Portanto, dependendo do comprimento de onda da luz absorvida, uma fotossistema pode ser superestimulados em relação ao outro (PAPAGEORGIU; GOVINDJEE, 2014). Plantas que crescem em áreas sombreadas tendem a sofrer mais com esse tipo de problema porque a antena do PSI que absorve vermelho distante tem menos energia para absorver nesse comprimento de onda. No entanto, esse problema é evitado devido ao chamado estado de transição (RUBAN, 2014). O estado de transição consiste em uma migração lateral do LHCII do PSII na região empilhada do tilacoides para o PSI na lamela estromal, o que balanceia o

fluxo de energia entre os fotossistemas (TAKAHASHI *et al.*, 2013). Em *Chlamydomonas reinhardtii* no estado 1, o LHCII está ligado ao PSII e a quinase Stt7 está ausente ou inativa. Entretanto, se ocorrer uma perturbação na homeostase de energia entre os fotossistemas ocorrerá a fosforilação do LHCII mediado pela Stt7 (TAKAHASHI *et al.*, 2013). Segundo a teoria, o trímero de LHCII fosforilado migra do PSII para o PSI nas regiões da membrana expostas ao estroma (estado 2). Conforme o trímero de LHCII se torna desfosforilado, a volta deste para o PSII é favorecida (TIKKANEN; ARO, 2012).

### 2.3 Fotossistema II (PSII): Estrutura e Importância

O PSII é um complexo proteico integral de membrana localizado na região empilhada dos tilacoides. Esse supercomplexo tem aproximadamente 700 kDa e cada monômero contém ao menos 20 subunidades, incluindo a CP43, CP47, D1, D2 e o citocromo (cyt)  $b_{559}$ , além de 60 cofatores orgânicos e inorgânicos diferentes (SATO, 2008). Acredita-se que os complexos do PSII normalmente estão funcionais quando em dímeros. Os monômeros são provavelmente formas intermediárias na via normal de montagem ou no ciclo de reparo (HANKAMER *et al.*, 1997).

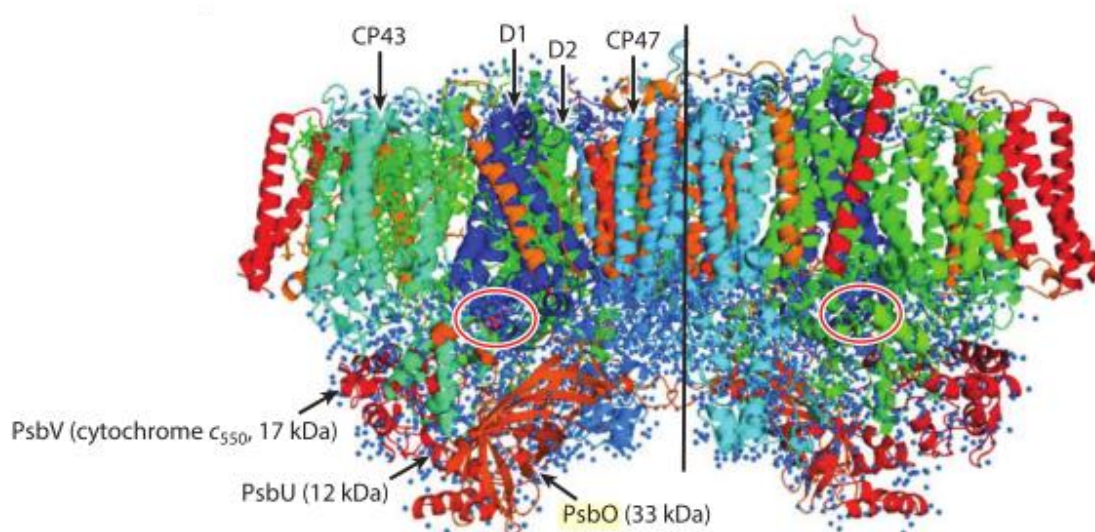
O PSII é de suma importância para a fotossíntese aeróbica. Esse processo só é possível quando a proteína D1 está ligada ao cofator  $Mn_4CaO_5$  pela tirosina z ( $Y_z$ ), sendo essa a estrutura capaz de remover elétrons da água (COX, 2014). O *cluster*  $Mn_4CaO_5$  converte duas moléculas de água em uma de oxigênio e libera quatro prótons através de um ciclo coordenado pela luz que consiste de cinco intermediários chamados de estados  $S_i$  (sendo  $i = 0-4$ ) (IFUKU *et al.*, 2016). Dentre os estados o mais estável no escuro é o  $S_1$ . Quando é aplicado um flash de luz cada  $Mn_4CaO_5$  avança do seu atual estado  $S_i$  para  $S_{i+1}$ . O oxigênio molecular é liberado durante a transição dos estados  $S_3-S_4$  (IFUKU *et al.*, 2016).. A oxidação da água dirige praticamente todo o  $O_2$  da Terra e produz praticamente toda a biomassa (DEBUS, 2015).

O complexo do núcleo do PSII em organismos fotossintéticos eucariontes é composto pelas proteínas codificadas pela família gênica *Psb* composto por mais de 30 genes (PAGLIANO *et al.*, 2013). Dentre esses genes, *PsbA* e *PsbD* transcrevem proteínas com 5 hélices transmembranares que compõem o núcleo do PSII (D1 e D2) (NIELD; BARBER, 2006). A D1 tem sido largamente estudada graças a sua capacidade de degradação e ressíntese em curto período de tempo (rápido *turnover*) (NICKELSEN;

RENGSTL, 2013). A D1 é a proteína com o maior número de ligações com cofatores do PSII tais como a tirosina Z ligada ao *cluster*  $Mn_4CaO_5$ , ao  $P680^+$  da clorofila *a* pela histona 198 e a feofitina pela tirosina 126 (PAGLIANO *et al.*, 2013).

A estrutura de alta resolução do PSII de cianobactérias revela que os centros de reação do PSII são protegidos na membrana pelas proteínas CP43 (PsbC) e CP47 (PsbB) (ligadas a clorofilas) e isoladas do meio luminal pelas proteínas intrínsecas, PsbU e PsbV como mostrado na figura 5 (NIELD; BARBER, 2006; KRYNICKÁ *et al.*, 2015). Essas três proteínas são necessárias para manter a reação de quebra da água (SHEN, 2015). A PsbO é conhecida como proteína estabilizadora de magnésio e trata-se de uma proteína extremamente conservada que possui um domínio que atua como um local de ancoramento que se liga a superfície luminal da D1, D2, CP43 e CP47, estabilizando o aglomerado  $Mn_4CaO_5$  e mantendo uma ótima oxidação da água (PAGLIANO *et al.*, 2013).

**Figura 05:** Superestrutura do dímero do PSII analisado por uma resolução de 1,9 Å destacando a D1, D2, CP43, CP47, PsbO, PsbU e PsbV.



**Fonte:** SHEN, 2016.

A produção de ROS no PSII leva a um dano na ligação entre a tirosina Z e o *cluster*  $Mn_4CaO_5$ . No entanto há um rápido *turnover* da proteína, o que garante que em condições não estressantes haja um *pool* de D1 funcionando (GURURANI *et al.*, 2015). A inibição do reparo da proteína D1 é causada pelo oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e a degradação é realizada pela protease FtsH (NISHIYAMA *et al.*, 2004; KRYNICKÁ *et al.*, 2015). A D1 é considerada uma “proteína suicida”, pois sua degradação evita que o

excesso de energia gerado no PSII promova um dano oxidativo (ARO; ANDERSON, 1993). Em estudos recentes Tikkanen et al. (2014) têm mostrado que o PSI é protegido pelo ciclo de inibição/reparo da D1, o que evita um dano irreversível. Por outro lado, em estresses severos e/ou muito prolongados nos quais o fotodano excede a taxa de reparo ocorre a chamada fotoinibição do PSII (TAKAHASHI *et al.*, 2009).

#### **2.4 Fotossistema I (PSI) e fotoinibição**

O PSI é um complexo de 650 kDa contendo 18 subunidades e mais de 200 grupos prostéticos (AMUNTS *et al.*, 2010). Cristais do complexo do PSI de cianobactérias analisados por uma resolução de 3.1 Å revelam pelo menos 174 clorofilas, 32 carotenoides, 3 conglomerados Fe-S e duas filoquinonas (NELSON *et al.*, 2013). As proteínas que compõem esse supercomplexo são codificadas pela família Psa. O núcleo do PSI é composto por proteínas codificadas pelos genes presentes nos cloroplastos. Em *Chlamydomonas reinhardtii*, quatro subunidades compõem o centro de reação do PSI. A PsaA e a PsaB são as subunidades maiores e a PsaC e PsaJ são as subunidades menores (LEFEVRE *et al.*, 2015). Já nas plantas superiores o centro de reação é composto por 12 peptídeos: PsaA à PsaL (HIYAMA, 2005).

Recentemente foi demonstrado que uma abrupta iluminação aumenta a probabilidade da doação de elétrons que chegam ao PSI para o O<sub>2</sub> via ferredoxina, o que leva a produção de ROS (SEJIMA *et al.*, 2014). Essa diferença de intensidade de luz pode ser causada naturalmente por meio da interrupção do dossel provocada pelo vento, sombreamento, nuvens etc. O estudo evidenciou que a inativação do PSI seria causada pela inibição da oxidação do PSI e que esse bloqueio da oxidação do PSI só ocorre em presença de O<sub>2</sub>, o que levou os autores a concluir que as ROS causavam a fotoinibição do PSI (SEJIMA *et al.*, 2014). Essa conclusão corrobora com Sonoike et al. (1997), que demonstraram que a PsaB é degradada pelo radical hidroperóxido que pode ser formado pela reação entre o centro Fe-S do centro de reação do PSI e o peróxido de hidrogênio. Essa reação permite que uma serinoprotease tenha acesso à PsaB (SONOIKE *et al.*, 1997).

Entretanto, em estudos mais recentes Takagi et al. (2016) demonstraram que ao menos no início da fotoinibição do PSI não há degradação de proteínas que compõem o complexo do PSI. Além disso, no mesmo estudo os autores concluem que apesar dos superóxidos serem produzidos durante o processo de fotoinibição, seu

aumento não leva a um incremento na fotoinibição do PSI em cloroplastos isolados independentemente da presença das enzimas desintoxicantes (APX e SOD). Entretanto, ao se utilizar um removedor de oxigênio sínglete (PMC) ficou evidente que os cloroplastos foram mais resistentes a fotoinibição o que leva a crer que, de forma similar ao P680, a clorofila do centro de reação do P700 no seu estado trípleto pode doar elétrons para o O<sub>2</sub> formando o oxigênio sínglete <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e este provoca a fotoinibição do PSI (TAKAGI *et al.*, 2016). Na natureza há vários estresses abióticos que podem acarretar a superprodução de ROS e induzir a fotoinibição, mas ainda a importância fisiológica da fotoinibição do PSI ainda não foi caracterizada (SEJIMA, 2014) bem como possíveis mecanismos de escape ainda não foram relatados.

### 3. MECANISMOS DE FOTOPROTEÇÃO

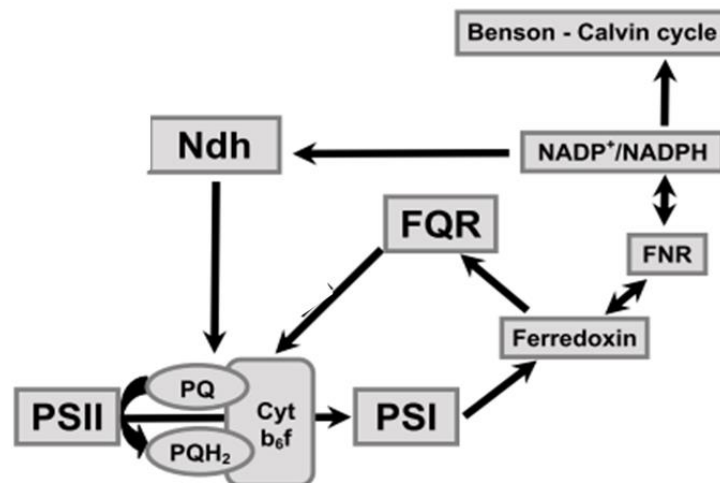
#### 3.1 Fluxo Cíclico de Elétrons

O fluxo cíclico de elétrons (CEF) em torno do PSI foi descrito pela primeira vez por Arnon (1955). Nos anos seguintes, um grande volume de artigos tem fornecido evidência, *in vivo* e *in vitro*, do funcionamento dessa via em algas e plantas (MUNEKAGE *et al.*, 2004; GILES, 2005; GODAUX *et al.*, 2015). Contraditoriamente, a mensuração do CEF nas plantas é difícil principalmente em plantas C3 (GILES, 2005). O problema comum para medir todos os processos cíclicos é que não existe um *net flux*, mas seus componentes (cty b<sub>6</sub>f, PSI) poderiam ser medidos como uma forma de estimar via o fluxo de elétrons entre os dois complexos (Citocromo b<sub>6</sub>f e PSI). Entretanto no caso da CEF esses componentes também fazem parte do fluxo linear de elétrons (GILES, 2005). Desse modo as estratégias empregadas sempre mostram uma estimativa do processo.

Diferentes abordagens podem ser utilizadas para estimar o CEF: é possível bloquear o fluxo linear usando o inibidor DCMU (GILES, 2005), dividir o rendimento quântico do PSI pelo rendimento quântico do PSII (YAMORI *et al.*, 2011) e pela oxidação do P700 em plantas adaptadas à luz (ZIVCAK *et al.*, 2014). O CEF pode ser dividido em duas rotas independentes. A rota PGR5-PGRL1 leva os elétrons da ferredoxina para a plastoquina ou para o citocromo b<sub>6</sub>f. Alternativamente, a via NADP desidrogenase (NDH) é capaz de usar consumir os elétrons do NADPH para o *pool* de plastoquinonas (Figura 6). Ambas as rotas geram um gradiente de ΔpH com o complexo citocromo b<sub>6</sub>f. O ΔpH permite a síntese de ATP sem a produção de NADPH no

cloroplasto (YAMAMORI; SHIKANAI, 2016). Os aspectos químicos e energéticos da estequiometria de produção de ATP pelo fluxo linear de elétrons ainda demandam mais estudos. No entanto, há um consenso de que o transporte linear de elétrons (LEF) não gera ATP suficiente para que haja um balanço adequado de ATP/NADPH no ciclo de Calvin (JOLIOT; JOHNSON, 2011).

**Figura 06:** Um esquema simplificado do fluxo linear de eletron e das vias cíclicas. Ndh - NADP desidrogenase; FNR - ferridoxina NADP-desidrogenase; FQR - ferredoxina Plastoquinona Redutase; PQ - Plastoquinona; PS - Fotossistema.



Fonte: ESSEMINE *et al.*, 2011.

Sob condições estressantes as plantas tendem a aumentar o  $\Delta pH$  para poderem ativar o NPQ (TAKAHASHI *et al.*, 2009). A literatura tem detalhado como o aumento de CEF é uma estratégia benéfica para as plantas, pois permite que elas se protejam de danos oxidativos. Plantas de trigo sobre condições de deficiência hídrica rapidamente geram um  $\Delta pH$  que é promovido pelo CEF (ZIVCAK *et al.*, 2014). Respostas similares são encontradas em cevada, girassóis e alface sob diferentes tipos de estresse como seca, frio e deficiência de ferro (JOLIOT; JOHNSON, 2011; TAKAHASHI *et al.*, 2009; SEJIMA *et al.*, 2014). Plantas de *Arabidopsis thaliana* que sofreram silenciamento da via da PGR5 não foram capazes de reparar os danos oxidativos de estresses de alta luz (TAKAHASHI *et al.*, 2009). Além disso, o silenciamento da PGR5 leva a uma queda na assimilação de CO<sub>2</sub> e à produção de biomassa (NISHIKAWA *et al.*, 2012). Por outro lado, plantas de tabaco e *Arabidopsis* que foram silenciadas para a via NDH não mostraram perda de crescimento em condições favoráveis, todavia foram mais sensíveis a alguns estresses como alta luz (YAMORI, 2015). Desse modo, a via PGR5 em plantas é considerada essencial

enquanto a NDH atuaria como uma “válvula de escape” em situações estressantes (YAMORI, 2015).

No entanto, alguns autores têm fornecido dado que sugerem a possibilidade da importância do CEF ser espécie – dependente e estresse – dependente. Em *Arabidopsis* o gene *crr2* está envolvido com a via NDH e o gene *pgr5* codifica a proteína de mesmo nome que é essencial para a via PGR5 - PGL1 (NISHIKAWA *et al.*, 2012). Quando as plantas de *Arabidopsis* estão expostas a estresse de variação de luz a via PGR5 - PGL1 é relevante para a resposta ao estresse, enquanto a via NDH não aparenta influenciar (ESSEMINE *et al.*, 2011). Em plantas de arroz Yamori e colaboradores (2016) estudaram o efeito de flutuações de luz sobre o transporte de elétrons nos fotossistema quando uma das vias estivesse inibida. Os autores chegaram à conclusão de que ambas as vias têm papel fisiológico sobre flutuações de luz em plantas de arroz (YAMORI *et al.*, 2016). Desse modo, torna – se evidente que há uma diferença intrínseca entre *Arabidopsis* e arroz. Em plantas de *Arabidopsis* a via do NDH não tem função fisiológica no crescimento, no entanto possui no arroz (YAMORI *et al.*, 2016). Logo, provavelmente plantas diferentes podem apresentar CEFs com funções fisiológicas diferentes das descritas para a planta modelo *Arabidopsis*.

Curiosamente, em alguns casos o CEF pode afetar negativamente o desempenho da planta. Quando plantas de *Arabidopsis* sofreram silenciamento para um desses genes das vias de CEF, as plantas se mostraram mais resistentes ao estresse de calor, o que foi demonstrado por meio de abordagens fluorescência e cinéticas do P700 (ESSEMINE *et al.*, 2011).

### **3.2 Quenching Não-Fotoquímico (NPQ)**

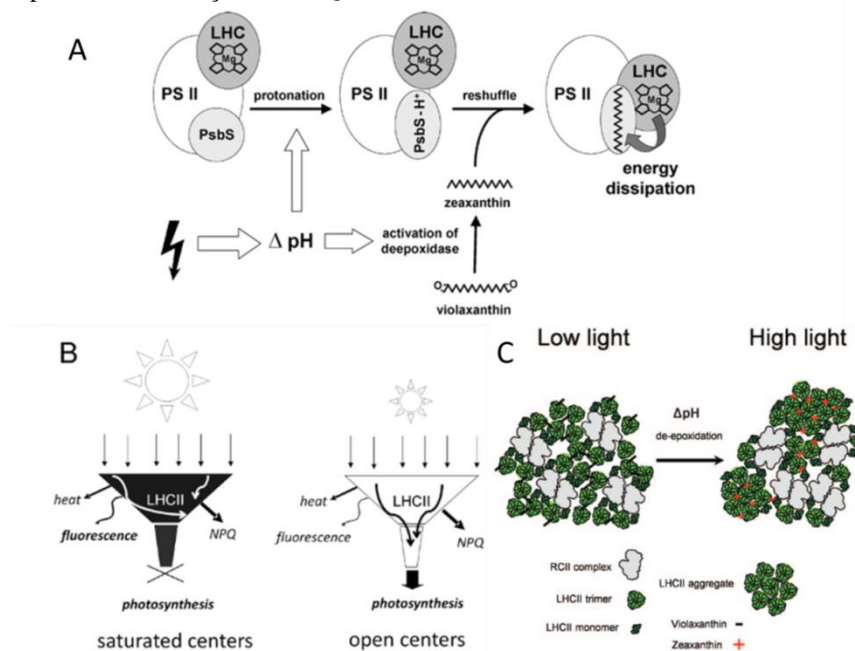
O *quenching* não-fotoquímico foi primeiro demonstrado por Papageorgiou e Govindjee (1968) em estudos com cianobactérias e algas verdes. Posteriormente, foi demonstrado em tilacoides isolados que a clorofila *a* também era capaz de realizar o *quenching* não – fotoquímico pela formação de um “estado de alta energia” (PAPAGEORGIU; GOVINDJEE, 2014). Os pesquisadores também demonstraram que esse estado de alta energia se mantinha ao gradiente de prótons transtilacoidal e relataram uma mudança estrutural no aparato fotossintético (PAPAGEORGIU; GOVINDJEE, 2014). Entretanto, para uma compreensão básica do fenômeno do NPQ foram necessárias várias descobertas realizadas entre os anos de 1950 e 2004: o ciclo



das Xantofilas (SAPOZHNIKOV *et al.*, 1957); o isolamento da Violaxantina De-epoxidase (VDE) (HAGER; PERZ, 1970); a ligação da VDE livre do lúmen às membranas do tilacoides em pHs próximos a 5,0 (HAGER; HOLOCHER, 1994); o fato de a maioria das violaxantinas disponíveis para a desepoxidação está presente no LHC II (RUBAN *et al.*, 1999) e o envolvimento da PsbS no NPQ (LI *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2004).

Atualmente, sabe-se que em condições nas quais há mais energia do que pode ser aproveitado para fotossíntese os complexos antena (discutidos na sessão 2.2.1) passam a ter como função evitar que o excesso de luz afete o funcionamento dos centros de reação ativando o mecanismo de dissipação de energia na forma de calor (qE), o principal componente do *quenching* não-fotoquímico (NPQ), como esquematizado na figura 7A.

**Figura 07:** (A) Protonação da PsbS induz mudanças conformacionais nos complexos antena, como resultado os carotenoides passam a ter um contato próximo com as clorofilas do LCH. Como consequência ocorre a excisão de energia da clorofila para a zeaxantina e ocorre a dissipação de energia na forma de calor (B) Esquema que ilustra condições de excesso de luz, que provoca fechamento do RCII, saturação e um aumento no NPQ, o qual amortece o excesso de energia prejudicial em calor (à esquerda). Quando a luz torna-se subitamente muito fraca, o RCII volta a capturar a energia de excitação de forma eficaz, apesar da presença do NPQ. Assim, o NPQ só protege RCII fechado e não causa perdas de energia quando RCII está aberta. (C) Esquema que ilustra a reorganização do LHCII-PSII quando exposta a condições que provocam a indução do NPQ.



**Fontes:** WILHELM; SELMA, 2011; RUBAN, 2014.

Na figura 7A é possível observar que o aumento do  $\Delta pH$  e da desepoxidação da violaxantina para zeaxantina cooperativamente levam à agregação do

LHCII. A proteína PsbS, diretamente relacionada ao complexo antena, atua como um sensor de  $H^+$ . Quando a PsbS está protonada, devido à queda no pH lumenal, a zeaxantina pode se ligar a essa proteína. Graças a essa proximidade entre a zeaxantina com as clorofilas do LHC, ocorre a excisão de energia para esse carotenoide, o qual irá dissipar a energia na forma de calor (WILHELM; SELMA, 2011). Esse mecanismo é chamado de *quenching* de energia (qE) o qual é o maior componente do *quenching* não-fotoquímico (NPQ) e tem uma importante função fotoprotetora. Como mostrado na figura 7B, esse mecanismo ocorre apenas em centros de reação que já estejam saturados de energia, evitando o desperdício de energia e danos a RC fechados (RUBAN 2014). Na figura 7C são esquematizadas as alterações que ocorrem na superestrutura do LHCII-PSII durante o processo de formação do qE.

A literatura tem mostrado a indução desse mecanismo em vários estresses de origem abiótica como seca, salinidade e alta luz (SILVA *et al.*, 2010; LIMA NETO *et al.*, 2014b; ZIVCAK *et al.*, 2014). No entanto, em condições estressantes, nem sempre o maior componente do NPQ será o de dissipação de energia, podendo ter correlação com o fotodano (MAXWELL; GILLES, 2000). O NPQ em folhas adaptadas à luz pode ser dividido em quatro componentes que podem ser diferenciados por uma cinética de relaxamento no escuro (ZULFUGAROV *et al.*, 2014):

1. O *quenching* dependente de energia (qE) que é ativado pelo aumento do gradiente de prótons transtilacoidal e que decai rapidamente no escuro (segundos a minutos);
2. O *quenching* do estado de transição (qT) relacionado ao fenômeno do estado de transição, que decai mais lentamente do que o qE;
3. O *quenching* fotoinibitório (qI), o qual possui o mais lento relaxamento no escuro, incluindo componentes que não relaxam com os danos irreversíveis.
4. O *quenching* de zeaxantinas (qZ), recentemente descoberto ocorre em plantas mutantes que perderam a capacidade de forma qE, mas mesmo assim ainda mantinham um *quenching* que dissipa de maneira rápida. Esse *quenching* foi atribuído às xantinas

Geralmente, em condições não estressantes e em luz saturante, o qE é o maior componente e qI começa a se tornar proeminente em condições de excesso de luz ou em condições estressantes que impeçam o consumo de redutores produzidos pelo transporte de elétrons (BAKER, 2008). O *quenching* associado ao qT só é relevante em luz baixa (BAKER, 2008). Atualmente, os grupos de pesquisa que estudam o funcionamento do NPQ como um mecanismo fotoprotetor tem adotado a cinética de relaxamento como um parâmetro mais confiável de dissipação de energia em calor (MAXWELL; GILLES, 2000; CAO *et al.*, 2013; RUBAN *et al.*, 2014).

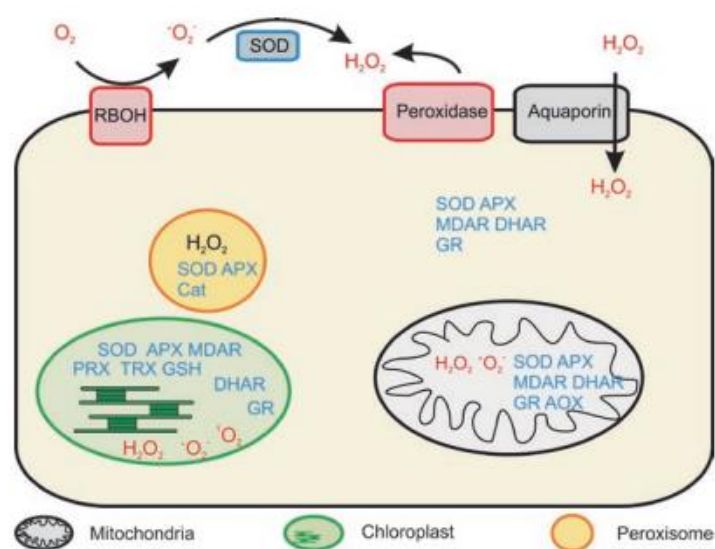
### 3.3 Metabolismo Redox

Nos últimos 5 anos, mais de 50.000 artigos foram publicados sobre o estresse oxidativo em plantas (FOYER *et al.*, 2015). Esse fato revela um contínuo e crescente interesse pela função do fenômeno em biologia vegetal (FOYER *et al.*, 2015). No entanto, é necessário cuidado ao estudar sistemas complexos e dinâmicos como a síntese e remoção de ROS (NOCTOR *et al.*, 2015). As ROS estão envolvidas em vários processos como a rápida resposta de fechamento estomático em vários estresses (WANG *et al.*, 2016), na sinalização redox de tiorredoxinas pela oxidação dos aminoácidos de cisteína (GARC *et al.*, 2014), germinação de sementes (KOCSY *et al.*, 2015), etc. Entretanto, condições que promovam o acúmulo de ROS podem oxidar componentes importantes do metabolismo, como lipídeos, proteínas e DNA (MITTLER, 2002; SILVA *et al.*, 2010). Essa acumulação é uma característica comum a um grande número de estresses abióticos e é geralmente devido a uma indução da produção de ROS, denominado “explosão oxidativa” (BROSCHÉ *et al.*, 2010).

No início da evolução da fotoquímica a explosão oxidativa não foi um problema graças à baixa concentração de oxigênio na atmosfera. Entretanto, conforme os níveis de oxigênio subiam como consequência da fotossíntese, a evolução do sistema antioxidante em plantas para controlar o balanço de ROS teve uma função essencial para a sobrevivência das plantas às mudanças ambientais (GEST *et al.*, 2013). Como foi anteriormente discutido, as ROS podem ser produzidas pelo excesso de energia nos fotossistemas em condições estressantes, mas existem outras vias de produção de ROS em resposta ao estresse localizadas em outras organelas como é o caso da NADPH oxidase presente nas mitocôndrias (SAGI *et al.*, 2006). Como mostrado na figura 8, as ROS podem ser convertidas em outro tipo pela quebra da molécula como é o caso do

ozônio ( $O_3$ ) que pode decair para peróxido de hidrogênio, superóxido e oxigênio singlete, ou por uma via enzimática como é o caso do superóxido que é convertido em peróxido de hidrogênio, via SOD (BROSCHÉ *et al.*, 2010). Para evitar os efeitos negativos das ROS há uma grande diversidade de antioxidantes enzimáticos (ascorbato peroxidase (APX); superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)) e não-enzimáticos (ascorbato, glutatona, carotenoides e torcofenóis) (FOYER *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2013).

**Figura 08:** Locais de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e enzimas de remoção de ROS. Abreviações- SOD – Superóxido dismutase; APX – Peroxidase de Ascorbato; MDAR – Monodehidroascrobato Redutase; DHAR – Dehidroascrobato redutase; GR – Glutaciona redutase; AOX – Oxidase alternativa; CAT – Catalase; PRX – Peroxiredoxina; TRX - Tiorredoxina



**Fonte:** BROSCHÉ *et al.*, 2010.

Dentre as ROS, a mais abundante durante os estresses é o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (PASSAIA *et al.*, 2013). Este é produzido pela dismutação do superóxido pela SOD, pela NADPH oxidase (NOX) de mitocôndrias e como subproduto de reações como a fotorrespiração (BROSCHÉ *et al.*, 2010).  $H_2O_2$  é uma molécula relativamente estável com baixo potencial redox se comparado a outras ROS (1,8 eV) e com potencial para a sinalização intra/intercelular. Contudo, o peróxido de hidrogênio em presença de  $Fe^{2+}$  pode ser convertido a uma molécula altamente tóxica e com elevado potencial redox (2,8 eV), o radical superóxido ( $\cdot OH$ ). Esse processo é chamado de reação de Fenton (ASGHAR *et al.*, 2015). Concomitantemente, as enzimas que removem o  $H_2O_2$  são importantes protetores da homeostase vegetal. Dentre essas

enzimas podemos citar a Ascorbato Peroxidase (APX), a Glutathione Peroxidase (GPX) e a Catalase (CAT). Não obstante, a regulação dessas enzimas nem sempre é óbvia. A literatura provê exemplos de espécies vegetais nas quais a remoção de uma isoforma de uma dessas enzimas não é compensada por outras peroxidases e afeta o crescimento e desenvolvimento da planta como é o caso da APX1 em *Arabidopsis thaliana* (PNUELLI *et al.*, 2003). Entretanto outras publicações mostram que a deleção de duas ou mais isoformas de uma enzima considerada importante na remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como é o caso de plantas duplo – mutantes silenciadas para APX1 e APX2 em arroz não apresentarem diferenças fenotípicas em condições controle (BONIFÁCIO *et al.*, 2011).

#### **4. ESTRESSES ABIÓTICOS E SUAS CONSEQUÊNCIAS**

O maior desafio para a agricultura no mundo é o aumento da produção de alimento em 70% para sustentar o aumento populacional que passará de 7 bilhões de pessoas para 9,4 no ano de 2050 (UNITED STATES CENSUS, 2012). Contudo, os estresses abióticos causados por diversas condições ambientais adversas, tais como seca, calor, toxicidade por metais pesados e alta luz resultam em uma excessiva redução da cadeia transportadora de elétrons, fotoinibição, restrição fotossintética e conseqüentemente, queda de produtividade (GURURANI *et al.*, 2015). Contraditoriamente, a mudança climática tem aumentado a incidência e a intensidade desses estresses (LONG *et al.*, 2015). Portanto, compreender os efeitos e os mecanismos para os estresses abióticos é uma prerrogativa básica para suprir as futuras necessidades alimentícias da população.

Os mecanismos fisiológicos e de desenvolvimento capazes de permitir uma planta tolerar prolongados períodos sob estresse podem envolver numerosos atributos (SILVA *et al.*, 2010). Nesse contexto, plantas bem adaptadas a regiões áridas e semiáridas como *Jatropha curcas* e *Ricinus communis* podem fornecer várias informações sobre como mitigar tais estresses.

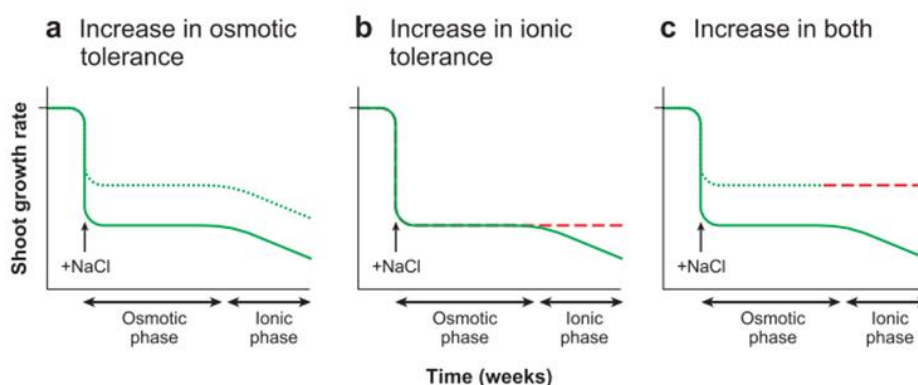
##### **4.1 Salinidade**

Mais de 800 milhões de hectares de terra em todo o mundo sofrem com o excesso de sal. Este montante representa mais de 6% da área terrestre total do mundo. A maior parte destas áreas afetadas pelo sal tem surgido de causas naturais (MUNNS; TESTER, 2008). O excesso de sal presente provoca diversos efeitos deletérios no

rendimento da agricultura, principalmente em virtude da queda na taxa de crescimento, perfilhamento e ao atraso no desenvolvimento reprodutivo que pode chegar a meses (ROY *et al.*, 2014).

O solo é dito salino quando sua condutância elétrica (ECe, uma unidade de medida que mensura a quantidade de íons no solo) é maior do que 4 dS/m o que equivale a aproximadamente 40 mM de NaCl, ponto no qual a maioria das plantas apresenta uma significativa redução no rendimento (ROY; TESTER, 2013). A planta sofre o estresse salino em dois momentos distintos: I) Imediatamente após a planta entrar em contato com uma concentração salina desfavorável (seja em solo ou em uma solução hidropônica) ao aumento da pressão externa (provocada pelos íons), gerando um estresse osmótico (JAMES *et al.*, 2008); II) Posteriormente a acumulação de íon sódio ( $\text{Na}^+$ ) nas folhas irá gerar um efeito tóxico (fase iônica), levando à senescência da folha (MUNNS; TESTER, 2008). A maioria das espécies de plantas começa a mostrar sintomas 1 a 3 dias depois da aplicação de NaCl, a despeito do rápido influxo de NaCl (SHAVRUKOV, 2013). Desse modo as plantas ditas tolerantes não necessariamente suportam ambas as fases como foi esquematizado por Munns e Tester (2008) (Figura 9).

**Figura 9:** O gráfico em (A) compara a taxa de crescimento em uma planta sensível (linha contínua) com uma planta tolerante ao estresse osmótico (linha pontilhada). Ambas têm perda de fitness, mas a tolerante decaiu menos na fase osmótica e mostra igual sensibilidade a fase iônica. No gráfico (B) a planta sensível (linha contínua) é comparada com uma planta tolerante apenas ao estresse iônico (linha pontilhada vermelha), mostrando que ambas apresentam mesma queda na taxa de crescimento no início do estresse, mas que na fase tardia da salinidade a planta resistente mantém seu crescimento em quanto a sensível tem uma nova queda na taxa de crescimento. Em (C) nota-se que uma planta tolerante a ambas as fases mantém uma taxa de crescimento maior do que a sensível.



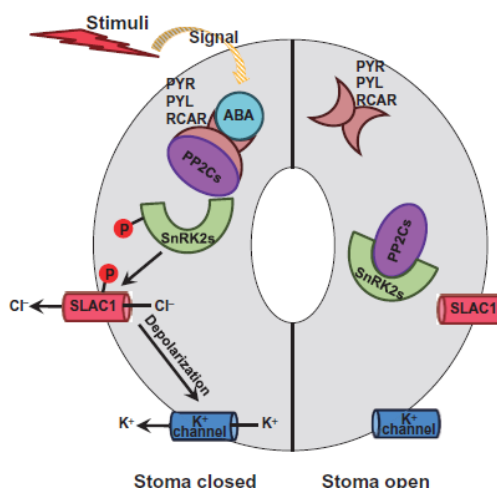
Fonte: MUNNS; TESTER, 2008.

A sobrevivência das plantas na natureza depende da capacidade de detectar e se aclimatar às mudanças ambientais através de uma rápida reprogramação transicional e hormonal (DONG – LEY YANG, 2012). Desse modo os genes e as vias

metabólicas ativadas para cada fase do estresse salino são diferentes (ROY *et al.*, 2014). No início do estresse salino essas respostas são dadas devido ao acúmulo do hormônio ácido abscísico (ABA). O ABA serve como sinal químico primário que induz o fechamento estomático controlando assim o status evitando a perda de água (LEE; LUAN, 2012).

O mecanismo de fechamento estomático tem sido alvo de vários estudos. Hoje acreditasse que a regulação de canais de potássio ( $K^+$ ) e cloreto ( $Cl^-$ ) nas células-guardas compõe uma das principais vias envolvidas nesse processo. O ABA se ligaria a um dos receptores da célula-guarda. *Pyrabactin resistance* (PYR/PYL) e componente regulatório do receptor de ABA (RCAR) são duas famílias de receptores importantes para a regulação do ABA. Essa ligação permite que a fosforilase PPC2 e a quinase SnRK2 quebrem sua interação física e passem a exercer a função de fosforilar e desfosforilar os canais de  $K^+$  e  $Cl^-$ . Desse modo o efluxo de  $K^+$  e  $Cl^-$  das células-guardas leva ao fechamento estomático (LEE; LUAN, 2012) (Figura 10).

**Figura 10:** O esquema abaixo representa uma célula-guarda em dois momentos distintos. Na direita, a célula não recebeu nenhum estímulo (se encontra em condições normais). Nesse momento os receptores para ABA PYR, PYL e RCAR não impedem a ligação dos PP2Cs com os SnRK2s. Nesse momento a célula-guarda permite que os estômatos estejam abertos. Mas, em condições adversas, um estímulo leva ao aumento na produção de ABA, desencadeando uma série de reações que termina com a saída de  $K^+$  e  $Cl^-$  da célula e fechando o estômato.



Fonte: LEE; LUAN, 2012.

No entanto, existem casos em que um bom controle estomático não é o suficiente para levar à resistência à salinidade. Lima Neto e colaboradores (2014) mostraram que o controle estomático de *Jatropha curcas* é melhor se comparado a *Ricinus communis*. No entanto, quando plantas jovens de *Jatropha curcas* foram expostas a estresse salino em hidroponia apresentam uma elevada acumulação de íons

$\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , queda na razão  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  e sinais de toxicidade na folha (SILVA *et al.*, 2011). Contraditoriamente, plantas jovens de *Ricinus* apresentam características de tolerância a elevada salinidade como a exclusão de  $\text{Na}^+$  das folhas (SUN *et al.*, 2013). Lima Neto e colaboradores (2014b) mostraram que plantas de *Jatropha curcas* e *Ricinus communis* apresentam diferenças também quanto aos mecanismos fotoprotectores para a dissipação de energia. Enquanto *R. communis* ativou o fluxo cíclico de elétrons, aumentou a assimilação de nitrato e apresentou maiores taxas de fotorrespiração, *J. curcas* ativou preferencialmente o NPQ.

## 4.2 Estresse Hídrico

A agricultura é a principal atividade que utiliza de água doce, consumindo mais de dois terços do total de consumo de água. Contraditoriamente, estima-se que até 2050 pelo um quinto da população mundial pode sofrer com uma severa escassez de água (CHAI *et al.*, 2016). Portanto, a maior limitação para crescimento e produtividade das plantas em solo das regiões áridas e semiáridas é a disponibilidade de água (WANG *et al.*, 2013). O estresse hídrico pode ocorrer em qualquer fase de crescimento e pode afetar essa produtividade em graus variáveis, dependendo do tempo de início, duração e intensidade do tratamento de estresse hídrico. Caso a seca ocorra na fase reprodutiva, pode diretamente acarretar uma perda média de rendimento de mais de 50% na produtividade (HU; XIONG, 2014). A deficiência de água causa múltiplos efeitos negativos e desencadeia respostas complexas em diferentes níveis (HU; XIONG, 2014). Durante o estresse de seca, o crescimento da raiz e a taxa de difusão de alguns nutrientes como o potássio no solo até a raiz são restritos, o que limita a captação de nutrientes (WANG *et al.*, 2013). Para transpor esse problema, algumas plantas acumulam solutos como a prolina e glicinabetaina (PÉREZ – PÉREZ *et al.*, 2009). Esses solutos podem diminuir o potencial osmótico das células permitindo que as raízes voltem a absorver água.

Entretanto, os principais efeitos diretos do estresse hídrico são associados com a diminuição do fornecimento de  $\text{CO}_2$  por meio de carboxilação causada pela limitação dos estômatos (ZIVCAK *et al.*, 2014). Nessas regiões a deficiência hídrica geralmente ocorre simultaneamente a altas temperaturas induzindo o acúmulo de ABA e promovendo o fechamento estomático, o que reduz a disponibilidade de  $\text{CO}_2$  e leva à queda da razão  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  no cloroplasto (FOYER; NOCTOR, 2000). Consequentemente,



as taxas de consumo de poder redutor (ATP e NADPH) decrescem nessas condições e a produção de ROS é induzida devido ao excesso de energia, pois os elétrons que seriam doados ao  $\text{NADP}^+$  são doados para o oxigênio molecular (FOYER, 2012).

O excesso de energia aumenta a produção de oxigênio sínglete (PSII) e superóxido (PSI). O superóxido é rapidamente convertido a peróxido de oxigênio pela SOD e este pode ser convertido a radical superóxido reação de Fenton (ASGHAR *et al.*, 2015). As ROS podem causar danos a diversos componentes celulares incluindo o DNA, proteínas e membranas lipídicas (MITTLER, 2002). Diversos mecanismos e estratégias foram descritos como estratégias vegetais para sobreviver a tais adversidades. A indução do NPQ, assimilação de nitrogênio e fotorrespiração são mecanismos fotoprotetores que pode evitar a formação ROS pelo consumo do excesso de energia. Entretanto, como a produção de ROS é abundante mesmo em condições ótimas, mais de 99% dos ROS produzidos dentro das células são metabolizados pelos antioxidantes (FOYER *et al.*, 2015, SHARMA *et al.*, 2013).

As plantas de *Jatropha curcas* em deficiência hídrica mostram a ativação de muitos dos mecanismos citados acima. Silva e colaboradores (2015) mostraram que por volta de 10 dias as plantas sob estresse hídrico aumentam significativamente o NPQ, o que coincidiu com um pico na velocidade máxima de carboxilação da Rubisco assim como uma queda na taxa máxima de transporte de elétrons da fotossíntese. O NPQ permitiu o dreno de energia em excesso mensurado pelo parâmetro ( $\text{ETR}_S/\text{P}_N$ ) (SILVA *et al.*, 2010). Entretanto as enzimas relacionadas à remoção de ROS não apresentaram uma resposta homogênea. SOD não mudou sua atividade, a catalase decresceu e a APX foi induzida, mas nem o conteúdo nem o estado redox de ascorbato foram alterados (SILVA *et al.*, 2010).

A *Ricinus communis* tem sido reconhecida por exibir uma alta plasticidade fisiológica e de desenvolvimento ao estresse hídrico (SHI *et al.*, 2014). Os autores mostram que as plantas dessa espécie quando em deficiência hídrica apresentam um aumento na massa foliar por área, conteúdo de clorofila e o Fv/Fm. A fotossíntese foi inibida, entretanto rapidamente se recupera após ser reirrigada (SHI *et al.*, 2014). Todavia, Lima – Neto e colaboradores (2014) discutem que *J. curcas* aparenta ser mais adaptada a seca e ao calor, uma vez que essa espécie apresenta um controle estomático mais eficiente para evitar o desperdício de água e por dissipar mais energia pelo NPQ.

Entretanto, *Ricinus communis* apresenta uma maior taxa de fotossíntese em condições não-limitantes.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALLBED, A.; KUMAR, L. (2013). Soil Salinity Mapping and Monitoring in Arid and Semi-Arid Regions Using Remote Sensing Technology : **A Review**, 2013 (December), 373–385.
- AMUNTS, A; TOPORIK, H; BOROVIKOVA, A; NELSON, N. Structure determination and improved model of plant photosystem I. **J. Biol. Chem.** 285:3478–86, 2010.
- ARNON, D. I. The chloroplast as a complete photosynthetic unit. **Science** 122:9-16, 1955.
- ARO, E-A.; VIRGIN, I.; ANDERSON, B. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation , protein damage and turnover. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics** 1143, 113–134, 1993.
- ASGHAR, A.; AZIZ, A.; RAMAN, A.; MOHD, W.; WAN, A. Advanced oxidation processes for in-situ production of hydrogen peroxide / hydroxyl radical for textile wastewater treatment : a review. **Journal of Cleaner Production**, 87, 826–838, 2015.
- BAKER, N. R.. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, 59, 89–113, 2008.
- BJORN, L. O; GOVINDJEE. The evolution of photosynthesis and Its environmental impact. **Photobiology: The Science of Light and Life**, 207-230, 2015.
- BONIFÁCIO, A.; MARTINS, M. O.; RIBEIRO, C. W.; FONTENELE, A. V.; CARVALHO, F. E. L.; MARGIS – PINHEIRO , M.; SILVEIRA, J. A. G. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. **Plant, Cell & Environment**, 34, 1705–1722, 2011.
- BROSCHÉ, M.; OVERMYER, K.; WRZACZECK, M. L.; KANGASJÄRVI, J. Stress Signaling III: Reactive Oxygen Species (ROS) in: Pareek, A.; Sopory, S.K.; Bohnert, H. J.; Govindjee **Abiotic Stress Adaptation in Plants** Springer 91-103, 2010.
- CAO, S.; ZHANG X.; XU, D.; FAN, X.; MOU, S.; WANG, Y.; WANG, W. A transthylakoid proton gradient and inhibitors induce a non-photochemical fluorescence quenching in unicellular algae *Nannochloropsis* sp. **FEBS Letters**, 587(9), 1310–1315, 2013.
- CHAI, Q.; GAN, Y.; ZHAO, C.; XU, H.; WASKOM, R. M.; NIU, Y.; SIDDIQUE, K. H. M.. Regulated deficit irrigation for crop production under drought stress .A review. **Agronomy for Sustainable Development**, 36:3, March 2016.
- COX, N.; RETEGAN, M.; NEESE, F.; PANTAZIS, D.A.; BOUSSAE, A.; LUBITZ, W. Electronic structure of the oxygen-evolving complex in photosystem II prior to O-O bond formation. **Science** VOL 345, 804-808, 2014.

DEBUS, R. J. FTIR studies of metal ligands, networks of hydrogen bonds, and water molecules near the active site Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> cluster in Photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta** 1847, 19–34, 2015.

FISCHER, W.; HEMP, J.; JOHNSON, J. E. Evolution of Oxygenic Photosynthesis. **Earth and Planetary Sciences**, 44, 2016.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologist**, 146:359–88, 2000.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G.; HODGES, M. Respiration and nitrogen assimilation: targeting mitochondria-associated metabolism as a means to enhance nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, 62, 1467–1482, 2011.

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding Oxidative Stress and Antioxidative Function to Enhances Photosynthesis. **Plant Physiology**, Vol. 155, pp. 93–100, 2011.

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**, 63(4), 1637–1661, 2012.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Stress-triggered redox signalling: What's in pROSpecT?. **Plant, Cell & Environment**, 39(5):951-64, May 2015.

FRYER, M. J.; OXBOROUGH, K.; MULLINEAUX, P. M.; BAKER, N. R. Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 53, 1249-1254, 2002.

GARC, S.; BORONAT, S.; HIDALGO, E. Reversible Cysteine Oxidation in Hydrogen Peroxide Sensing and Signal Transduction. **Biochemistry**, 53, 2560–2580, 2014.

GAO, S.; NIU, J.; CHEN, W.; WANG, G.; XIE, X.; PAN, G.; ZHU, D. The physiological links of the increased photosystem II activity in moderately desiccated *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) to the cyclic electron flow during desiccation and re-hydration. **Photosynthesis Research**, 116 (1), 45–54, 2013.

GEST, N.; GAUTIER, H.; STEVENS, R. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a methylation and chrom. **Journal of Experimental Botany**, 64(1), 33–53, 2013.

GILES, J. N. Cyclic electron transport in C<sub>3</sub> plants: fact or artefact? **Journal of Experimental Botany**, 56(411), 407–416, 2005.

GODAUX, D.; BAILLEUL, B.; BERNE, N.; CARDOL, P. Induction of Photosynthetic Carbon Fixation in Anoxia Relies on Hydrogenase Activity and Proton-Gradient Regulation-Like1-Mediated Cyclic Electron Flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology**, 168(2), 648–658, 2015.

GOVINDJEE. Chlorophyll a Fluorescence: A bit of basics an History In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (Eds.), **Chlorophyll a Fluorescence A Signature of Photosynthesis**, Springer 2004, pp. 1-42

GRELLET; BOURNONVILLE, C. F.; DIAZ – RICCI, J. C. Quantitative determination of superoxide in plant leaves using a modified NBT staining method. **Phytochemical Analysis**, 22(3), 268–271, 2011.

GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants : Physiological , Biochemical , and Molecular Characterization. **International Journal of Genomics**, Volume 2014 (2014), Article ID 701596.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; TRAN, L. S. P. Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. **Molecular Plant**, Volume 8, Issue 9, p1304–1320, 7 September 2015.

HAGER A.; PERZ, H. Veränderung der Lichtabsorption eines Carotinoids in Enzym (De-epoxidase)-Substrat (Violaxanthin)-Komplex. **Planta** 93:314–322, 1970.

HAGER, A.; HOLOCHER, K.; Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. **Planta**, 192:581–589, 1994.

HANKAMER, B.; NIELD, J.; ZHELEVA, D.; BOEKEMA, E.; JANSSON, S.; BARBER, J. Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II in vivo. **Eur J Biochem** 243:422–429, 1997.

HU, H.; XIONG, L. Genetic Engineering and Breeding of Drought-Resistant Crops. **Annual Review of Plant Biology**, Vol. 65: 715-741, 2014.

IFUKU, K.; NOGUCHI, T.; BRICKER, T. M.; NOWACZYK, M. M. Structural Coupling of Extrinsic Proteins with the Oxygen-Evolving Center in Photosystem II. **Frontiers in Plant Science**, 7, 1–11, 2016.

JAMES, R. A.; CAEMMERER, S.; CONDON, A. G.; ZWART A. B.; MUNNS, R. Genetic variation in tolerance to the osmotic stress component of salinity stress in durum wheat. **Functional Plant Biology** 35, 111–123, 2008.

JANSSON, S. A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. **Trends Plants Sci**, 4: 236-240, 1999.

JENSEN, P. E.; LEISTER, D. Chloroplast evolution , structure and functions Chloroplast evolution , structure and functions. **F1000 Prime Reports**, 2014.

KAUTSKY, H.; HIRSCH, A. Neue Versuche zur Kohlenstoffassimilation. **Naturwissenschaften** 19:964, 1931.

KOCSY, G. Die or survive? - redox changes as seed viability markers. **Plant, Cell & Environment**, 38, 1008–1010, 2015.

KRAUSE, G. H.; WEIS E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis—the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 42, 313–349, 1991.

KRYNICKÁ, V.; SHAO, S.; NIXON, P. J.; KOMENDA, J. Accessibility controls selective degradation of photosystem II subunits by FtsH protease. **Nature Plants**, 1–6, November 2015.

KLUGHAMMER, C.; SCHREIBER U. An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700+-absorbance changes at 830 nm. **Planta**, 192(2), 1994.

LEE, S. C.; LUAN, S. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. **Plant, Cell & Environment**, 1, 53–60, 2012.

LEFEBVRE-LEGENDRE, L.; CHOQUET, Y.; KURAS, R.; LOUBÉRY, S.; DOUCHI, D.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M.; FRANCE, Y. C. A Nucleus-Encoded Chloroplast Protein Regulated by Iron Availability Governs Expression of the Photosystem I Subunit PsaA in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology**, 1, 167, 1527–1540, April 2015.

LEI, Y.; ZHENG K.; DAI, Y. Different responses of photosystem I and photosystem II in three tropical oilseed crops exposed to chilling stress and subsequent recovery, **Trees**, 28:923–933, 2014.

LEVI, F.; MOSTARDA, S.; RAO, F.; MINTERT, F. Quantum mechanics of excitation transport in photosynthetic complexes: a key issues review. **Reports on Progress in Physics**, 78 1-30, 2015.

LI, X. P.; BJÖRKMAN, O.; SHIH, C.; GROSSMAN, A. R.; ROSENQUIST, M.; JANSSON, S.; NIYOGI, K. K.; A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. **Nature**, 403: 391–395, 2000.

LIGUORI, N.; PERIOLE, X.; MARRINK, S. J.; CROCE, R. From light-harvesting to photoprotection: structural basis of the dynamic switch of the major antenna complex of plants (LHCII), **Nature Scientific Reports**, 2015.

LIMA NETO, M. C.; MARTINS, M. O.; FERREIRA – SILVA, S. L.; SILVEIRA, J. A. G. *Jatropha curcas* and *Ricinus communis* display contrasting photosynthetic mechanisms in response to environmental conditions. **260 Scientia Agricola**, 72, 260–269, 2014a.

LIMA NETO, M. C.; LOBO, A. K. M.; MARTINS, M. O.; FONTENELE, A. V.; SILVEIRA, J. A. G. Dissipation of excess photosynthetic energy contributes to salinity tolerance: A comparative study of salt-tolerant *Ricinus communis* and salt-sensitive *Jatropha curcas*. **Journal of Plant Physiology**, 171(1), 23–30, 2014b

LONG, S. P.; MARSHALL – COLON, A.; ZHU, X. G. Meeting the global food demand of future by engineering crop photosynthesis and yield potencial. **Cell**, 161 56-66, 2015.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci**, 9:405–10, 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.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, 59 (1), 651–681, 2008.

MURATA, N.; TAKAHASHI, S.; NISHIYAMA, Y.; ALLAKHERDIEV, S. I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1767 414-421, 2007.

MURCHIE, E. H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, 64, 3983–3998, 2013.

NELSON, N. Evolution of photosystem I and the control of global enthalpy in an oxidizing world. **Photosynthesis Res**, 116 145-151, 2013.

NELSON, N.; JUNGE, W. Structure and energy transfer in photosystems of oxygenic photosynthesis, **Annual Review of Biochemistry**, Vol. 84: 659-683, June 2015.

NICKELSEN, J.; RENGSTL, B. Photosystem II Assembly: From Cyanobacteria to Plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 64:609–35, 2013.

NIELD, J., BARBER, J. Refinement of the structural model for the Photosystem II supercomplex of higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, 1757(5-6), 353–361, 2006.

NISHIKAWA, Y.; YAMAMOTO, H.; OKEGAWA, Y.; WADA, S.; SATO, N.; TAIRA, Y.; SUGIMOTO, K.; MAKINO, A.; SHIKANA, T. PGR5-dependent cyclic electron transport around PSI contributes to the redox homeostasis in chloroplasts rather than CO<sub>2</sub> fixation and biomass production in rice. **Plant Cell Physiology**, 53, 2117–2126, 2012.

NISHIYAMA, Y.; ALLAKHYERDIEV, S. I.; YAMAMOTO, H.; HAYASHI, H. Singlet Oxygen Inhibits the Repair of Photosystem II by Suppressing the Translation Elongation of the D1 Protein in *Synechocystis* sp . **Biochemistry**, 6803 †, 11321–11330, 2004.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Homeostasis of adenylate status during photosynthesis in a fluctuating environment. **Journal of Experimental Botany**, 51, 347–356, 2000.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C. H. Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. **Plant, Cell & Environment**, 1140–1160, 2016.

PAGLIANO, C.; SARACCO, G.; BARBER, J. Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II. **Photosynthesis Research**, 116:167–188, 2013.

PAPAGEORGIU, G. C.; GOVINDJEE. The Non-Photochemical Quenching of the Electronically Excited State of Chlorophyll a in Plants: Definitions, Timelines, Viewpoints, Open Questions In: Barbara Demmig-Adams, Gyözö Garab, William Adams III, Govindjee Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria, **Springer**, pp 1-44, 2014.

PASSAIA, G.; FONINI, L. S.; CAVERZAN, A.; JARDIM-MESSEDER, D.; CHRISTOFF, A. P.; GAETA, M. L.; ARAUJO-MARIATH, J. E.; MARGIS, R.; MARGIS – PINHEIRO, M. The mitochondrial glutathione peroxidase GPX3 is essential for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> homeostasis and root and shoot development in rice. **Plant Science**, 208, 93–101, 2013.

PÉREZ - PÉREZ, J. G.; ROBLES, J. M.; TOVAR, J. C.; BOTÍA, P. Response to drought and salt stress of lemon ‘Fino 49’ under field conditions: water relations, osmotic adjustment and gas exchange. **Sci. Hortic.** 122, 83–90, 2009.

PHUTHONG, W.; HUANG, Z.; WITTKOPP, T. M.; SZNEE, K.; HEINNICKEL, M. L.; DEKKER, J. P.; FRESE, R. N.; PRINZ, F. B.; GROSSMAN, A. R. The Use of Contact Mode Atomic Force Microscopy in Aqueous Medium for Structural Analysis of Spinach Photosynthetic Complexes. **Plant Physiology**, 69(2):1318-32, 2015.

PNUELI, L.; LIANG, H.; ROZENBERG, M.; MITTLER, R. Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient Arabidopsis plants. **The Plant Journal**, 34, 187–203, 2003.

ROY, S. J.; TESTER, M. Increasing Salinity Tolerance of Crops. **Sustainable Food Production**, pp 986-1002, 2013.

ROY, S. J.; NEGRÃO, S.; TESTER, M. Salt resistant crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, 26, 115–124, 2014.

RUBAN, A. V.; LEE, P. J.; WENTWORTH, M.; YOUNG, A. J.; HORTON, P. Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes. **Journal of Biological Chemistry**, 274: 10458–10465, 1999.

RUBAN, A. V. Evolution under sun: optimizing light harvesting in photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, 2014.

SAGI, M.; FLUHR, R. Production of Reactive Oxygen Species by Plant NADPH – Oxidases. **Plant Physiology**, 141, 336–340, June 2006.

SAPOZHNIKOV, D. I.; KRASNOVSKAYA, T. A.; MAEVSKAYA, A. N. Change in the interrelationship of the basic carotenoids of the plastids of green leaves under the action of light. **Dokl Acad Nauk USSR** 113: 465–467, 1957.



SATOH, K. Protein-pigments and the photosystem II reaction center: a glimpse into the history of research and reminiscences. **Photosynthesis Research**, 98, 33–42, 2008.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, 2012. 1-26, 2012.

SHAVRUKOV, Y. Salt stress or oceanic salt shock: which genes are we studying? In *Posidonia cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning*, 64(1), 119–127, 2013.

SHARWOOD, R. E.; GHANNOUM, O.; WHITNEY, S. M. Prospects for improving CO<sub>2</sub> fixation in C<sub>3</sub>-crops through understanding C<sub>4</sub>-Rubisco biogenesis and catalytic diversity. **Current Opinion in Plant Biology**, 31: 135–142, 2016.

SHEN, J. The Structure of Photosystem II and the Mechanism of Water Oxidation in Photosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, 66:23–48, 2015.

SHI, G.; ZHU – GE, F.; LIU, Z.; LE, L. Photosynthetic responses and acclimation of two castor bean cultivars to repeated drying – wetting cycles. **Journal of Plant Interactions**, Vol 9, No 1, 783-90, 2014.

SEJIMA, T.; TAKAGI, D.; FUKAYAMA, H.; MAKINO, A.; MIYAKE, C. Repetitive Short-Pulse Light Inactive Photosystem I in Sunflowers Leaves. **Plant Cell Physiology**, 55 1184-1193, 2014.

SILVA, E.N.; FERREIRA – SILVA, S. L.; VASCONCELOS, A. D.; VASCONCELOS, R.; ALMEIDA, R.; 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**, 167(14), 1157–1164, 2010.

Silva, E. N.; RIBEIRO, R. V.; FERREIRA – SILVA, S. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Salt stress induced damages on the photosynthesis of physic nut young plants. **Scientia Agricola**, 62–68, 2011.

SILVA, E. N.; SILVEIRA, J. A. G.; RIBEIRO, R. V.; VIEIRA, S. A. Photoprotective function of energy dissipation by thermal processes and photorespiratory mechanisms in *Jatropha curcas* plants during different intensities of drought and after recovery. **Environmental and Experimental Botany**, pp 36 -45 2015.

SONOIKE, K.; KAMO, M.; HIHARA Y.; HIYAMA, T.; ENAMI I. The mechanism of the degradation of PsaB gene product, one of the photosynthetic reaction centre subunits of photosystem I, upon photoinhibition. **Photosynthesis Research**, 53:55–63, 1997.

Sonoike, K. Photoinhibition of photosystem I **Physiologia Plantarum** 142, 56–64, 2011.

SPETEA, C.; RINTAMA, E. (2014). Changing the light environment: chloroplast signalling and response mechanisms Preface, (figure 1), 2014–2016.

SUN Y.; NIU, G.; OSUNA P.; GANJEGUNTE, G.; AULD, D.; ZHAO L. Seedling emergence, growth, and leaf mineral nutrition of *Ricinus communis* L. cultivars irrigated with saline solution. **Ind Crops Prod.**; 49:75–80, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, Artmed.

TAKAGI, D.; TAKUMI, S.; HASHIGUCHI, M.; SEJIMA, T.; MIYAKE, C. Superoxide and singlet oxygen produced within the thylakoid membranes both cause photosystem I photoinhibition. **Plant Physiology**, 1626-34, 2016.

TAKAHASHI, H.; VALLON, O.; RAPPAPORT, F.; CLOWEZ, S. Cyclic electron flow is redox-controlled but independent of state transition. **Nature communications** 4:1954-1962, 2013.

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**, 149(3), 1560–1567, 2009.

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

TIKKANEN, M.; ARO, E. M. Thylakoid protein phosphorylation in dynamic regulation of photosystem II in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1817: 232–238, 2012.

TIKKANEN, M.; MEKALA, N. R.; ARO, E. M. Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. **Biochimica et Biophysica Acta** 1837, 210-215, 2014.

United States Census Bureau. International Data Base—Total Midyear Population for the World: 1950–2050. Available online: <http://www.census.gov/population/international/data/idb/worldpoptotal.php> , 2012.

VOLOSHIN, R. A.; KRESLAVSKI, V. D.; ZHARMUKHAMEDOV, S. K.; BEDBENOV, V. S.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photoelectrochemical cells based on photosynthetic systems : a review. **Biofuel Research Journal**, 6, 227–235, 2015.

VREDENBERG, W. J. System Analysis and Photoelectrochemical Control of Chlorophyll fluorescence in Terms of Trapping Models of Photosystem II: A Challenging View In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (Eds.), **Chlorophyll a Fluorescence A Signature of Photosynthesis**, Springer 2004, pp. 133-172.

WANG, M.; ZHENG, Q.; SHEN, Q.; GUO, S. The Critical Role of Potassium in Plant Stress Response. **International Journal of Molecular Sciences**, 7370–7390, 2013.

WANG, W.; HE, E.; GUO Y.; TONG, Q.; ZHENG, H. Chloroplast calcium and ROS signaling networks potentially facilitate the primed state for stomatal closure under multiple stresses. **Environmental and Experimental Botany**, 122, 85–93, 2016.

WEIS, E. Short Term Acclimation of Spinach to High Temperatures. **Plant Physiology**, 74(2), 402–407, 1984.

WIJNTJES, E.; OOSTERGETEL, G. T.; JANSSON, S.; BOEKEMA, E. J.; CROCE, R. The Role of Lhca Complexes in the Supramolecular Organization of Higher Plant Photosystem I \*. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 284, pp. 7803–7810, 2009.

WILHELM, C.; SELMAR, D. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. **Journal of Plant Physiology**, 168(2), 79–87, 2011.

YAMORI, W.; SHIKANAI, T. Physiological Functions of Cyclic Electron Transport Around Photosystem I in Sustaining Photosynthesis and Plant Growth. **Annual Review of Plant Biology**, 81-106, 2016.

YAMORI, W.; SAKATA, N.; SUZUKI, Y.; SHIKANAI, T.; MAKINO, A. Cyclic electron flow around photosystem I via chloroplast NAD(P)H dehydrogenase (NDH) complex performs a significant physiological role during photosynthesis and plant growth at low temperature. **The Plant Journal**, 68:966–71, 2011.

ZIVCAK, M.; KALAJI, H. M.; SHAO, H.-B.; OLSOVSKA, K.; BRESTIC, M. Photosynthetic proton and electron transport in wheat leaves under prolonged moderate drought stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B, Biology**, 137, 107–115. 2014.

ZIVCAK, M.; BRESTIC, M.; KUNDERLIKOVA, K.; SYTAR, O.; Oksana, & ALLAKHVERDIEV, I. Repetitive light pulse-induced photoinhibition of photosystem I severely affects CO<sub>2</sub> assimilation and photoprotection in wheat leaves. **Photosynthesis Research**, 449-63, 2015.

ZULFUGAROV, I. S.; TOVUU, A.; EU, Y.-J.; DOGSOM, B.; POUDYAL, R.; NATH, K.; LEE C.-H. Production of superoxide from Photosystem II in a rice (*Oryza sativa* L.) mutant lacking PsbS. **BMC Plant Biology**, 14(1), 242-257, 2014.

**Capitulo II – Modulação do PSI induzida por  
NaCl favorece fotoproteção de *Ricinus communis*  
mas não de *Jatropha curcas***

## Resumo

O estresse salino é um dos mais importantes estresses capazes de retardar o crescimento e desenvolvimento vegetal. Seu efeito está relacionado ao decréscimo de assimilação de CO<sub>2</sub> pelo fechamento estomático e à produção de ROS. As ROS podem promover a chamada fotoinibição, o que pode levar a planta à morte. Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram vários mecanismos para evitar os efeitos negativos da salinidade. No entanto, a maioria dos estudos se concentra na fotoinibição do PSII. Poucos trabalhos tem mostrado o significado fisiológico da fotoinibição do PSI. Este trabalho teve como objetivo elucidar os efeitos da fotoinibição do PSI em plantas tolerantes as condições do semi-árido *Jatropha curcas* e *Ricinus communis*. Plantas de ambas as espécies com o mesmo estágio de desenvolvimento foram expostas ao estresse salino por 15 dias. Parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, absorvância do P700 e produção de peróxido de hidrogênio foram avaliados. Nesse estudo, plantas de *Jatropha curcas* mostraram um aumento na indução do CEF mas um decréscimo na oxidação do P700. A *Ricinus communis* apresentou uma resposta oposta, aumentando no *pool* de P700 oxidado e um decréscimo no CEF. Para confirmar esse achado o CEF foi mensurado por várias metodologias diferentes que confirmaram a tendência encontrada. Diante desse resultado, as plantas de *Ricinus communis* controle e em estresse salino foram fotoinibidas utilizando a metodologia de rSP. De fato, as plantas adaptadas ao estresse salino foram mais tolerantes a fotoinibição do PSI, mas a síntese de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi significativamente induzida. Esses resultados sugerem que a inibição do CEF promove a oxidação P700 em *Ricinus communis* e que a oxidação do P700 é um mecanismo fotoprotetor importante para a proteção do PSI.

**Palavras-chave: Mamona, Pinhão-manso, CEF, P700**

## **The regulation of photosystem I redox state is an important photoprotective mechanism to excess energy in *Jatropha curcas* and *Ricinus communis* exposed to salinity**

João Victor A. Cerqueira<sup>1</sup>, Fabrício Eulálio L. Carvalho<sup>1</sup>, Juliana R. Cunha<sup>1</sup>, Joaquim Albenísio G. Silveira<sup>1</sup>, Milton C. Lima Neto<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Metabolismo de Plantas. Campus do Pici; CEP 60440-970. Fortaleza, CE, Brasil. [joaovictorufc@gmail.com](mailto:joaovictorufc@gmail.com); [silveira@ufc.br](mailto:silveira@ufc.br)

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista -UNESP, Instituto de Biociências do Litoral. Praça Infante Dom Henrique, s/n – Parque Bitaru, São Vicente - SP, Brasil. CEP - 11330-900. [miltonlimaneto@clp.unesp.br](mailto:miltonlimaneto@clp.unesp.br)

\*Corresponding author

### **Abstract**

Salt stress is one of the major stressors that can slow down plant growth and development. Its effect is related to the decrease of CO<sub>2</sub> assimilation by stomatal closure and to the production of ROS. ROS can promote so-called photoinhibition which may lead to plant death. During evolution, plants have developed several mechanisms to prevent the negative effects of salinity. However, most studies have focused on photoinhibition of PSII. Few studies have shown the physiological significance of PSI photoinhibition. This study aimed to elucidate the effects of PSI photoinhibition in plants adapted to semi-arid conditions *Jatropha curcas* and *Ricinus communis*. Plants of both species at the same stage of development were exposed to salt stress for 15 days. Gas exchange parameters, chlorophyll a fluorescence, absorbance of P700 and production of hydrogen peroxide were evaluated. In this study, plants of *Jatropha curcas* showed an increase in the induction of CEF but a decrease in the oxidation of P700. The *Ricinus communis* displayed an opposite response, increasing the pool of oxidized P700 and a decrease in the CEF. To confirm this finding the CEF was measured by several different methodologies that confirmed the pattern found. Given this result, *Ricinus communis* control and stressed plants were photoinhibited using rSP methodology. In fact, plants adapted to salt stress were more tolerant to photoinhibition of PSI, but H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis was significantly induced. These results suggest that inhibition of P700 CEF promotes oxidation of PSI in *Ricinus communis* and the oxidation of P700 is an important mechanism for PSI sunscreen protection.

**Keywords:** chlorophyll fluorescence, cyclic electron flow, high potential chain, P700<sup>+</sup>, photochemistry, photoinhibition, photosynthesis

## Introduction

Salt stress is one of the most important abiotic stress negatively affecting plant growth, development and diversity. Salinity mostly affects plants through its effects on photosynthesis, decreasing the CO<sub>2</sub> supply for carboxylation by stomatal and mesophyll limitations, which is induced primarily by osmotic effects of salt excess in roots (Deinlein et al., 2014). In addition, salt stress is commonly associated with decreases in the efficiency of energy uses due to metabolic limitations in photosynthesis (Duarte et al., 2013) and increases in photorespiration (Kangasjärvi et al., 2012). Consequently, salinity affects the fine balance between light absorption and photochemistry and the use of reductive equivalents by the Calvin-Benson cycle reactions (Deinlein et al., 2014) impairing photosynthesis by stomatal and metabolic limitations (Sudhir and Murthy, 2004).

Plants presenting impairments in the CO<sub>2</sub> assimilation capacity will commonly present an unbalance due to the excessive light absorbed, since the Calvin-cycle reactions are the most important sink for the reducer equivalents produced by the photochemical reactions in the thylakoids membranes (Chaves et al., 2009). This harmful condition commonly generates high levels of reduced equivalents in chloroplasts, which can lead to an overproduction of oxygen reactive species (ROS) (Goh et al., 2011). ROS in excess commonly affect photosynthesis causing photoinhibition in both PSII and PSI (Miyata et al., 2016; Sejima et al., 2014). In general, under excess light or low CO<sub>2</sub> assimilation, PSII is photoinhibited by impairment in the PSII repair system (Tikkanen et al., 2014; Miyata et al., 2016). Under such conditions, charge recombination reactions in the inhibited PSII could lead to a triplet state of P680 which can produce oxygen singlet (Tikkanen and Aro, 2014). In addition, O<sub>2</sub> can be photoreduced to superoxide in PSI via Mehler reactions (Asada, 1999). Superoxide deprotonates to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> which is catalyzed by superoxide dismutase (SOD) and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is rapidly scavenged by ascorbate peroxidase (APX) (Makino et al., 2002).

The excess of ROS inactivate the elongation factor G for D1 proteins, inhibiting D1 synthesis with loss of PSII activity (Nishiyama et al., 2011). Furthermore, superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> react with the electron transfer components in PSI, the Fe-S cluster, producing hydroxyl radical. The hydroxyl radical reacts with amino groups of

PSI proteins, primarily PsaA and PsaB, leading to inactivation of PSI (Tikkanen et al., 2014). Thus, P700 in the reduced form donates electrons to O<sub>2</sub>, producing ROS. The ROS in excess would degrade PSI, and suppress net CO<sub>2</sub> assimilation (Sejima et al., 2014). Furthermore, the suppression of the photochemical yield in PSII might also be caused by the accumulation of reduced plastoquinone (PQ) by the PSI photoinhibition (Sejima et al., 2014).

Plants have evolved diverse photoprotective mechanisms to avoid such harmful conditions of excess light (Derks et al., 2015). The photosynthetic machinery is flexible, utilizing several mechanisms to prevent the harmful effects of highly reactive intermediates during the conversion of light into usable forms of energy (Zivcak et al., 2013). Both linear and cyclic electron flow (CEF) induces a  $\Delta$ pH across thylakoids membranes, which results in the oxidation of P700. The acidification of the luminal side decreases the oxidation activity of plastoquinol by the Cyt b<sub>6</sub>f complex (Tikkanen et al., 2015) inducing NPQ in PSII (Ruban, 2016). Under such conditions, the electron flux in PSII is down-regulated and the photooxidation rate of P700 exceeds the reduction rate of P700 (Makino et al., 2002). Thus, PSI photoinhibition itself decreases the photoreduction of O<sub>2</sub> to superoxide decreasing the harmful effects of the excess ROS produced in chloroplasts (Sejima et al., 2014; Zivcak et al., 2015).

Few performed have been done showing the physiological significance of PSI photoinhibition to plant acclimation to abiotic stresses (Zivcak et al., 2015b). In addition, the contribution of PSI redox regulation to the protection of the photosynthetic machinery from ROS is an important question to answer in order to elucidate the physiological significance of PSI photoinhibition (Sonoike, 2011; Sejima et al., 2014; Zivcak et al., 2015). The aim of this study was to assess the effects of PSI photoinhibition on photosynthesis *in vivo* in *Jatropha curcas* and *Ricinus communis* plants. These species are well adapted to semiarid regions and are potential crops for biofuel production (Lima Neto et al., 2014). It is the first time, according to our knowledge, that non-model plants were used to achieve the physiological importance of PSI regulation to salt acclimation. We hypothesized that maintaining PSI in an oxidized form, by the regulation of linear and electron flow, is an important photoprotector mechanisms avoiding ROS excess damage in *J. curcas* and *R. communis* plants.



## Material and Methods

### Plant material and growth conditions

Seeds of *Jatropha curcas* (L.) cv. FT2 provided by Fazenda Tamanduá (Brazil) and of *Ricinus communis* (L.) cv. BRS 149 nordestina provided by EMBRAPA (Brazil) were previously selected by size and weight and germinated in washed sand. Fifteen days after germination, the seedlings were transferred to plastic pots (6 L) with vermiculite and sand (1:1) as substrate. Plants were grown in a greenhouse located in a semiarid region (3°44'38''S and 38°34'11''W, 31 m altitude). The environmental conditions during the experimental period were: average air temperature of 29/24 °C (maximum/minimum); average air relative humidity of 62%, maximum photosynthetic photon flux density (PPFD) of 1800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 12 h photoperiod. Plants were watered every day with distilled water, until drainage, and every three days with 300 mL of a half-strength nutrient solution (Hoagland and Arnon, 1950) at pH 6.0. For the salinity treatment, the nutrient solution was supplied with 100 mM NaCl, and the plants were subjected to this condition for 15 days, a period when stressed plants showed significant decreases in the effective quantum yield of PSII described below. Both species were at the same relative development stage with three fully expanded leaves. Plants cultivated in nutrient solution without NaCl were used as control. Throughout the experimental period, the leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence were measured daily between 9:00 and 10:00 h. On the fifty day of salt, full-expanded leaves were harvested, immersed in liquid N<sub>2</sub> and stored at -80 °C until biochemical determinations.

### Relative water content, water status, electrolyte leakage, leaf dry matter and pigment, K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> contents

The leaf fresh matter (FM) of each plant was measured just after harvesting. The leaf relative water content (RWC) was calculated from fresh, turgid and dry weight of leaf discs, as previously described (Neto et al., 2014). Dry matter (DM) is the dry weight determined after 48 h in an oven at 75 °C and the turgid weight was measured after 6 h of saturation in deionized water at 4 °C in dark condition. The leaf pre-dawn water potential ( $\Psi_w$ ) was evaluated immediately after sampling using the pressure chamber (3000 Scholander PWSC, ICT international, Armidale, AUS) method (Scholander, 1960). Measurements of  $\Psi_w$  in *J. curcas* were taken carefully to avoid any

problem induced by the possible petiole latex (Maes et al., 2009). The electrolyte leakage was assessed as described (Lima Neto et al., 2015) and the leaf concentrations of chlorophyll *a*, *b* and total, and carotenoids (Lichtenthaler and Welburn, 1983). The content of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> was determined by flame photometry as described elsewhere (Lima Neto et al., 2015).

### **Leaf gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence and P700 redox state measurements**

For the assessment of gas exchange and photochemical parameters, plants were transferred to a growth chamber, with controlled conditions of 29 °C, RH 70% and PPFD of 700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . After one hour of plant acclimation to these conditions, the measurements were performed in the third full-expanded leaf. Gas exchange was measured in function of increasing the PPFD and air CO<sub>2</sub> partial pressure and fitted according to the models proposed by Lieth and Reynolds, (1987) and Sharkey et al, (2007), respectively. P<sub>N</sub>/PPFD and P<sub>N</sub>/CO<sub>2</sub> curves were measured with a portable infrared gas analyzer system, equipped with a LED source (IRGA LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, USA). During the measurements, the conditions inside the IRGA chamber were set to PPFD of 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , air CO<sub>2</sub> partial pressure of 38 Pa, air vapor pressure deficit of  $1.2 \pm 0.5$  kPa and air temperature of 28 °C. The amount of blue light was set to 10% of the PPFD to maximize stomatal aperture (Flexas et al. 2007). Measuring conditions were in accordance with the optimum ones for photosynthesis of both species (Lima Neto et al., 2015). From the photosynthetic response curves to PPFD and CO<sub>2</sub> partial pressure (*C<sub>i</sub>*), we were able to estimate the maximum photosynthetic rate (*P<sub>Nmax</sub>*), day respiration (*R<sub>d</sub>*), the maximum Rubisco carboxylation rate (*V<sub>cmax</sub>*), mesophyll conductance (*g<sub>m</sub>*) and the maximum rate of photosynthetic electron transport driving RuBP regeneration (*J<sub>max</sub>*).

*In vivo* chlorophyll *a* fluorescence was measured using a Dual-PAM 100 (Walz, Effelrich, Germany). The fluorescence measurements were taken by using the saturation pulse method (Schreiber et al. 1994) in light- and dark-adapted (30 min) leaves. The intensity and duration of the saturation light pulse were 8000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 0.7 seconds, respectively. The measurements of chlorophyll fluorescence in light-adapted samples were taken simultaneously to the measurements of leaf gas exchange, under the same chamber conditions. The following parameters were assessed: the maximum quantum efficiency of PSII [ $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ ], the effective quantum

efficiency of PSII [ $Y_{II}=(F_m'-F_s)/F_m'$ ], the non-photochemical quenching [ $NPQ=(F_m-F_m')/F_m'$ ] and the apparent electron transport rate through the photosystem II [ $ETR_{II}=(Y_{II} \times PPFD \times 0.5 \times 0.84)$ ]. To estimate  $ETR_{II}$ , 0.5 was used as the fraction of excitation energy distributed to PSII, and 0.84 was used as the fraction of incoming light absorbed by the leaves. The  $F_m$  and  $F_o$  are the maximum and minimum fluorescence of dark-adapted leaves, respectively;  $F_m'$ ,  $F_o'$  and  $F_s$  are the maximum, the minimum and the steady-state fluorescence in the light-adapted samples (Maxwell and Johnson, 2000). In order to decompose the components of NPQ, relaxation kinetics (Maxwell and Johnson, 2000). In this kinetics the portion that is fast relaxed (NPQf) is associated with the energy state quenching (qE) and the slower part of the kinetics (NPQs) is related to the photoinhibitory quenching (qI) (Maxwell and Johnson 2000).

Photochemical activity of PSI was measured under the same conditions described previously for measurements of PSII activity and leaf gas exchange. The redox stage of the P700 was also measured using the Dual PAM 100 (Walz, Effelrich, Germany). The P700 parameters were calculated from the basic parameters P-P700 absorbance at given light intensity;  $P_m$  and  $P_m'$  the maximum P700 signal measured using saturation pulse plus a far-red illumination in dark or light-adapted state (Klughammer and Schreiber, 1994). The P700 parameters were calculated as follow (Klughammer and Schreiber, 1994) : effective quantum yield of PSI photochemistry at given PPFD,  $Y(I)=(P_m'-P)/P_m$  ; electron transport rate at PSI (assuming equal distribution of light energy between PSII and PSI and the leaf absorbance 0.84),  $ETRI = Y(I) \times PPFD \times 0.5 \times 0.84$ ; oxidation status of PSI donor side; the fraction of P700 that is oxidized at given state,  $P700^+/P700=Y(ND)=P/P_m$ ; reduction status of PSI acceptor side, the fraction of overall P700 that is oxidized in a given state by saturation pulse due to a lack of electron acceptors,  $Y(NA)=(P_m-P_m)/P_m$ . The cycle electron flow (CEF) was estimated by the  $ETRI/ETR_{II}$  ratios (Yamori et al, 2011).

### **OJIP Measurements and P700<sup>+</sup> fast kinetics**

OJIP measurements were assessed with a Dual-PAM 100 (Walz, Effelrich, Germany). Leaf samples were illuminated with continuous red actinic light ( $3,500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). The first reliably measured point of the fluorescence transient was at 20  $\mu\text{s}$ , which was taken as  $F_o$  (Tóth et al., 2009). The redox changes in P700 were measured with the same equipment. Absorbance changes were recorded in continuous light on a millisecond time scale. Dark-adapted plants were exposed to 10 seconds of FR-light. A

saturation pulse was applied at FR-light. Data were obtained with a time resolution of 50  $\mu$ s (Klughammer and Schreiber, 1994; Tóth et al., 2009).

The normalized P700 kinetics at far-red illumination was monitored in light adapted leaves ( $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) for thirty minutes. After illumination time lights were turned off. Immediately after dark points were saved in a time resolution of 50  $\mu$ s. The leaves kept in the dark for 100 ms. Then, the P700 pool was oxidized by far red (FR) light for 40 s. After that the FR light was turn off and points are saved during 30 s to follow the re-reduction of P700 (Joliot and Joliot, 2006; Zivcak et al., 2014). The PSI inactivation kinect was performed using the method developed by Sejima et al., (2014) modified by Zivcak et al., (2015). Leaves were dark-adapted for 20 minutes. Saturation pulse (300 ms,  $15,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) was applied every 10 s in the absence of actinic light for 20 min using simultaneous records of chlorophyll fluorescence and P700 parameters, as described above. After PSI-inactivation the photoinhibited leaves were exposed to red light ( $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) for 20 minutes to start photosynthetic process and Y(I) and Y(II) were measured as described above.

### **Hydrogen peroxide content in leaf segments with P700-inactvated**

After the inactivation of P700 in leaf segments the  $\text{H}_2\text{O}_2$  content was measured by the Amplex Red oxidation method (Zhou et al., 1997). Leaf segments were ground with potassium phosphate buffer 100 mM pH 7.5. The crude extract was centrifuged at 12,000 g for 30min at 4° C, and the supernatant was used to the reaction. The supernatant was supplemented with 10 mM Amplex-Red and 10 U of horseradish peroxidase. The production of resorufin was measured in 560 nm. Leaf segments that have been adapted to the dark 40 minutes and 20 minutes the light were used as control.

### **Statistical analysis and experimental design**

This study was organized in two sets of experiments. The first experiment was arranged in a completely randomized design in a  $2 \times 2$  factorial (*Jatropha curcas* and *Ricinus communis*  $\times$  0 and 100 mM NaCl) and five replicates, each consisting of an individual plant per pot. Data were analyzed using ANOVA, and the means were compared using Tukey's ( $P < 0.05$ ).

## Results and discussion

### Stress parameters

In the present study, *R. communis* and *J. curcas* plants were exposed to 100 mM NaCl for consecutive 15 days in order to promote stomatal and metabolic limitations in photosynthesis (table 1). Salinity promoted significant reduction on the relative water content and water potential in both species; however, *R. communis* was more affected in these parameters than *J. curcas* (table 1). In contrast, *J. curcas* displayed higher membrane damage and lower leaf dry matter under salinity than *R. communis* compared to their respective controls. Both species increased the chlorophyll and carotenoids content under salinity. In addition, chlorophyll a/b ratio was decreased, probably due to the increase in chlorophyll b as a light scattering mechanism (Ogbaga et al., 2014). Concerning to inorganic solute content, salt treatment similarly increased the Na<sup>+</sup> content in both species (table 1). As expected, the leaf K<sup>+</sup> content underwent a decrease in both species under salinity but *R. communis* displayed lower K<sup>+</sup> accumulation (table 1).

It was previously demonstrated that *R. communis* is strongly dependent of water supply and susceptible to osmotic effects but is salt – tolerant (Babita et al., 2010; Li et al., 2010; Lima Neto et al., 2015). However, the decreases in water status displayed by *R. communis* were not related to membrane damage, which was more increased in *J. curcas* plants exposed to salinity, showing that *J. curcas* plants were able to relatively maintain their water status but were more susceptible to salinity than *R. communis*. Previous studies with *J. curcas* have suggested that this species is salt sensitive exhibiting a leaf Na<sup>+</sup> exclusion mechanism when the osmotic phase of salt stress is predominant (Nascimento et al., 2011; Lima Neto et al., 2014).

### Photosynthetic efficiency parameters from P<sub>N</sub>-Ci and P<sub>N</sub> PPF<sub>D</sub> curves

Regarding gas exchange efficiency, we assessed P<sub>N</sub>-Ci and P<sub>N</sub> PPF<sub>D</sub> responses curves in plants of *R. communis* and *J. curcas* under control condition or exposed to 100 mM NaCl for 15 days. The parameters modelled from these curves were affected by salt treatment in both species (table 2). The maximum photosynthetic rate ( $P_{NMAX}$ ), the maximum carboxylation rate of Rubisco ( $V_{cmax}$ ) and the maximum electron transport rate decreased similarly in both species in response to salinity (table 2). Day respiration

was strongly increased in *R. communis* plants and decreased in *J. curcas* under salinity. These data, is in accordance with Lima Neto et al. (2014), showing that *R. communis* display a strongly increase in photorespiration (PR) under salt stress whereas in *J. curcas* PR was slightly increased under salinity. The mesophyll conductance decreased by 33% in *R. communis* and by 50% in *J. curcas* exposed to salinity (table 2). The data presented show that both species displayed metabolic, as decreases in  $V_{cmax}$ , and mesophyll (gm) restrictions in photosynthesis.

### PSII analyses

The potential quantum yield of PSII did not change for the salt stress treatment applied in both species (Figure 1A). However, the effective quantum yield of PSII [Y(II)] and the apparent electron transport rate of PSII were similarly decreased in *R. communis* and *J. curcas* plants exposed to salt stress (Figure 1B-C). The non-photochemical quenching (NPQ) was increased in both species under salinity (Figure 1D). The data show that possibly the PSII of both species are not photoinhibited, since  $F_v/F_m$  was at control levels. However, a transient modulation of PSII photochemistry was achieved as a regulation of the electron transport chain to avoid harmful damage of excess energy. The NPQ is an important mechanism to avoid the excess energy in the thylakoids membranes of plants presenting  $CO_2$  assimilation restrictions (Ware et al., 2014). However, NPQ is composed of different components as  $q_I$ ,  $q_T$ ,  $q_Z$  and  $q_E$  (Carvalho et al., 2015).  $q_E$  is one of the most important component of the NPQ related to the dissipation of excess energy as heat, however, the molecular mechanism of this component and if this component is related to the antenna complex of PSII core still under elucidation (Johnson et al., 2011).

Order to decompose the components of NPQ and elucidate the importance of  $q_E$  dissipating heat as a photoprotector mechanism in *R. communis* and *J. curcas* under salinity we performed a fluorescence relaxation kinetic (Maxwell and Johnson, 2000). *R. communis* plants displayed an increase only in the fast relaxation portion of the NPQ ( $NPQ_f$ ), with is related with  $q_E$ , and the slow relaxation portion of the NPQ ( $NPQ_s$ ) with is related with photoinhibition did not change under salinity (Figure 2). In contrast, *J. curcas* showed increased in both portions of NPQ ( $NP_f$  and  $NPQ_s$ ), demonstrating that the increase in NPQ in this species is not completely related with a photoprotection mechanism. Part of this NPQ is related with a photoinhibited portion of PSII regardless

the Fv/Fm for this specie (Maxwell and Johnson, 2000). In addition, we performed an OJIP test to elucidate the possible PSII photoinhibition in both species under salinity (supplementary figure 1). The OJIP test showed that in *R. communis* exposed to salt stress the O-J portion was slower compared with control. In contrast, *J. curcas* displayed a chlorophyll raise slowed down of IP phase. However, P inflection did not change for both species under salinity (supplementary figure 1).

OJIP transient rise reflects, in the first approximation, the successive reduction of the electron acceptor pool of PSII ( $Q_A$ ,  $Q_B$  and PQ pool). The inflections represent the heterogeneity of the process. The OJ rise is the photochemical phase, the inflection “J” represents the momentary maximum of  $Q_A^-$ ,  $Q_A^-Q_B$  and  $Q_A^-Q_B^-$ . The inflection “I” may reflect the concentration of  $Q_A^-Q_B^{2-}$  and “P” may reflect the peak concentration of  $Q_A^-$ ,  $Q_B^{2-}$  and  $PQH_2$  (Strasser, 1997; Stirbet and Govindjee, 2011). The data show that the studied species presented different regulation on the reduction kinect of the electron acceptor pool of PSII, possibly related to regulation on the donor and acceptor sites of PSII and PSI (Zivcak et al., 2015a).

### **P700<sup>+</sup> redox state analyses**

The effective quantum yield of PSI [Y(I)] was strongly decreased in *R. communis* plants exposed to salinity while it was slightly decreased in *J. curcas* plants (Figure 3A). The same trend was found for the electron transport rate of PSI (Figure 3B). The quantum yield of non-photochemical energy dissipation in donor-side limitation (YND) did not change under salinity in both species (Figure 3C). However, the quantum yield of non-photochemical energy dissipation in acceptor-side limitation (YNA) was strongly increased in *R. communis* under salinity and did not change in *J. curcas* (Figure 3D). It was interestingly to notice that *J. curcas* in control conditions presented higher Y(NA) compared with *R. communis*. According to Sejima et al. (2014) a further increase in Y (NA) reduced the acceptor side of PSI. In other words, salt treatment caused electrons to accumulate at the acceptor side of PSI, and the efficiency of electron flow from P700 to the electron acceptor ferredoxin or  $NADP^+$  was decreased in *J. curcas* but not in *R. communis*.

It was interestingly to note that *R. communis* increased the P700<sup>+</sup> pool under salinity compared to its respective control condition. In contrast, *J. curcas* displayed a slightly decrease in P700<sup>+</sup> under salinity (Figure 3E). It was recently demonstrated that

the maintenance of P700 in its oxidized state (inactivated) could be an important mechanism to avoid the overproduction of ROS at PSI level (Sejima et al., 2014; Zivcak et al., 2015b). One possible explanation to this process an increase in the estimated cyclic electron flow (CEF) triggered by *J. curcas* plants exposed to salinity, which was not triggered in *R. communis* (Figure 3F). The CEF is an important photoprotection mechanism, producing ATP to sustain the D1 turnover and increasing  $\Delta\text{pH}$  to maintain NPQ (Golding and Johnson, 2003; Zivcak et al., 2013; Yamori et al., 2016). However, the relative contribution of the CEF to photoprotection has not been elucidated yet.

Order to investigate the redox state of P700 in *R. communis* and *J. curcas* plants exposed to salt it was performed a fast kinetics of  $\text{P700}^+$  (Figure 4). It was clearly demonstrated that *R. communis* exposed to salinity revealed a higher  $\text{P700}^+$  state under the re-reduction in the dark (Figure 4A). In contrast, *J. curcas* exposed to salinity displayed a fast re-reduction of  $\text{P700}^+$ , probably by the increase in the CEF (Figure 4B). The step of re-reduction of the kinetics measures the speed with which the electrons reach the PSI (Toth et al., 2009). These electrons were provided both by OEC and by CEF. However, as shown in Figure 01 C, the plants of both species under salt stress had the same amount of ETRII. This suggests that the observed difference in re-reduction of P700 is related only to CEF.

Corroborating the previous results, it was performed a reduction kinetics of P700 using far-red in dark after the leaves were adapted to light (Figure 5). In dark conditions, P700 pool was reduced and with the far-red exposition, P700 became oxidized. *R. communis* showed a higher oxidized P700 compared to its control (Figure 5A). In contrast, *J. curcas* displayed slight differences on the far-red exposition kinetics (Figure 5B). The data presented revealed that under dark conditions, with no excitation of PSII, the electrons that reduce the PSI only come from the cyclic electron flow (Zivcak et al, 2014). Surprisingly, *Ricinus communis* is the most tolerant species to salt stress. It has been shown that increased rates of cyclic electron flow around PSI leads to the photooxidizable P700 content by inducing a  $\Delta\text{pH}$  across thylakoid membranes (Msilini et al 2013, Sejima et al 2014, Takagi et al, 2016).

The decrease of the CEF in *Ricinus communis* in salt stress was also confirmed by the use of an inhibitor the linear flow of electrons, DCMU (Table S1). Leaf segments infiltrated with 300 mM sorbitol maintained their ETRII. However, when leaves were



infiltrated with DCMU, the entire linear flow of electrons was inhibited as shown by the drop of ETRII to zero. Even under these conditions, the flow of some electrons of ETRI was kept through the CEF. All results together suggest that in fact there was a decrease in the CEF in *Ricinus communis* under salt stress.

The results make it clear that CEF was inhibited; yet, the P700 was photooxidized. It has been suggested that the oxidation of P700 pool would be a mechanism to avoid PSI photoinhibition. To assess whether the oxidation of P700 in *Ricinus communis* is a fact or an artifact it was used the methodology to induce photoinhibition of PSI proposed by Sejima et al. 2014 (rSP). As expected the plants under salt stress revealed a more oxidized P700 at the beginning of treatment (Figure 6A). During treatment with SP in *Ricinus communis* plants, both treatments (salt and control) had their P700 pools reduced. The control plants P700 oxidized pool was reduced by approximately 60%. However, P700 pool in *Ricinus communis* plants treated with salinity fell by only 45%. The plants in both treatments showed a decrease in the quantum yield of PSII of approximately 25% (Figure 6B) which is consistent with the data found by Sejima and colleagues (2014). This suggests in fact that the plants exposed to salt stress are more tolerant to PSI photoinhibition.

On the other hand, rSP promotes PSI photoinhibition and induces an increase in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in both treatments (control and salt). However, the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was about three times greater in plants exposed to salinity stress and rSP simultaneously compared to solely photoinhibited plants (Figure 7). Only the salt stress was not able to induce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation. However, Takagi et al. (2016) showed that the removal of singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) reduces photoinhibition PSI in isolated thylakoids of spinach and inactivation of SOD and APX enzymes did not affect this response, which may suggest that hydrogen peroxide is not so important to PSI photoinhibition.

This work is just an early study to understand the relevance of the mechanisms that prevent photoinhibition of PSI *in vivo* and the possible relevance of PSI photoinhibition in plants. We suggest that the regulation of CEF in salt stress in *Jatropha curcas* and *Ricinus communis* was important. On the other hand in *Ricinus communis* the CEF was not as alternative electron pathways to increase ΔpH as suggested by other authors. The NPQ was increased but it is also not promoted by the CEF. In *Ricinus communis* the decreased in CEF probably promoted the other

alternative electron skin avoided PSI photoinhibition. However, more studies are needed.

## References

- Asada, K., 1999. THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601–639. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.601
- Babita, M., Maheswari, M., Rao, L.M., Shanker, A.K., Rao, D.G., 2010. Osmotic adjustment, drought tolerance and yield in castor (*Ricinus communis* L.) hybrids. *Environ. Exp. Bot.* 69, 243–249. doi:10.1016/j.envexpbot.2010.05.006
- Carvalho, F.E.L., Ware, M.A., Ruban, A. V., 2015. Quantifying the dynamics of light tolerance in *Arabidopsis* plants during ontogenesis. *Plant, Cell Environ.* 38, 2603–2617. doi:10.1111/pce.12574
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103, 551–60. doi:10.1093/aob/mcn125
- Deinlein, U., Stephan, A.B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., Schroeder, J.I., 2014. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends Plant Sci.* 19, 371–379. doi:10.1016/j.tplants.2014.02.001
- Derks, A., Schaven, K., Bruce, D., 2015. Diverse mechanisms for photoprotection in photosynthesis. Dynamic regulation of photosystem II excitation in response to rapid environmental change. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1847, 468–485. doi:10.1016/j.bbabi.2015.02.008
- Duarte, B., Santos, D., Marques, J.C., Caçador, I., 2013. Ecophysiological adaptations of two halophytes to salt stress: Photosynthesis, PS II photochemistry and anti-oxidant feedback - Implications for resilience in climate change. *Plant Physiol. Biochem.* 67, 178–188. doi:10.1016/j.plaphy.2013.03.004
- Goh, C.-H., Ko, S.-M., Koh, S., Kim, Y.-J., Bae, H.-J., 2011. Photosynthesis and Environments: Photoinhibition and Repair Mechanisms in Plants. *J. Plant Biol.* 93–101. doi:10.1007/s12374-011-9195-2
- Golding, A.J., Johnson, G.N., 2003. Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. *Planta* 218, 107–14. doi:10.1007/s00425-003-1077-5
- Hoagland, D.R., Arnon, D.J., 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Agric Exp Cir* 347.
- Johnson, M.P., Zia, A., Ruban, A. V., 2011. Elevated  $\Delta$ pH restores rapidly reversible photoprotective energy dissipation in *Arabidopsis* chloroplasts deficient in lutein and xanthophyll cycle activity. *Planta*. doi:10.1007/s00425-011-1502-0
- Joliot, P., Joliot, A., 2006. Cyclic electron flow in C3 plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 362–8. doi:10.1016/j.bbabi.2006.02.018
- Kangasjärvi, S., Neukermans, J., Li, S., Aro, E.-M., Noctor, G., 2012. Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *J. Exp. Bot.* 63, 1619–36. doi:10.1093/jxb/err402

- Klughammer, C., Schreiber, U., 1994. An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700+-absorbance changes at 830 nm. *Planta* 192. doi:10.1007/BF00194461
- Li, G., Wan, S., Zhou, J., Yang, Z., Qin, P., 2010. Leaf chlorophyll fluorescence, hyperspectral reflectance, pigments content, malondialdehyde and proline accumulation responses of castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings to salt stress levels. *Ind. Crops Prod.* 31, 13–19. doi:10.1016/j.indcrop.2009.07.015
- LICHTENTHALER, H.K., WELBURN, A.R., 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11, 591–592.
- Lieth, J.H., Reynolds, J.F., 1987. The nonrectangular hyperbola as a photosynthetic light response model: Geometrical interpretation and estimation of the parameter-omega. *Photosynthetica* 21, 363–366.
- Lima Neto, M.C., Martins, M.O., Ferreira-Silva, S.L., Silveira, J.A.G., 2015. *Jatropha curcas* and *Ricinus communis* display contrasting photosynthetic mechanisms in response to environmental conditions. *Sci. Agric.* 72, 269–269.
- Maes, W.H., Achten, W.M.J., Reubens, B., Raes, D., Samson, R., Muys, B., 2009. Plant–water relationships and growth strategies of *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. *J. Arid Environ.* 73, 877–884. doi:10.1016/j.jaridenv.2009.04.013
- Makino, A., Miyake, C., Yokota, A., 2002. Physiological functions of the water-water cycle (Mehler reaction) and the cyclic electron flow around PSI in rice leaves. *Plant Cell Physiol.* 43, 1017–26.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–68.
- Miyata, K., Ikeda, H., Nakaji, M., Kanel, D.R., Terashima, I., 2016. Rate Constants of PSII Photoinhibition and its Repair , and PSII Fluorescence Parameters in Field Plants in Relation to their Growth Light Environments Rate Constants of PSII Photoinhibition and its Repair , and PSII Fluorescence Parameters in Field Plant. doi:10.1093/pcp/pcv107
- Msilini, N., Essemine, J., Zaghdoudi, M., Harnois, J., Lachaâl, M., Ouerghi, Z., & Carpentier, R. 2013. How does iron deficiency disrupt the electron flow in photosystem I of lettuce leaves? *Journal of Plant Physiology*, 170(16), 1400–1406. <http://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.05.004>
- Nascimento, E., Ribeiro, R.V., Ferreira-silva, S.L., Viégas, R.A., Albenisio, J., Silveira, G., 2011. Salt stress induced damages on the photosynthesis of physic nut young plants. *Biologia (Bratisl)*. 62–68.
- Neto, M.C.L., Lobo, A.K.M., Martins, M.O., Fontenele, A. V, Silveira, J.A.G., 2014. Dissipation of excess photosynthetic energy contributes to salinity tolerance: A comparative study of salt-tolerant *Ricinus communis* and salt-sensitive *Jatropha curcas*. *J. Plant Physiol.* 23–30.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Murata, N., 2011. Protein synthesis is the primary

- target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiol. Plant.* 142, 35–46. doi:10.1111/j.1399-3054.2011.01457.x
- Ogbaga, C.C., Stepien, P., Johnson, G.N., 2014. Sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties adopt strongly contrasting strategies in response to drought. *Physiol. Plant.* doi:10.1111/ppl.12196
- Ruban, A. V., 2016. Non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protection against photodamage. *Plant Physiol.* pp.01935.2015. doi:10.1104/pp.15.01935
- Scholander, 1960. Sap Pressure in Vascular Plants.
- Sejima, T., Takagi, D., Fukayama, H., Makino, A., Miyake, C., 2014. Repetitive short-pulse light mainly inactivates photosystem I in sunflower leaves. *Plant Cell Physiol.* 55, 1184–1193. doi:10.1093/pcp/pcu061
- Sharkey, T.D., Bernacchi, C.J., Farquhar, G.D., Singaas, E.L., 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C(3) leaves. *Plant. Cell Environ.* 30, 1035–40. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01710.x
- Sonoike, K., 2011. Photoinhibition of photosystem I 142, 56–64. doi:10.1111/j.1399-3054.2010.01437.x
- Stirbet, A., Govindjee, 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J. Photochem. Photobiol. B.* 104, 236–57. doi:10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010
- Strasser, R.J., 1997. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. *Photosynth. Res.* 52, 147–155.
- Sudhir, P., Murthy, S.D.S., 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* 42, 481–486. doi:10.1007/S11099-005-0001-6
- Takagi, D., Takumi, S., Hashiguchi, M., Sejima, T., & Miyake, C. 2016. Superoxide and singlet oxygen produced within the thylakoid membranes both cause photosystem I photoinhibition. **Plant Physiology.** <http://doi.org/10.1104/pp.16.00246>
- Tikkanen, M., Aro, E., 2014. Integrative regulatory network of plant thylakoid energy transduction. *Trends Plant Sci.* 19, 10–17. doi:10.1016/j.tplants.2013.09.003
- Tikkanen, M., Mekala, N.R., Aro, E.-M., 2014. Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 210–5. doi:10.1016/j.bbabi.2013.10.001
- Tikkanen, M., Rantala, S., Aro, E.-M., 2015. Electron flow from PSII to PSI under high light is controlled by PGR5 but not by PSBS. *Front. Plant Sci.* 6, 521. doi:10.3389/fpls.2015.00521
- Tóth, S.Z., Puthur, J.T., Nagy, V., Garab, G., 2009. Experimental evidence for ascorbate-dependent electron transport in leaves with inactive oxygen-evolving complexes. *Plant Physiol.* 149, 1568–78. doi:10.1104/pp.108.132621

- Ware, M. a., Belgio, E., Ruban, a. V., 2014. Comparison of the protective effectiveness of NPQ in Arabidopsis plants deficient in PsbS protein and zeaxanthin. *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/jxb/eru477
- Yamori, W., Makino, A., Shikanai, T., 2016. A physiological role of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis under fluctuating light in rice. *Sci. Rep.* 6, 20147. doi:10.1038/srep20147
- Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R.P., 1997. A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. *Anal. Biochem.* 253, 162–168. doi:10.1006/abio.1997.2391
- Zivcak, M., Brestic, M., Balatova, Z., Drevenakova, P., Olsovska, K., Kalaji, H.M., Yang, X., Allakhverdiev, S.I., 2013. Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress. *Photosynth. Res.* 117, 529–546. doi:10.1007/s11120-013-9885-3
- Zivcak, M., Brestic, M., Kunderlikova, K., Olsovska, K., Allakhverdiev, S.I., 2015a. Effect of photosystem i inactivation on chlorophyll a fluorescence induction in wheat leaves: Does activity of photosystem i play any role in OJIP rise? *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 152, 318–324. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.08.024
- Zivcak, M., Brestic, M., Kunderlikova, K., Sytar, O., 2015b. Repetitive light pulse-induced photoinhibition of photosystem I severely affects CO<sub>2</sub> assimilation and photoprotection in wheat leaves. *Photosynth. Res.* 449–463. doi:10.1007/s11120-015-0121-1
- Zivcak, M., Kalaji, H.M., Shao, H.-B., Olsovska, K., Brestic, M., 2014. Photosynthetic proton and electron transport in wheat leaves under prolonged moderate drought stress. *J. Photochem. Photobiol. B.* 137, 107–115. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.01.007

**Table 1** – Relative water content (RWC); Water potential ( $\Psi_w$ ), membrane damage, leaf dry matter (DM), photosynthetic pigments in leaves of *Ricinus communis* and *Jatropha curcas* plants subjected to 15 days of 100 mM NaCl. Capital letters represents means among treatments for the same species and lower case letters among species for the same treatment, by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

	<i>Ricinus communis</i>		<i>Jatropha curcas</i>	
	Control	Salt	Control	Salt
RWC*	80 Aa	68 Ba	75 Aa	70Ba
$\Psi_w$ **	-0.52 Bb	-1.91 Aa	-0.69 Ba	-1.94 Aa
Membrane Damage*	31 Aa	36 Ab	25 Bb	54 Aa
Leaf DM***	4.23 Aa	3.35 Ba	3.92 Aa	1.85 Bb
Chlorophyll***	6.52 Bb	7.73 Ab	8.62 Aa	9.24 Aa
Chlorophyll a/b***	2.08 Ba	1.11 Aa	1.87 Bb	1.07 Ba
Carotenoids****	0.36 Ba	1.29 Aa	0.48 Ba	1.42 Aa
Na <sup>+</sup>	72 Ba	320 Ab	85 Ba	400 Aa
K <sup>+</sup>	238 Ab	127 Bb	410 Aa	297 Ba

\*(%), \*\* (MPa), \*\*\* (g/plant), \*\*\*\* (mg/g DM) + (mmol/Kg DM)

Padronizar pigmentos por área foliar.

**Table 2** - Parameters calculated from the  $P_N$ -PPFD and  $P_N - C_i$  curves.  $P_{Nmax}$  is the maximum  $CO_2$  assimilation rate;  $R_d$  is the day respiration;  $V_{cmax}$  is the maximum carboxylation rate of Rubisco and  $J_{max}$  is the maximum photosynthetic electron transport rate and  $g_m$  is the mesophyll conductance in *R. communis* and *J. curcas* plants subjected to 15 days of 100 mM NaCl. Capital letters represents different means among treatments for the same species and lower case letters among species for the same treatment, by Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

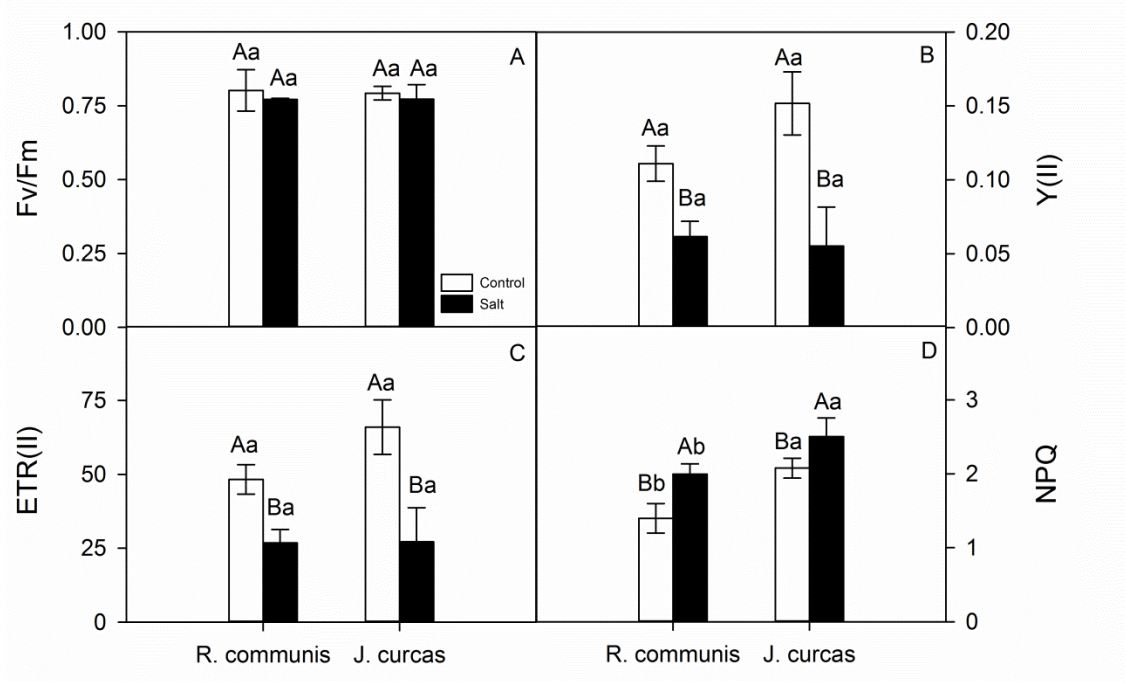
	<i>R. communis</i>		<i>J. curcas</i>	
	control	salt	control	Salt
$P_{Nmax}$	25.02Aa	7.63Ba	22.94Ab	8.01Ba
$R_d$	1.88Bb	3.64Aa	3.37Aa	1.26Bb
$V_{cmax}$	116Aa	17Bb	106Ab	28Ba
$J_{max}$	122Aa	44Ba	109Ab	65Bb
$g_m$	0.08Aa	0.06Ba	0.04Ab	0.02Bb

\* ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) \*\* ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

**Table S1** – Eletron transport rate (ETR) in *Ricinus communis* and *Jatropha curcas* leaf segments infiltrated with Sorbitol 300 mM or DCMU

	<i>Ricinus communis</i>		<i>Jatropha curcas</i>	
	ETR <sub>II</sub>	ETR <sub>I</sub>	ETR <sub>II</sub>	ETR <sub>I</sub>
Mock-Control	50 ± 2.5 Ab	100 ± 10 Aa	75 ± 4 Ab	95 ± 9 Aa
Mock-Salt	25 ± 1.5 Ba	40 ± 3 Bb	25 ± 3 Ba	78 ± 9 Aa
DCMU-Control	0 Aa	8 ± 0.5 Aa	0 Aa	5,17 ± 0.5 Ba
DCMU-Salt	0 Aa	4 ± 0.8 Ba	0 Aa	5,13 ± 0.5 Aa

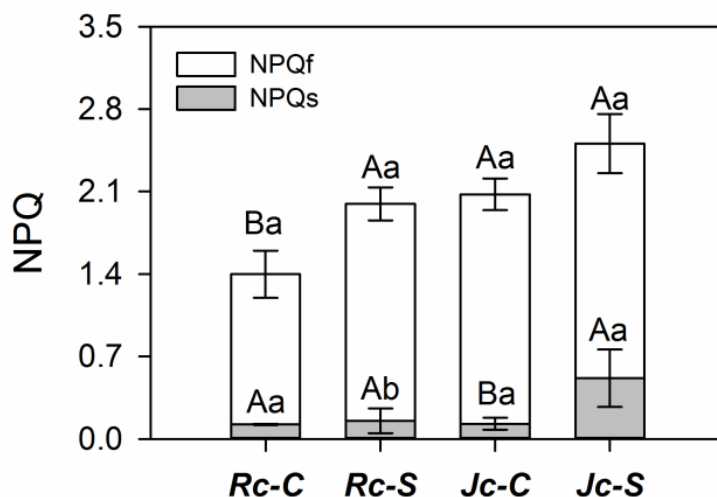
**Figure 1** – Potential quantum yield of PSII (A); Effective quantum yield of PSII (B); electron transport rate of PSII (C); non-photochemical quenching (D) in leaves of *R. communis* and *J. curcas* exposed to salt stress (NaCl 100 mM) or control for 15 days. Data points represent the means of five replicates +- SD. Capital letters represents different means among treatments for the same species and lower case letters among species for the same treatment, by Tukey's test (P<0.05).



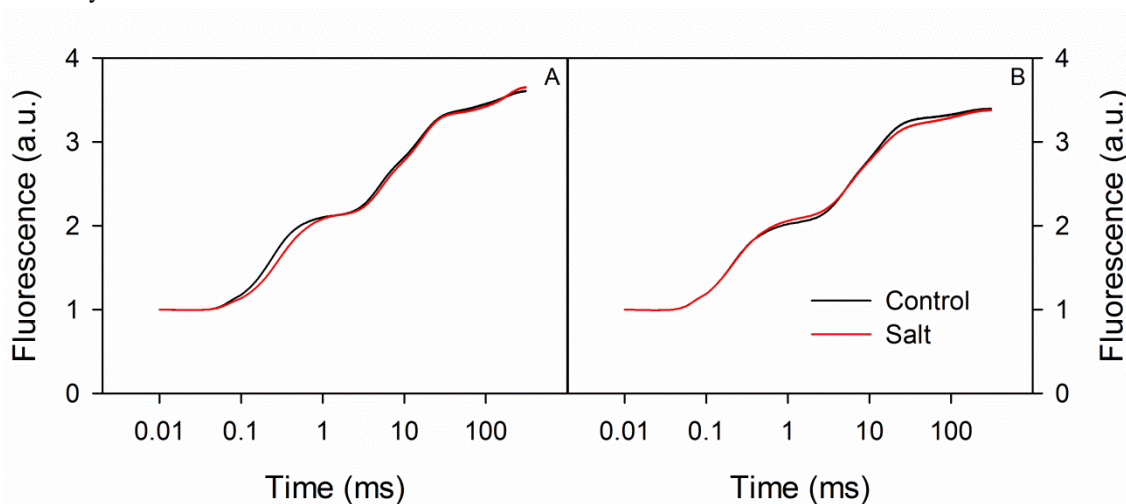


**Figure 2** –Fast- and slow-relaxing components of NPQ (NPQf and NPQs, respectively) in leaves of *R. communis* and *J. curcas* subject or not to salt treatment. Measurements were carried out 15 days after initiating salt treatment. Data points represent the means  $\pm$  SD of at least five replicates. Capital letters represents different means among treatments for the same species and lower case letters among species for the same treatment, by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

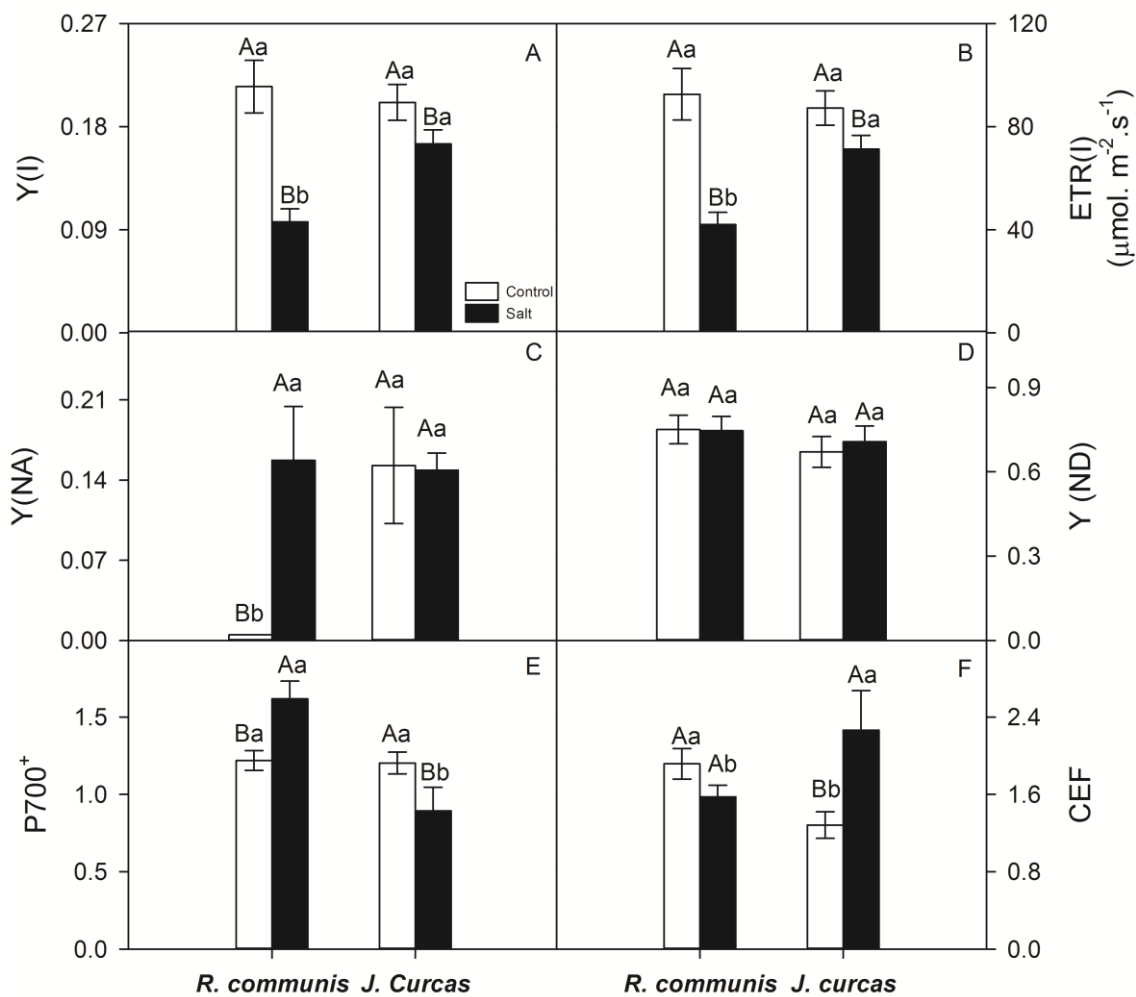
(Adicionar a cinética do relaxamento)



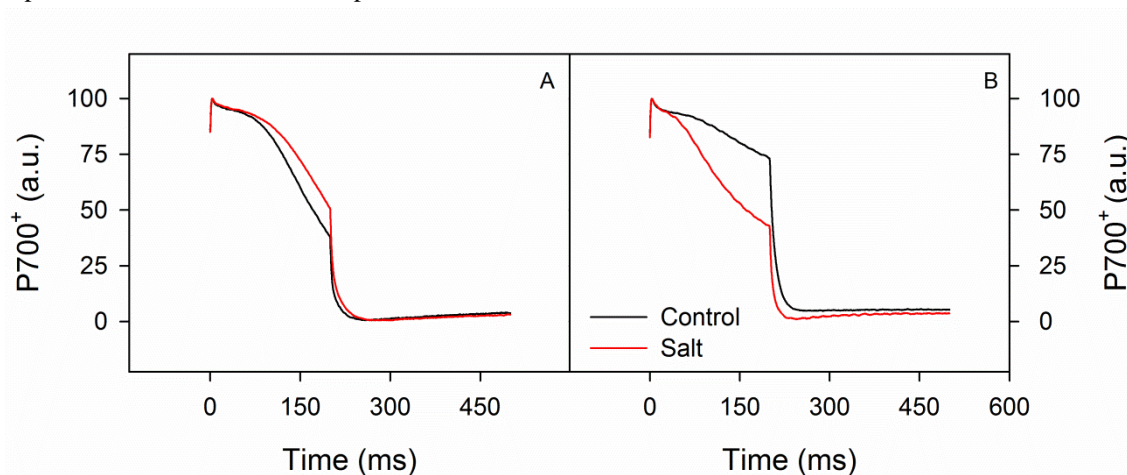
**Figure S1**- Fast Chl *a* fluorescence transients (OJIP curves) of untreated and salt-treated *Ricinus communis* (A) and *J. curcas* (B) plants measured at  $3,500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$  photon flux density. A.U., Arbitrary units.



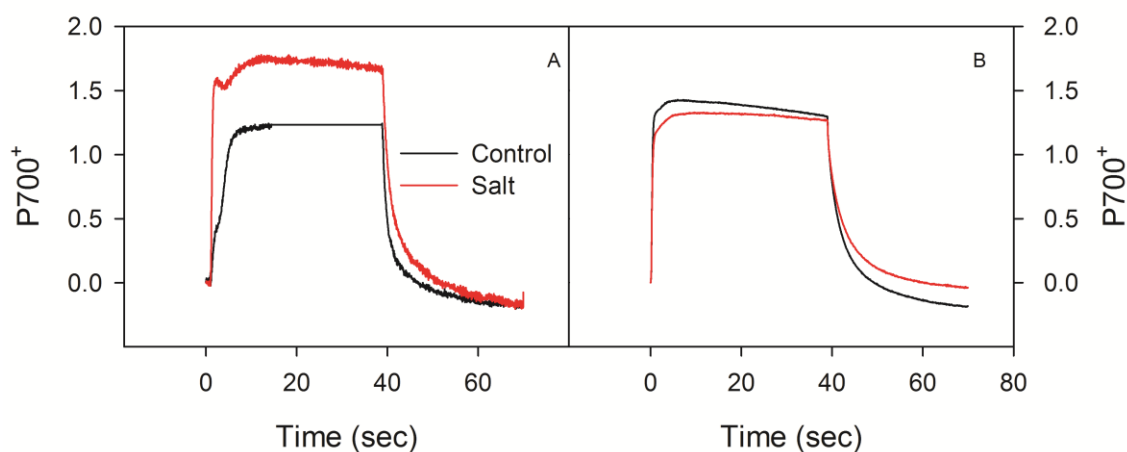
**Figure 3** - Actual quantum yield of PS I (A); electron transport rate of PSI (B); quantum yield of non-photochemical energy dissipation in donor-side limitation (C); quantum yield of non-photochemical energy dissipation in acceptor-side limitation (D); oxidation at P700 maximum; (E); and ETRI/ETRII ratio (F) in leafs of *Ricinus communis* and *J.curcas* control or salt (100 mM). Data points represent the means of five replicates +- SD. Capital letters represents different means among treatments for the same species and lower case letters among species for the same treatment, by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).



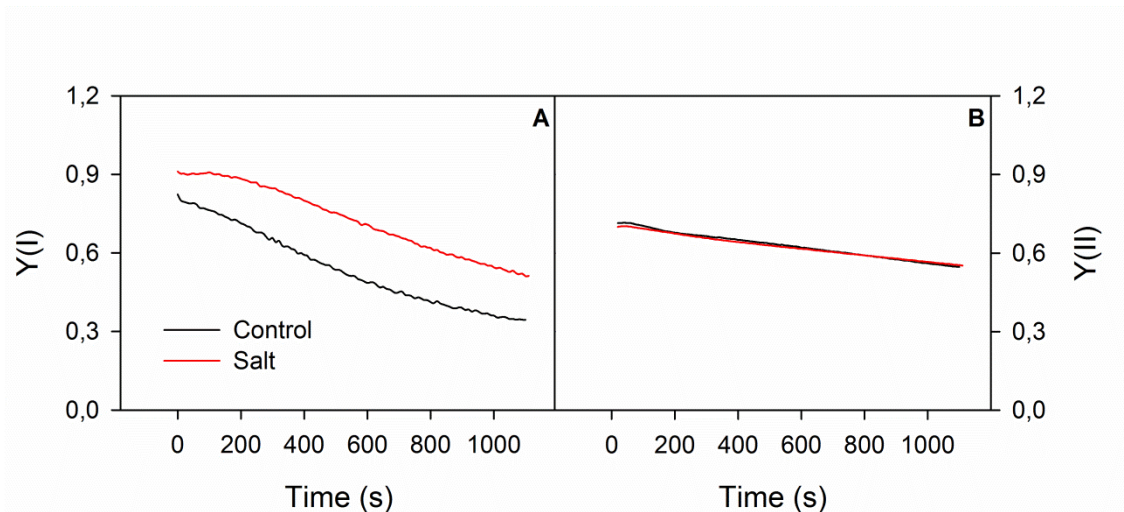
**Figure 4-** The normalized P700 Kinetics ( $P700^+/P700$  total) displayed in regular time scale. The records were done in leaves of non-stress and salt-stress of *Ricinus communis* (A) and *J. curcas* (B). Data points represent the means of sixteen replicates.



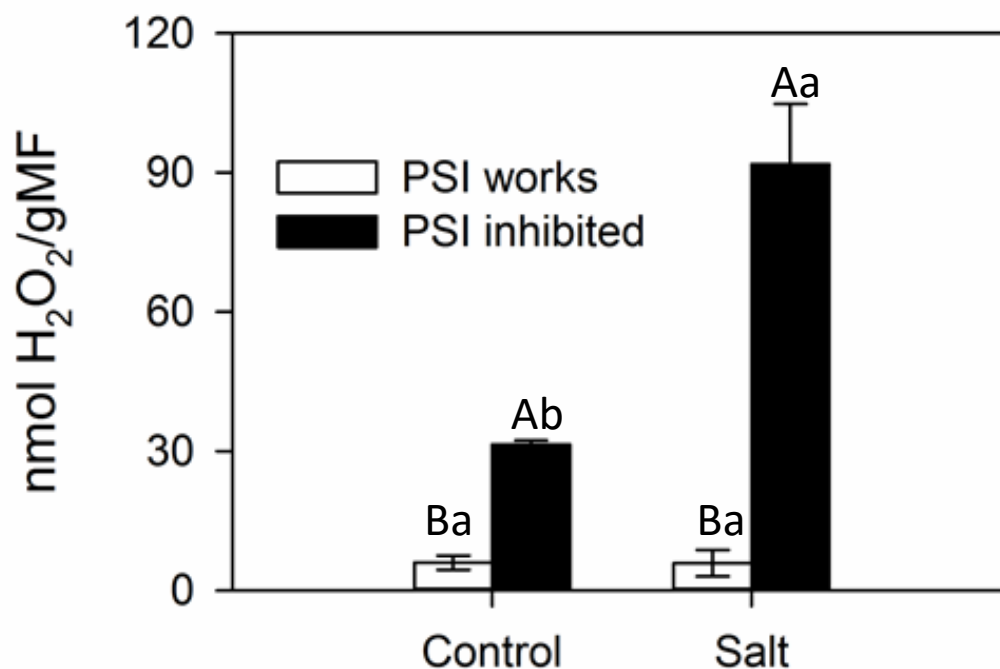
**Figure 5-** The normalized P700 kinetics at far-red light illumination in light-adapted leaves of non-stress and salt-stress of *Ricinus communis* (A) and *J. curcas* (B). Data points represent the means of sixteen replicates.



**Figure 6:** SP treatment in *Ricinus communis* control and salt stress. Decrease of quantum yield during exposure saturation pulses in the dark (SP applied every 10 seconds for a period of 20 minutes). (A) PSI (B) PSII. Six repetitions were used).



**Figure 7:** Hydrogen peroxide concentration in fotoinibidas sheets (PSI inhibited) and non-fotoinibidas (PSI works) *Ricinus communis* grown in control conditions or in 100 mM NaCl after 20 minutes of induction light ( $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Capital letters refer to comparisons between plants in the same treatment (control or salt). Lowercase letters are for plants with the same state of PSI (photoinhibited or non-photoinhibited).



## **INTER-CAPÍTULOS**

A literatura descreve que plantas de *Ricinus communis* e *Jatropha curcas* diferem em suas estratégias sobrevivência frente aos estresses abióticos. O capítulo II apresentou um conjunto de evidências que reforça essa afirmativa. No entanto, diversos estresses abióticos possuem características comuns. Luz, seca e salinidade são estresses capazes de provocar um desbalanço entre síntese de poder redutor (ATP/NADPH) e seu consumo (ciclo de Calvin). O capítulo anterior utilizou o estresse salino apenas como uma maneira de afetar o balanço entre a síntese e o consumo de energia química obtida na fotossíntese. A regulação fotoquímica dessas plantas para atingir uma nova homeostase e evitar a fotoinibição do PSI foi o foco de estudo no capítulo II. Os resultados apresentados pelo PSII e NPQ apresentado por ambas as espécies foram condizentes com outros resultados apresentados pela literatura. Entretanto ao analisar o PSI, o resultado obtido diferiu um pouco do que tem sido postulado. Trabalhos anteriores que comparam a *Ricinus communis* e *Jatropha curcas* sugerem que a *Ricinus communis* é mais tolerante ao estresse salino. Por outro lado, ao estimar o fluxo cíclico de elétrons pela razão entre os ETRs dos fotossistemas, apenas a *Jatropha curcas* aumentou o CEF. A equação aplicada sugeriu que a *Ricinus communis* reduziu o CEF frente ao estresse salino. O CEF é considerado um dreno de energia do PSI porque ele seria uma fonte de  $\Delta pH$  e força próton motriz, o que ativa outros mecanismos fotoprotetores como o NPQ. Outras metodologias foram empregadas para confirmar a queda de CEF em plantas estressadas de *Ricinus communis*. A inibição do LEF e as cinéticas de NIR forneceram respostas que se assemelham ao que foi encontrado pela razão dos ETRs. Curiosamente, as plantas *Ricinus communis* se beneficiou do decréscimo do CEF. Apenas a *Ricinus communis* foi capaz manter o pool de P700<sup>+</sup> frente ao estresse o que é uma característica desejável para a sobrevivência das plantas. No entanto, devido à complexidade das respostas, não se pode atribuir todas as repostas à limitação no ciclo de Calvin. Em virtude dessa dificuldade, outro estresse ambiental foi utilizado com o objetivo de promover a limitação no ciclo de Calvin. No capítulo III, o estresse de deficiência hídrica será usado com a premissa de que seu efeito será promover um desbalanço entre poder redutor gerado e assimilado.

**Capitulo III – Impairment in CO<sub>2</sub> assimilation  
induced by water deficit mitigates PSI  
photoinhibition in *Ricinus communis***

## RESUMO

Plantas são organismos sésseis que têm de lidar com redundantes condições ambientais adversas como seca e salinidade. Esses estresses geram um desbalanço entre o poder redutor gerado pela fase redutora da fotossíntese e o consumo pela fase oxidativa. Desse modo, intensidades de luz consideradas baixas podem promover a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas ROS causam danos aos fotossistemas que ao longo do tempo podem acarretar um fenômeno conhecido como fotoinibição. Ambos os fotossistemas podem ser afetados pela fotoinibição. Entretanto, *in vivo* o PSII é mais fácil de estudar e aparenta ser mais sensível do que o PSI. Consequentemente o PSII foi intensamente estudado nas últimas décadas. Por outro lado, ao contrário da fotoinibição do PSII, a fotoinibição PSI é irreversível. Além disso, *in vitro*, o PSI apresenta – se muito mais sensível do que o PSII, o que sugere as plantas *in vivo* priorizam manter o PSI funcional em detrimento do PSII. Apesar de ter se passado mais de meio século desde a primeira definição de fotoinibição, pouco se conhece sobre quais mecanismos as plantas utilizam para evitar que o PSI seja inativado *in vivo* quando em situações estressantes como a deficiência hídrica. Recentemente, foi desenvolvida uma metodologia que permite causar fotoinibição apenas ao PSI e como consequência todas as respostas podem ser atribuídas apenas a inibição deste. Plantas de *Ricinus communis* bem irrigadas e em deficiência hídrica foram submetidas ao tratamento de fotoinibição. Os resultados foram similares ao que foi previamente encontrado pela exposição a salinidade. As plantas estressadas apenas pela salinidade decresceram o fluxo cíclico de elétrons, mas devido à indução do NPQ é provável que a força próton motriz dessas plantas tenha aumentado. Após o tratamento de fotoinibição do PSI, as plantas bem hidratadas se mostraram mais suscetíveis ao tratamento de fotoinibição do que as plantas adaptadas à deficiência hídrica embora as plantas sob bem hidratadas tenham produzido menos ROS. Em conclusão, o trabalho sugere que plantas de *Ricinus communis* expostas a um estresse que limite o ciclo de Calvin irão inibir o CEF, mas que provavelmente existe outro mecanismo capaz de aumentar o pmf e consequentemente sequestrar elétrons do P700. Como resultado, as plantas de *Ricinus communis* adaptadas a esses estresses estão mais aptas a responder à fotoinibição do PSI do que plantas em condições ditas ótimas.

**Palavras-chaves:** Fluxo cíclico de elétrons, ciclo de Calvin, Poder redutor, *pool* de P700.



## ABSTRACT

Plants are sessile organisms that have to deal with several adverse environmental conditions such as drought and salinity. These stresses generate an imbalance between the reducing power generated by reducing phase of photosynthesis and the consumption by oxidative phase. Thus light intensities considered low can promote the production of reactive oxygen species (ROS). ROS damage photosystems which over time can cause a phenomenon known as photoinhibition. Both photosystems may be affected by photoinhibition. However, in vivo, PSII is easier to study and appears to be more sensitive than PSI. Consequently PSII has been intensively studied in the last decades. Unlike the photoinhibition of PSII, the photoinhibition of PSI is irreversible. Moreover, in vitro, PSI revealed to be much more sensitive than PSII, suggesting that plants in vivo conditions maintain functional PSI priority over the PSII one. Despite more than half a century having gone by since the first definition of photoinhibition, little is known about mechanisms that plants use to prevent the inactivation of PSI in vivo when in stressful situations such as drought stress. Recently, it was developed a methodology that induces photoinhibition of PSI and as a result all the answers can only be attributed to that inhibition. *Ricinus communis* well-watered plants and under water stress were submitted to the treatment of photoinhibition. The results were similar to what was previously found by exposure to salinity. The plants from the salinity treatment underwent a decrease of the cyclic electron flow, but due to induction of NPQ it is likely that the driving force proton of these plants has increased. After treatment of PSI photoinhibition, well-hydrated plants were more susceptible to photoinhibition treatment than plants adapted to water stress although well hydrated plants produced less ROS. In conclusion, the study suggests that *Ricinus communis* plants exposed to a stress that restricts the Calvin cycle will inhibit the cyclic electron transport (CET), but there is probably another mechanism that increases pmf and consequently steals P700 electrons. In consequence, *Ricinus communis* plants adapted to these stresses are more capable of responding to PSI photoinhibition than plants in said optimal conditions.

**Keywords:** Cyclic electron transport, Calvin cycle, reducing power, P700 pool.

## 1. INTRODUÇÃO

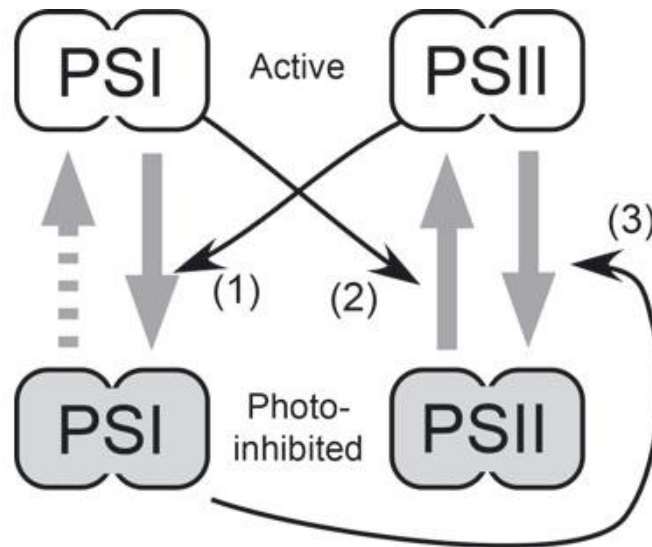
A fotossíntese explora a energia da luz proveniente do Sol para sustentar seu próprio metabolismo (LI *et al.*, 2009). Entretanto, para que a fotossíntese aeróbica seja possível alguns componentes da cadeia transportadora de elétrons (CTE) têm de operar em potenciais redox extremos (NELSON; JUNGE, 2015). Consequentemente, as proteínas que operam nesses extremos são propensas a serem danificadas por formação de radicais livres (ROS) ou por quebra das pontes de hidrogênio (NELSON; JUNGE, 2015). Concomitantemente, a produção de ROS na CTE é abundante mesmo em condições ótimas (FOYER *et al.*, 2015). Todas as ROS são extremamente perigosas ao organismo quando em excesso, de modo que sua atuação como molécula sinalizadora ou como um indutor de dano depende do delicado equilíbrio entre sua produção e sua remoção (SHARMA *et al.*, 2012). Em condições controladas os antioxidantes enzimáticos e não – enzimáticos removem o excesso de ROS de maneira eficiente (NOCTOR; FOYER, 1998). Todavia, condições que limitam a dissipação de energia pelo ciclo de Calvin – Benson (incluindo deficiência hídrica, salinidade, baixas temperaturas e acúmulo de metais pesados) podem induzir a produção de ROS de modo a causar danos aos centros de reação (RC) dos fotossistemas (PS) (fenômeno conhecido como fotodano) (SHARMA *et al.*, 2012). Em casos onde os estresses abióticos se prolongam muito o fotodano pode levar a fotoinibição (TAKAHASHI *et al.*, 2009).

A fotoinibição é um fenômeno complexo cuja definição tem sido aperfeiçoada ao longo do tempo. Kok (1956) definiu a fotoinibição como sendo uma redução na eficiência do uso da luz pelo aparato fotossintético. Ao longo da década de 70, estudos focados em bioquímica, ecofisiologia e genética avaliaram a interação entre o aparato fotossintético e os estresses abióticos e bióticos, o que proporcionou um avanço significativo na compreensão do processo de fotoinibição (OSMOND; FORSTER, 2006). Até recentemente, fotoinibição foi conceituada como uma inibição na atividade do PSII, fenômeno este que ocorreria devido ao desequilíbrio entre o fotodano ao PSII e a taxa de reparo do mesmo (TAKAHASHI; MURATA, 2008). Ambos os fenômenos são afetados por estresses abióticos como seca e salinidade (TAKAHASHI; MURATA, 2008). Esses estresses levam à redução excessiva da quinona A ( $Q_A$ ), o acceptor primário do PSII, promovendo a recombinação de cargas e acarretando a formação de oxigênio tríples (O<sub>2</sub>) que por sua vez, degrada a proteína D1 (TAKAGI *et al.*, 2016). Além do aumento de oxigênio tríples induzir o dano à

proteína D1, o estresse abiótico como deficiência hídrica, salinidade e excesso de luz também induz a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) inibe a síntese *de novo* desta proteína e culmina na fotoinibição do PSII (EJIMA *et al.*, 2012).

Por outro lado, Satoh e colaboradores (1970 a, b) mostraram que *in vitro* a luz pode inibir ambos os fotossistemas. Além disso, nos anos 90, um grupo de pesquisa japonês publicou uma sequência de artigos mostrando que o PSI poderia ser inibido, que a fotoinibição do PSI *in vitro* pode ocorrer sem que o PSII seja fotoinibido e que os efeitos da fotoinibição do PSI eram significativos sob estresse de baixas temperaturas (TERASHIMA *et al.*, 1994; SONOIKE; TERASHIMA, 1994; SONOIKE, 1996). Todavia, a fotoinibição do PSI recebeu menos atenção que a fotoinibição do PSII devido a uma série de fatores como a limitada combinação entre a espécie vegetal e a condição ambiental na qual o fenômeno poderia ocorrer, o aspecto não-regulatório da fotoinibição do PSI e as dificuldades metodológica de determinar com acurácia a atividade do PSI sob condições de estresse (SONOIKE, 2011). Além disso, mesmo com as evidências fornecidas pelo grupo de Sonoike, a atividade do PSII é considerada um pré-requisito para que ocorra a fotoinibição do PSI, como esquematizado na Figura 01, seta 1. Curiosamente, o oposto não é verdade. Manter o PSI ativo favorece a recuperação da fotoinibição do PSII, pois o fluxo cíclico de elétrons dependente do PSI pode continuar a síntese de ATP e dessa maneira favorecer a síntese *de novo* da D1 (Figura 1, seta 2) (SONOIKE, 2011; FOYER *et al.*, 2012). Quando o PSI é inibido a síntese de ATP é inibida. Como a síntese e o reparo da proteína D1 precisa de um contínuo fornecimento de energia na forma de ATP, a fotoinibição do PSI pode causar a fotoinibição do PSII (SONOIKE, 2011). Desse modo, é plausível supor que o ciclo de fotoinibição e reparo do PSII é um mecanismo fotoprotetor que evita um dano irreversível ao PSI (TIKKANEN *et al.*, 2014).

**Figura 01** - Diagrama esquemático da relação entre o PSI e o PSII sobre fotoinibição. (1) O PSII ativo induz a fotoinibição do PSI através da pressão gerada pelo transporte de elétrons. (2) O PSI ativo favorece a recuperação do PSII fotoinibido pelo fornecimento de ATP para o *turnover* da proteína D1. (3) A fotoinibição do PSI favorece a fotoinibição do PSII por promover a super-redução do *pool* de plastoquinonas.



**Fonte:** SONOIKE, 2011.

O processo de fotoinibição do PSI, no entanto, é diferente daquele do PSII. Recentemente, Takagi et al. (2016) mostraram que nos estágios iniciais da fotoinibição do PSI ocorre uma redução do lado receptor de elétrons, mas não há degradação das subunidades do PSI (proteínas PsaA e PsaB) embora o conteúdo de clorofila tenha diminuído. Entretanto, os centros Fe – S reduzidos podem converter o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em radical hidroxil ( $*OH^{\cdot}$ ), o que imediatamente destrói os centros Fe – S (SONOIKE *et al.*, 1997). A quebra do centro Fe – S gera uma modificação conformacional no complexo do PSI permitindo a degradação de PsaB por uma protease do tipo serina (SONOIKE et al, 1997). Apesar de limitada a condições ambientais específicas, a fotoinibição do PSI tem consequências mais severas do que a fotoinibição do PSII (ZIVCAK *et al.*, 2015). Os componentes do PSI não têm taxas de *turnover* tão altas quanto o da proteína D1, e a recuperação das subunidades do RC do PSI demandam muito tempo se comparada às do RC do PSII (SONOIKE *et al.*, 2011). Zivcak e colaboradores (2015) induziram a fotoinibição em plantas de trigo por meio de pulsos de saturação repetidos (rSP) em um curto intervalo de tempo. Nesse experimento, o PSII se recuperou completamente sua atividade após dois dias após o

tratamento; em contraste, o PSI não recuperou sua atividade inicial mesmo doze dias após o tratamento.

É importante notar que a fotoinibição do PSI *in vivo* depende de dois fatores: a atividade do PSII e a presença de oxigênio (SEJIMA *et al.*, 2014). Todavia, *in vitro* a fotoinibição do PSI ocorre a temperatura ambiente bem como em baixas temperaturas e esse fenômeno independe da tolerância da espécie ao frio (SONOIKE *et al.*, 2011). Outro dado importante fornecido por Sonoike (1995) é o fato de baixas intensidades luminosas serem capazes de causar a fotoinibição de cloroplastos isolados tanto em espinafre como em pepino. Esses dados sugerem que o PSI é naturalmente sensível à fotoinibição, mas possivelmente existem vias fotoprotetoras *in vivo* as quais provavelmente são bloqueadas em baixas temperaturas. No entanto, essas rotas fotoprotetoras ainda não são conhecidas (SONOIKE *et al.*, 2011).

Apesar da literatura apresentar bons exemplos de que a fotoinibição do PSI existe *in vivo*, de que este fenômeno é mais perigoso do que a fotoinibição no PSII e do mecanismo básico ser compreendido, ainda restam algumas lacunas com relação a elucidar o papel fisiológico da fotoinibição do PSI (SEJIMA *et al.*, 2014). No entanto, estudar a fotoinibição do PSI é um processo difícil. Todavia, Sejima *et al.* (2014) propuseram uma metodologia para fotoinibir baseada na aplicação de pulsos de saturação (SP) de 300 ms de duração em intervalos de 10 segundos durante algumas horas. Uma considerável parte do *pool* de PSI é afetado sem lesar significativamente o PSII. Essa metodologia foi posteriormente adaptada por Zivcak e colaboradores (2015), de modo que os pesquisadores obtiveram sucesso em fotoinibir o PSI de plantas de trigo em 15 minutos de exposição. Esse método de fotoinativação do PSI por SP excede a ocorrência natural de intensidade luminosa, por isso não se pode através dela simular o que realmente aconteceria em uma condição natural. Por outro lado, todas as mudanças observadas após o tratamento com SP podem ser atribuídas unicamente aos efeitos da fotoinibição do PSI quase sem interferências indesejáveis (ZIVCAK *et al.*, 2015).

Estudos realizados com *Ricinus communis* mostraram que quando essa planta cresce em substrato inerte (vermiculita e areia na proporção 1:1) o estresse salino pode inibir o fluxo cíclico de elétrons (CEF), o que promove uma maior oxidação no *pool* de P700 (dados não publicados). Uma característica comum na fotoinibição do PSI é a redução do lado aceptor de elétrons do PSI, que leva a uma perda do potencial de

oxidação do P700 (SONOIKE, 2011; SEJIMA *et al.*, 2014; ZIVCAK *et al.*, 2015; TAKAGI *et al.*, 2016). Desse modo foram levantadas 2 hipóteses:

1. A resposta do CEF é relacionada ao fechamento estomático, então a deficiência hídrica de maneira similar salinidade (como foi mostrado no capítulo anterior) que tenham como efeito principal a limitação na assimilação de CO<sub>2</sub> também podem promover uma resposta similar;
2. Ao contrário do que é proposto pela literatura, a resistência à fotoinibição do PSI não é ligada ao CEF em si, mas à indução de drenos alternativo que talvez gerem um aumento na força motriz de prótons.

O presente estudo avalia as duas hipóteses fazendo uso de abordagens biofísicas aplicadas à fisiologia vegetal como fluorescência da clorofila *a* e absorvância do P700, assim como à mensuração do peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos sugerem que plantas de *Ricinus communis* em estresse abiótico ativam mecanismos de resposta à fotoinibição do PSI. Essa conclusão é plausível uma vez que na natureza os estresses ambientais ocorrem simultaneamente.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Material Vegetal e Condições de Crescimento

Sementes de *Ricinus communis* (L.) cultivar BR149 nordestina, fornecidas pela EMBRAPA, Brasil, foram empregadas neste estudo. As sementes foram previamente selecionadas por forma e tamanho e foram germinadas em areia. Quinze dias depois da germinação, as plantas foram transferidas para potes plásticos de 3 L contendo uma mistura de vermiculita e areia (1:1). Durante as duas primeiras semanas depois do transplântio, a cada três dias foi adicionada ao substrato a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) diluída quatro vezes com pH ajustado para  $6,0 \pm 0,5$ . Após esse período, a solução de Hoagland e Arnon passou a ser diluída duas vezes e continuou a ser adicionada ao substrato a cada três dias. O substrato foi mantido a 80 % da capacidade de campo. As plantas cresceram em condições naturais em casa de vegetação situada na região do semi-árido nordestino, na cidade de Fortaleza, Brasil ( $3^{\circ}44'38''S$  and  $38^{\circ}34'11''W$ , 31 m altitude). Com 45 dias após o transplântio iniciou-se o estresse.

### 2.2 Dano de Membrana

O dano de membrana foi mensurado com base no vazamento de eletrólitos baseado em Cavalcanti et al. (2003). Ao final dos experimentos, as mesmas folhas utilizadas para trocas gasosas foram usadas para a determinação do dano de membrana. Dez discos foliares, com diâmetro de 5 mm cada, foram pesados e transferidos para tubos rosqueáveis contendo quinze mL de água destilada. Esses tubos ficaram em agitação constante durante 24 horas. Ao fim desse período, a condutividade elétrica da água foi mensurada por um condutivímetro que forneceu a condutividade inicial ( $C_{24h}$ ). Os tubos contendo os discos foliares foram então aquecidos a  $100^{\circ}C$  por uma hora em banho – maria. O aquecimento rompeu as membranas e liberou todos os eletrólitos contidos nas células. Os tubos foram retirados do banho-maria e foram deixados em repouso até que a temperatura deles chegasse a  $25^{\circ}C$ . A condutividade elétrica foi novamente mensurada, permitindo mensurar-se a condutividade total ( $C_{\Delta 1h}$ ). O dano de membrana foi calculado pela formula:

$$DM = (C_{24h} / C_{\Delta 1h}) * 100$$

### 2.3 Aplicação do estresse de deficiência hídrica

De modo semelhante ao tratamento de estresse salino, as plantas de *Ricinus communis* com 45 dias foram divididas em dois grupos. Uma semana antes do início do tratamento as plantas foram transferidas para uma câmara de crescimento controlado (Fitotron,  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , temperatura variando entre  $24^{\circ}$ - $27^{\circ}\text{C}$ , umidade controlada em 60%). O experimento foi realizado em câmara de crescimento controlado, o Fitotron. As plantas controle continuaram tendo a capacidade de campo ajustada em 80% por todo o período de tratamento. As plantas em tratamento de deficiência hídrica tiveram a rega suspensa por 6 dias, momento no qual as plantas em seca apresentaram 10% da abertura estomática em relação às plantas controle. Às nove horas da manhã foram mensurados os parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila A e absorvância do P700 e cinéticas no *Near Infra-Red* (NIR) na primeira folha completamente expandida. Em seguida, o PSI dessas plantas foi inibido pelo método de SP (SEJIMA *et al.*, 2014; ZIVCAK *et al.*, 2015). Após o período de indução da fotoinibição, a área da folha fotoinibida foi adaptada ao claro por 20 minutos a  $1000 \mu\text{mol fóton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Imediatamente após a indução por luz, área foliar fotoinibida foi coletada, pesada e então se procedeu a extração do conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por meio do método de Amplex Red.

### 2.4 Medidas de Trocas gasosas

As trocas gasosas foram monitoradas para determinar o momento em que a abertura estomática das plantas sobre estresse hídrico chegasse a 10% da abertura das plantas na condição controle. A primeira folha completamente expandida foi selecionada para mensurar as trocas gasosas porque em algumas plantas as folhas mais velhas estavam em processo de senescência. O aparelho empregado para estimar as trocas gasosas foi o *Infra Red Gas Analyzer* (IRGA LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, USA). O aparelho emite uma luz vermelha com 10% de luz azul (para estimular a abertura estomática) e detecta sinais no infravermelho que permite detectar heteroátomos como o  $\text{CO}_2$  e a  $\text{H}_2\text{O}$ . Por essa razão gases como o oxigênio e o nitrogênio que estão em maior concentração na atmosfera não atrapalham as medidas. O aparelho quantificou a taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $P_N$ ), condutância estomática ( $G_s$ ), pressão interna de  $\text{CO}_2$  e transpiração ( $E$ ) (LIETH; REYNOLDS, 1987).



## 2.5 Mensurações de fluorescência da Chl *a* e absorbância do P700

A fluorescência da clorofila A e o estado redox do P700 foram mensuradas *in vivo* simultaneamente através do Dual PAM 100 (Walz, Effelrich, Alemanha). Os parâmetros de fluorescência e absorbância do P700 foram mensurados usando o método do pulso de saturação (KLUGAMMER; SCHREIBER, 1994) em folhas adaptadas ao escuro por 30 minutos; no entanto os parâmetros serão descritos separadamente. O aparelho utiliza uma luz de mensuração modulada (que não existe na natureza) para medir a fluorescência. Ao ligar a luz modular o aparelho detecta o  $F_0$  – Fluorescência mínima. O primeiro pulso de saturação foi aplicado com a folha ainda adaptada ao escuro e forneceu  $F_m$  – Fluorescência máxima – no escuro. Em seguida foi fornecida uma luz actínica ( $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ‘*photosynthetic photon flux density*’ (PPFD)) durante 20 minutos. A cada 2 minutos um novo pulso de saturação foi aplicado com o intuito de mensurar a eficiência do PSII naquele momento. Na presença da luz, cada pulso de saturação nos forneceu um  $F_m'$  e  $F_0'$ , fluorescência máxima e fluorescência mínima no claro, respectivamente. Com os parâmetros mensurados foram calculados: o rendimento quântico potencial do PSII [ $F_v/F_m=(F_m-F_0)/F_m$ ]; o rendimento quântico efetivo do PSII [ $Y(II)=(F_m-F_s)/F_m'$ ] mensurado; o *quenching* não-fotoquímico [ $NPQ=(F_m-F_m')/F_m'$ ] e o transporte linear de elétron do PSII [ $ETR_{II}=Y(II) \times \text{PPFD} \times 0,5 \times 0,84$ ] (ZIVCAK *et al.*, 2014). Para a mensuração do ETR foi assumido que ocorreu uma absorção igual de luz pelos fotossistemas, logo PSII recebeu 50% da luz que chegou ao cloroplasto (valor 0.5) (BAKER, 2008). Também foi considerado que o valor médio de absorção da folha foi 0.84 (BAKER, 2008).

Após o primeiro pulso de saturação no escuro, utilizado para mensurar a fluorescência da clorofila A, foi fornecida uma luz vermelho-distante (FR). O FR oxidou o *pool* P700. Ao aplicar um novo pulso de saturação em presença de FR foi possível mensurar o  $P_m$  – sinal máximo de P700 (P700 totalmente oxidado). Posteriormente, quando a luz é ligada, o pulso de saturação aplicado a cada 2 minutos irá fornecer o  $P_m'$  (parâmetro é definido em analogia ao  $F_m'$ , ou seja, o *pool* de P700 oxidado na luz). P- absorbância a dada intensidade. Esses valores permitiram calcular parâmetros que estimam o estado redox do *pool* de P700. Seguindo Klughammer e Schreiber (1994) foram calculados: eficiência quântica defetiva do PSI em determinado

PAR,  $Y(I)=Y_{PSI}=(P'_m-P)/P_m$  ; taxa de transporte de elétrons do PSI,  $ETRI = Y_{PSI} \times PAR \times 0,5 \times 0,84$ . O fluxo cíclico de elétrons (CEF) foi estimado pelo valor de  $ETR I/ETR II$  (YAMORI *et al.*, 2011).

## 2.6 Cinéticas do P700

O fluxo de elétrons no PSI foi avaliado também por meio de cinéticas fornecendo – se uma luz actínica com comprimento de onda próximo ao infravermelho (*Near Infra-Red* ou NIR na sigla em inglês), realizadas através do Dual PAM 100 (Walz, Effelrich, Alemanha). Plantas de *Ricinus communis* foram adaptadas ao claro (20 minutos de luz actínica a  $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Imediatamente após a suspensão do fornecimento de luz actínica foi acionada uma luz FR ( $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) durante 30 segundos. Os pontos da cinética foram salvos em intervalos de 50  $\mu\text{s}$  a partir do início da aplicação da luz FR. Durante a aplicação da luz apenas o P700 foi oxidado, mas não atingiu o 100% de oxidação. Quando a luz foi desligada o P700 rapidamente foi reduzido. Os pontos após o bloqueio no fornecimento de FR foram salvos por 40 segundos, o que permitiu estimar o CEF pelo fato de nenhum elétron ter sido fornecido pelo PSII.

## 2.7 Fotoinibição do PSI via rSP

A fotoinibição do PSI foi realizada pelo método desenvolvido pelo grupo de pesquisa orientado por Miyake (SEJIMA *et al.*, 2014) e modificado por Zivcak (2015). Plantas de *Ricinus communis* foram adaptadas ao escuro por 20 minutos e receberam repetidos pulsos de saturação (rSP) (300 ms,  $15000 \mu\text{mol fóton. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), que foram aplicados a cada 10 segundos em ausência de luz actínica sob condições normais por 20 minutos, mensurando simultaneamente a fluorescência da clorofila A e os parâmetros do P700.

## 2.8 Conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

O conteúdo de peróxido de hidrogênio das folhas de *Ricinus communis* foi determinado pelo método de oxidação do Amplex Red, previamente descrito por Zhou (1997). Plantas adaptadas ao escuro por 40 minutos foram em seguida expostas a 20 minutos de luz actínica, sendo usadas como controle. Folhas de *Ricinus communis* adaptas à luz foram maceradas com tampão fosfato de potássio 100 mM pH=7,5 (porção de 200 mg / mL). O macerado foi centrifugado 12000 g por 30 minutos á 4°C e

o sobrenadante foi usado para a reação. O sobrenadante foi suplementado com 10 mM de Amplex Red e 10 U de peroxidase. Trinta minutos depois, a resorufina formada pela reação foi mensurada a 560 nm.

## **2.9 Estratégia Experimental e Análise Estatística**

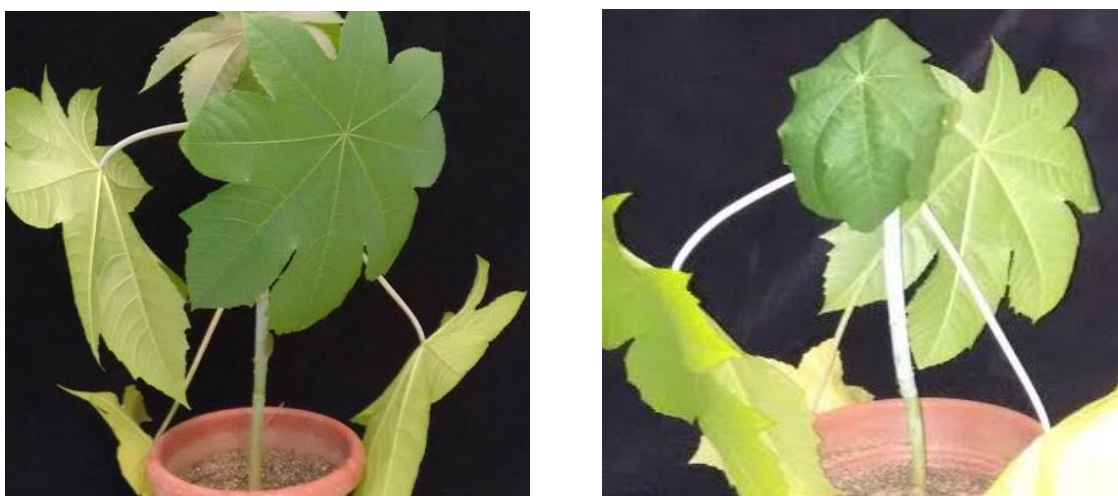
Plantas de *Ricinus communis* cultivadas em substrato sólido (vermiculita e areia 1:1) foram transferidas para a câmara de crescimento controlado por uma semana. Após esse período as plantas tiveram sua irrigação suspensa. Quando as plantas tratadas apresentaram uma queda de 90 % na abertura estomática em relação às plantas controle a coleta do tratamento foi realizada. No sexto dia de tratamento, foram mensurados parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, estado redox do P700 e as cinéticas do NIR. Uma vez concluída essas mensurações as plantas foram adaptadas ao escuro por 20 minutos. Após esse período, metade das plantas de ambos os tratamentos passou pelo processo de fotoinibição do PSI (20 minutos de SP) e a outra metade permaneceu mais 20 minutos de escuro. Imediatamente após o tratamento, a região fotoinibida foi coletada para a quantificação de peróxido de hidrogênio. A primeira folha completamente expandida de cada planta foi padronizada para esse experimento porque algumas das plantas apresentaram sinais de senescência nas folhas mais velhas. O experimento apresentou um fatorial de 1 x 4: 1 espécie (*Ricinus communis*) x 4 tratamentos (controle, seca , PSI fotoinibido e seca + PSI fotoinibido). Foram usadas três réplicas independentes. Os dados foram analisados usando ANOVA, e as medidas foram comparadas usando o teste de Tukey com um nível de significância a 0.05.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 O Estresse de Deficiência Hídrica Afetou as Trocas Gasosas, mas Causou Poucos Efeitos sob o Transporte de Elétrons em *Ricinus communis*

Seis dias após o início do tratamento as plantas expostas a deficiência hídrica apresentaram uma redução de crescimento, mostraram indícios de senescência nas folhas mais velhas e perda de turgor foliar como mostrado na figura 01.

**Figura 02** - Plantas de *Ricinus communis* após uma semana de aclimação ao Fitotron e seis dias de tratamento. Planta controle (supridas com 80% da capacidade de campo) à esquerda exposta á deficiência hídrica (suspensão total de rega) à direita.



Na tabela 01 foram listados alguns parâmetros que podem ser usados como indicadores de estresses. As plantas expostas ao estresse de deficiência hídrica apresentaram uma queda de 69 % na assimilação de  $\text{CO}_2$  em relação ao controle, o que foi condizente com a queda de 91 % da condutância estomática (tabela 01). A taxa de transpiratória (E) e a concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $\text{C}_i$ ) também decresceram significativamente devido ao fechamento estomático. As plantas com deficiência hídrica reduziram em 58 e 90 % a concentração interna de  $\text{CO}_2$  e taxa de transpiração, quanto a seus controles, respectivamente. Concomitantemente, a eficiência do uso da água ( $\text{Pn}/\text{E}$ ) aumentou quase três vezes nas plantas em seca, entretanto a taxa de carboxilação instantânea ( $\text{Pn}/\text{C}_i$ ) decaiu para quase metade do valor exibido pelas plantas controle. Esses parâmetros indicam que houve de fato uma queda na absorção de  $\text{CO}_2$  devido ao fechamento estomático. No entanto, o ciclo de Calvin também foi afetado uma vez que a taxa de carboxilação instantânea decresceu. Consequentemente, as plantas em estresse

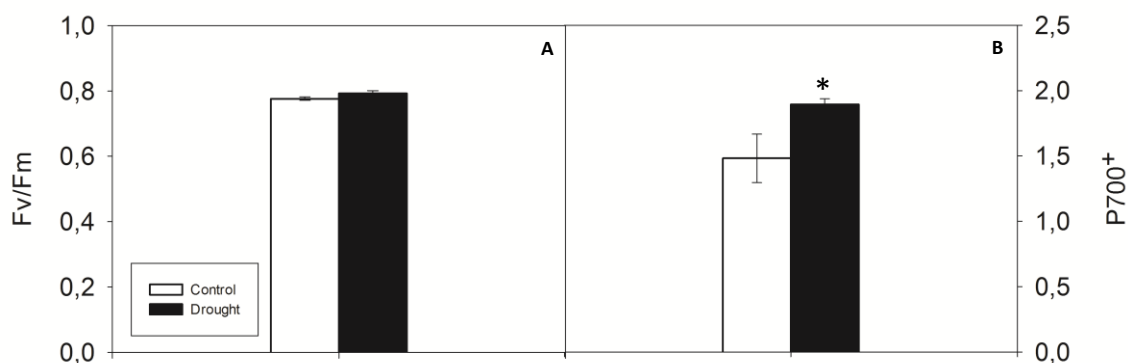
apresentaram por volta de 74 % do peso na parte aérea em relação aos seus respectivos controles. Apesar de um decréscimo de 26 % do peso, as plantas em deficiência hídrica não mostraram um aumento significativo no vazamento de eletrólitos, o que implica que as folhas selecionadas para as mensurações provavelmente não apresentaram morte celular programada, ou seja não estavam em processo de senescência.

**Tabela 01:** Parâmetros associados a estresse de plantas controle e adaptadas a deficiência hídrica (seca). Fotossíntese de rede (Pn), condutância estomática (Gs), concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci), transpiração (E), eficiência no uso de água (Pn/E), taxa de carboxilação instantânea (Pn/Ci), Massa fresca da parte aérea, dano de membrana (DM).

Parâmetros	Controle	SD	Seca	SD
Pn ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	7,7 A	1,0	2,4 B	0,9
Gs ( $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	0,345 A	0,095	0,013 B	0,004
Ci (Pa)	343,0 A	3,0	201,5 B	7,5
E ( $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	4,60 A	0,50	0,38 B	0,01
Pn/E ( $\mu\text{mol CO}_2.\text{mmol}^{-1}\text{H}_2\text{O}$ )	1,68 B	0,09	4,73 A	0,40
Pn/Ci ( $\mu\text{mol.Pa}^{-1}$ )	0,022 A	0,001	0,012 B	0,002
Massa fresca da parte aérea (g/planta)	74,67 A	3,06	55,25 B	3,77
DM (%)	12,20 A	0,56	14,10 A	0,83

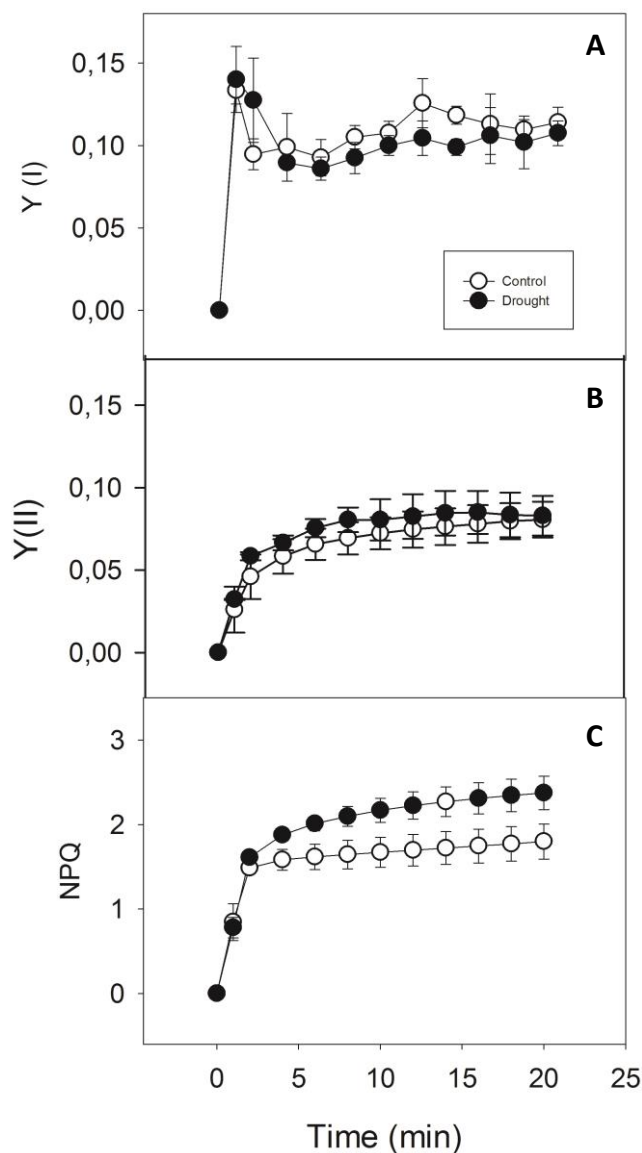
A deficiência hídrica nesse período não afetou o rendimento quântico máximo do PSII (Fv/Fm). Por outro lado, o potencial máximo de oxidação do *pool* de P700 (Pm) em plantas expostas a seca aumentou de forma significativa. O acréscimo em Pm foi de aproximadamente 27,8 % em relação ao controle, como mostrado na figura 02.

**Figura 03** - Parâmetros relacionados à fotoquímica no escuro mensurado na primeira folha completamente expandida de *Ricinus communis* (A) rendimento quântico máximo do PSII (Fv/Fm). (B) *Pool* de P700 oxidado.



As plantas submetidas ao estresse hídrico não demonstraram alterações significativas no rendimento quântico efetivo de nenhum dos fotossistemas (eficiência do PSI representado por Y(I) e a do PSII por Y(II), respectivamente). Todavia, ficou evidente que ocorreu uma limitação no ciclo de Calvin devido aos dados de trocas gasosas. Coerente com esses resultados a dissipação de energia na forma de calor, estimado pelo NPQ, aumentou apenas nas plantas expostas à seca sugerindo que ocorreu uma regulação no transporte de elétrons (Figura 04).

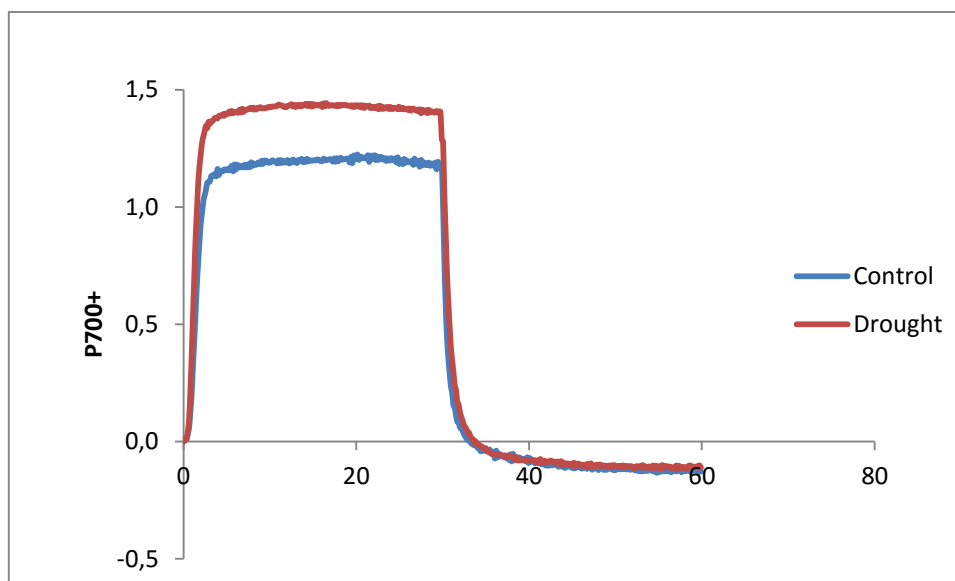
**Figura 04** – Eficiência quântica do PSI (A), Eficiência quântica do do PSII (B), *quenching* não – fotoquímico (C) mensurados ao longo de 20 minutos de iluminação ( $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) na primeira folha completamente expandida de plantas *Ricinus communis* controle (*Control*) ou sob suspensão de rega (*Drought*).



### 3.3 As Cinéticas do P700 Sugerem Que Plantas de *Ricinus communis* em Estresse Hídrico Reduzem o Fluxo Cíclico de Elétrons

As cinéticas de NIR realizada em plantas de *Ricinus communis* em deficiência hídrica mostraram que houve um aumento significativo na oxidação do pool de P700 em relação às plantas bem irrigadas quando as folhas adaptadas à luz foram induzidas por luz FR (figura 05). Esse aumento foi aproximadamente de 20 %. Além disso, quando a luz FR foi suspensa as plantas bem hidratadas chegaram ao estado estacionário no *pool* de P700 alguns 50 milisegundos mais cedo. Esses dois parâmetros sugerem que as plantas em estresse reduziram o fluxo cíclico de elétrons (CEF), resposta similar ao observado em *Ricinus communis* em estresse salino (como mostrado no capítulo anterior).

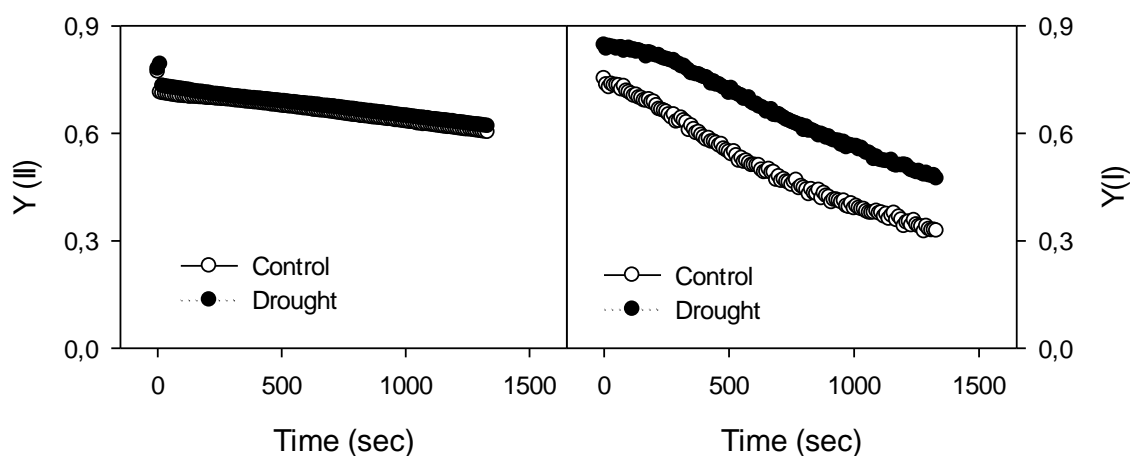
**Figura 05** – Cinética do P700<sup>+</sup> normalizada em luz vermelho-distante (FR) mensurado imediatamente após a exposição da folha à incidência luminosa normal ( $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) em folhas de plantas *Ricinus communis* não-estressadas ( *Control* ) e em deficiência hídrica ( *Drought* ).



### 3.4 Plantas de *Ricinus communis* em Deficiência Hídrica Mostram-se mais Resistentes à Fotoinibição do PSI, mas Induzem a Formação de ROS.

Plantas de *Ricinus communis* bem hidratadas e em estresse hídrico tiveram o PSI fotoinibido pela metodologia de rSP, mostraram uma pequena queda no Y(II) ao longo do tratamento, similar ao que foi encontrado por Sejima e colaboradores (2014) e no tratamento das plantas de *Ricinus communis* ao estresse salino. O decréscimo foi de 22 % do Y(II) para ambos os tratamentos. A resposta do Y(I) também apresentou resultado similar ao tratamento salino. As plantas em deficiência hídrica apresentaram um estado estacionário mais oxidado que as plantas controle no início do tratamento (1 segundo) e essa característica permaneceu evidente ao longo de todo o tratamento com rSP (Figura 06). Nas plantas não estressadas o rendimento Y(I) decresceu para 43,5 % do valor inicial, no entanto ao final do tratamento as plantas em seca mostraram aproximadamente 55,9% do Y(I) inicial. Isso sugere que as plantas em deficiência hídrica não apenas possuem um estado estacionário do P700 mais oxidado do que seus respectivos controles como também o mantém mais oxidado ao longo do tratamento.

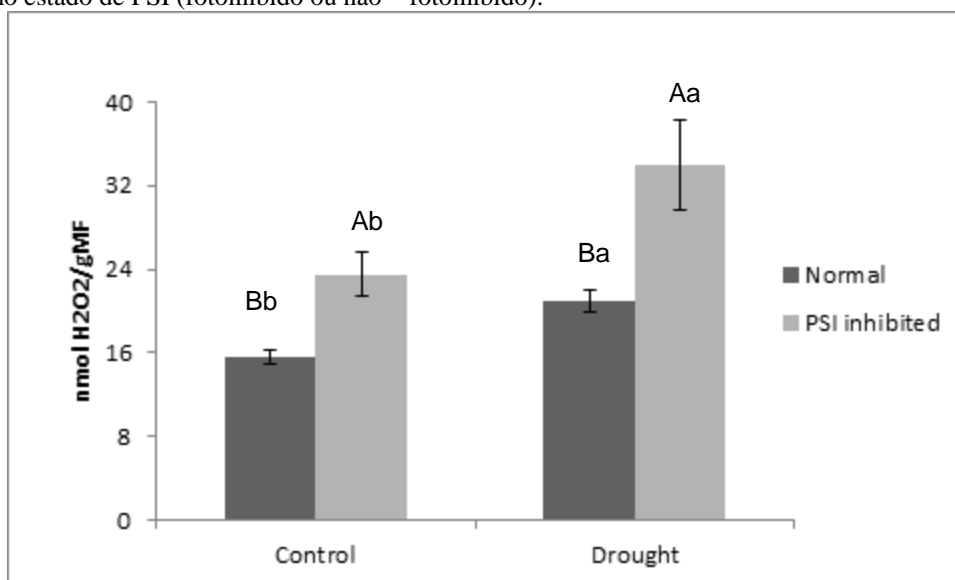
**Figura 06** – Decréscimo do rendimento quântico durante a exposição de pulsos de saturação de saturação no escuro (SP aplicado a cada 10 segundos por um período de 20 minutos). (A) Eficiência quântica do PSII (B) Eficiência quântica do PSI. Seis repetições foram utilizadas.





A fotoinibição do PSI também promoveu produção de peróxido de hidrogênio em ambos os tratamentos (controle e seca). No entanto, a combinação de seca e fotoinibição do PSI novamente levou a uma maior indução de ROS (figura 07). O tratamento rSP em plantas bem hidratadas levou a um aumento de 50,1 % na produção de  $H_2O_2$ , enquanto as plantas em seca tratadas por rSP apresentaram um aumento de 60,9 % na produção de  $H_2O_2$ . Interessantemente, o estresse de seca levou ao aumento de 33 % na síntese de ROS em relação às plantas controle, o que não ocorre no experimento com salinidade.

**Figura 07** – Concentração de peróxido de hidrogênio em folhas fotoinibidas (PSI *inhibited*) e não-fotoinibidas (*Normal*) de *Ricinus communis* crescidas em condições controle ou sob deficiência hídrica após 20 minutos de indução luminosa ( $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Letras maiúsculas se referem a comparações feitas entre plantas no mesmo tratamento (controle ou sal). Letras minúsculas são referentes a plantas com o mesmo estado de PSI (fotoinibido ou não – fotoinibido).



#### 4. DISCUSSÃO

Esse estudo testou duas hipóteses distintas baseadas em observações prévias realizadas pelo nosso grupo. Primeiramente, testou-se a hipótese de que plantas em estresse que limitem o ciclo de Calvin seriam mais tolerantes à fotoinibição do PSI pelo fato dessas plantas em estresse conseguirem manter um estado estacionário (*steady state*) mais oxidado. Os dados na literatura sugerem que para que as plantas sofram a fotoinibição do PSI o pool P700 deve permanecer reduzido (SONOIKE, 2011; SEJIMA, 2014; ZIVCAK, 2015). Os resultados obtidos mostraram no capítulo anterior claramente que as plantas de *Ricinus communis* em estresse salino não apenas oxidaram mais seu *pool* de P700 como também sofreram menos com a redução ao longo do tratamento de rSP.

Por outro lado, houve um aumento expressivo na síntese de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esse resultado entra em contradição com as ideias propostas por Sejima (2014), que sugere que ao evitar a redução do *pool* de P700 o oxigênio não seria reduzido e não ocorreria um aumento na produção de ROS. Entretanto, Takagi (2016) mostrou que a remoção de oxigênio sínglete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) reduz a fotoinibição do PSI em tilacóides isolados e que a inativação das enzimas SOD e APX não afeta essa resposta, o que pode sugerir que o peróxido de hidrogênio não seja tão importante na fotoinibição do PSI. Além disso, Sonoike (2011) sugere que o radical hidroxil proveniente do peróxido de hidrogênio é essencial para esse fenômeno uma vez que os centros Fe – S são afetados por essa ROS. Por outro lado, o trabalho discutido no capítulo anterior é o primeiro trabalho que efetivamente mensura a produção de ROS pelo método de rSP.

As plantas de *Ricinus communis* expostas à deficiência hídrica estavam visivelmente menores do que as plantas bem – hidratadas. Coerentemente, as plantas em deficiência hídrica apresentaram uma massa fresca de parte aérea menor bem como um decréscimo em parâmetros de trocas gasosas relacionadas ao crescimento. Entretanto, as plantas mesmo em condições controle apresentaram uma baixa troca gasosa quando comparadas às plantas do estudo anterior. Esse fenômeno foi atribuído ao fato desse experimento ter ocorrido em câmara de crescimento controlado. O decréscimo na fotossíntese de rede, a condutância estomática e na transpiração sugerem que as plantas em seca prontamente fecharam seus estômatos. Por outro lado, a concentração interna de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) decresceu proporcionalmente menos do que o P<sub>N</sub> quando as plantas foram

submetidas à seca. Esse fato sugere que a taxa de carboxilação instantânea da Rubisco também foi afetada pela deficiência hídrica sugerindo que o ciclo de Calvin foi afetado pelo estresse. Esse dado pode significar que a limitação das plantas de *Ricinus communis* passou a não ser apenas estomática, mas também metabólica. Entretanto, as folhas selecionadas de plantas estressadas ainda estavam em estágios iniciais de estresse, como foi mostrado pelo não aumento no dano de membrana (que não foi significativo) e pelo aumento na síntese de peróxido de hidrogênio em folhas de plantas em deficiência hídrica ter sido pequeno. O Fv/Fm não foi alterado pela deficiência hídrica, o que evidenciou que as folhas estudadas não sofriam com a fotoinibição do PSII. Esse dado também corrobora com os dados anteriores relacionados aos indicadores de estresse. O *pool* de P700 aumentou seu potencial máximo de oxidação em plantas em deficiência hídrica, resultado similar ao encontrado ao estresse salino. Esse fato sugere que também não ocorreu fotoinibição no PSI.

Ao estudar-se o fluxo de elétrons em plantas de *Ricinus communis* em estresse hídrico, ficou claro que elas não exibiram ajustes no fluxo linear de elétrons (LEF). Esse dado difere do que foi encontrado para plantas de *Ricinus communis* em estresse salino. As plantas submetidas ao estresse hídrico não reduziram a eficiência efetiva de nenhum dos fotossistemas o que sugere que as folhas estudadas ainda estavam lidando com estágios iniciais do estresse. No entanto, ambos os estresses (seca e salinidade) promoveram respostas em comum nas plantas de *Ricinus communis*. As condições estressantes estimularam a redução do CEF. Por outro lado, as plantas estressadas também induziram o NPQ e a oxidação do *pool* de P700. O NPQ pode ser induzido por três fatores: regulação da razão entre zeaxantina e violaxantina, por um acúmulo da proteína PSBS ou mesmo por outros fatores que induzam o  $\Delta\text{pH}$  dos tilacóides. O aumento do  $\Delta\text{pH}$  dos tilacóides pode significar um aumento na força próton motriz (pmf). Takagi (2016 b) mostrou que o mesmo com a queda do LEF, uma fonte importante de  $\Delta\text{pH}$ , o pmf pode aumentar em condições que favoreçam a fotorrespiração. A queda da taxa de carboxilação instantânea da Rubisco também poderia ser causada por um aumento na taxa de oxigenação, já que essa também promove a acidificação do tilacóide, o que justificaria a maior taxa de oxidação do P700. Lima Neto (2014) evidenciou que as plantas de *Ricinus communis* em elevada salinidade de fato aumentam por volta de 2 vezes sua taxa de fotorrespiração. Caso o pmf seja a causa desse aumento de NPQ é provável que ele não tenha derivado do CEF.

Para validar a segunda hipótese desse trabalho, as plantas de *Ricinus communis* bem – hidratadas e expostas à deficiência hídrica tiveram seu *pool* de PSI fotoinibido pelo tratamento de rSP. O efeito do rSP no PSII novamente permaneceu em torno de 22 %, queda semelhante ao que foi encontrado por Sejima (2014) em plantas de girassol e Takagi (2016) em cloroplastos de espinafre. Corroborando com os dados anteriores, o *pool* de P700 permaneceu mais oxidado em plantas em deficiência hídrica. Além disso, o decréscimo do Y(I) ocorreu mais rápido nas plantas bem hidratadas, sugerindo que as plantas hidratadas são mais sensíveis ao tratamento de fotoinibição do que as plantas previamente expostas a um estresse. Todavia, ocorreu uma explosão oxidativa nas plantas com o P700 fotoinibido. O aumento na síntese de peróxido de hidrogênio foi maior nas plantas com o P700 inativo em relação ao seu respectivo controle, similarmente ao que foi previamente observado pelo estresse salino. No entanto, o estresse hídrico também provocou um aumento na produção de ROS. O peróxido de hidrogênio pode, contudo, não ter relação com dano ao PSI. Takagi (2016) mostrou que a remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do O<sub>2</sub><sup>-</sup> não impedia a fotoinibição do PSI.

Os resultados sugerem que as hipóteses levantadas estão corretas. Assim como o estresse salino, a deficiência hídrica promoveu uma limitação na fixação de CO<sub>2</sub> o que limitou o Ciclo de Calvin. Ambos os estresses induziram o NPQ, mas inibiram o CEF. Além, disso, plantas em deficiência hídrica também exibiram o mesmo perfil de resistência à fotoinibição por rSP, mas induziram a produção de ROS. Desse modo, o trabalho conclui que plantas de *Ricinus communis* em estresses que limitem o ciclo de Calvin ativam mecanismos que mantêm o PSI oxidado e protegido da fotoinibição. Esses mecanismos possivelmente são ativados por uma pmf, mas em *Ricinus communis*, essa pmf não é gerada pelo aumento de CEF. Todavia, a queda do CEF pode ter alguma importância nesse processo, pois a regulação desse mecanismo ocorreu em ambos os estresses.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS E PESPECTIVAS**

Esse trabalho sugere um possível novo mecanismo de oxidação do pool de P700 presente em *Ricinus communis* que é independente do fluxo linear de elétrons.

Os resultados mostram, pela primeira vez, que o decréscimo no CEF não promove uma deficiência na oxidação do *pool* de P700 em plantas sob estresse abiótico. As plantas de *Ricinus communis* são consideradas resistentes ao estresse salino, mas o decréscimo no CEF em condições adversas foi demonstrado por três metodologias distintas. Contraditoriamente, há indícios relevantes sobre um aumento do  $\Delta\text{pH}$  (o aumento no NPQ e aumento no *pool* de P700 oxidado). Essas respostas foram similares aos resultados encontrados em plantas expostas á deficiência hídrica. No entanto, nem o pmf nem a acidificação do lúmen do tilacóides foram diretamente mensurados. Por essa razão não é possível afirmar categoricamente que exista um mecanismo que esteja induzido o  $\Delta\text{pH}$ . Por outro lado, os resultados corroboram com a existência de drenos de energia capaz de manter a homeostase dessas plantas mesmo sob as condições estudadas.

A metodologia para o rSP, mostrou que independente do estresse estudado ocorreu um decréscimo no CEF e as plantas de *Ricinus communis* submetidas ao estresse se mostram mais resistentes ao efeito da fotoinibição do PSI. Esse resultado diferiu da literatura, mas permite extrapolar que nessas plantas a oxidação do P700 está ligada ao decréscimo do CEF. No entanto, estudos adicionais precisam ser realizados. Em adição a esses dados, foram testados fármacos que podem ser usados para inibir a cadeia transportadora de elétrons (tanto cíclico como linear), o NPQ, o ciclo das xantofilas, o gradiente de prótons e o  $\Delta\text{pH}$ . Esses fármacos poderão ser usados futuramente para identificar mecanismos importantes para a oxidação do P700 em *Ricinus communis*.

Levando em consideração todos os resultados e discussões, este trabalho gera uma nova compreensão do papel fisiológico do CEF frente aos estresses abióticos e de sua importância no mecanismo de oxidação do P700.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves, **New Phytologist** 563–571, 2003

EJIMA, K.; KAWAHARADA, T.; INOUE, S.; KOJIMA, K.; NISHIYAMA, Y. A change in the sensitivity of elongation factor G to oxidation protects photosystem II from photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **FEBS Letter**. 586: 778–783, 2012.

ESSEMINE, J.; GOVINDACHARY, S.; AMMAR, S.; BOUZID, S.; CARPENTIER, R. Abolition of photosystem I cyclic electron flow in *Arabidopsis thaliana* following thermal-stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(3), 235–243, 2011.

FOYER, C. H.; NEUKERMANS, J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G.; HARBINSON, J. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression, 63 (4), 1637–1661, 2012.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Stress-triggered redox signalling: What's in pROSpect? **Plant, Cell & Environment**, 2015.

HOAGLAND D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. California **Agric Exp Cir**, Berkeley, CA, USA, 1950.

KOK, B. On the inhibition of photosynthesis by intense light. *Biochim Biophys Acta* 21:234–244, 1956.

KLUGHAMMER, C.; SCHREIBER, U. An improved method, using saturating light pulses, for the determination of Photosystem I quantum yield via P700+- absorbance changes at 830 nm, **Planta** 192 261–268, 1994.

LEI, Y.; ZHENG, K.; DAI, Y. Different responses of photosystem I and photosystem II in three tropical oilseed crops exposed to chilling stress and subsequent recovery, **Tree** 28:923–933, 2014.

LIMA NETO, M. C., LOBO, A. K. M., MARTINS, M. O., FONTENELE, A. V., & SILVEIRA, J. A. G. Dissipation of excess photosynthetic energy contributes to salinity tolerance: A comparative study of salt-tolerant *Ricinus communis* and salt-sensitive *Jatropha curcas*. **Journal of Plant Physiology**, 171(1), 23–30, 2014.

LI, Z.; WAKAO, S.; FISCHER, B. B.; NIYOGI, K. K. Sensing and responding to excess light. **Annu Rev Plant Biol** 60: 239–260, 2009.

LIETH, J. H.; REYNOLDS, J. F. The nonrectangular hyperbola as a photosynthetic light response model: geometrical interpretation and estimation of the parameter  $\hat{A}$ . **Photosynthetica**;101:363–6, 1987.

MURATA, N.; TAKAHASHI, S.; NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1767(6), 414–21, 2007.

NELSON, N.; JUNGE, W. Structure and Energy Transfer in Photosystems of Oxygenic Photosynthesis. **Annu. Rev. Biochem.**, 84, 659–683, 2015.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. “Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control,” **Annual Review of Plant Biology**, vol. 49, pp. 249–279, 1998.

OSMOND, B.; FORSTER, B.; Photoinhibition: Then and Now In: Demming-Adams, B; Adams III, W.W and Matoo, K.(Eds.), **Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation and Environment**, Springer 2006, pp.11-22.

SATOH, K. Mechanism of photoinactivation in photosynthetic systems. I. The dark reaction in photoinactivation. **Plant Cell Physiol.** 11, 15-27, 1970a.

SATOH, K. Mechanism of photoinactivation in photosynthetic systems. II. The occurrence and properties of two different types of photoinactivation. **Plant Cell Physiol.** 11, 29-38 1970b.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species , Oxidative Damage , and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions, 1-26, 2012.

SHAVRUKOV, Y. Salt stress or oceanica salt shock : which genes are we studying ? In *Posidonia cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning*, 64(1), 119–127, 2013.

SEJIMA, T.; TAKAGI, D.; FUKAYAMA, H.; MAKINO, A.; MIYAKE, C. Repetitive short-pulse light mainly inactivates photosystem i in sunflower leaves. **Plant and Cell Physiology**, 55(6), 1184–1193, 2014.

SONOIKE K, Terashima I Mechanism of photosystem-I photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. **Planta** 194:287–293, 1994.

SONOIKE K. Selective photoinhibition of photosystem I in isolated thylakoid membranes from cucumber and spinach. **Plant Cell Physiol** 36: 825–830, 1995.

SONOIKE, K.; KAMO, M.; HIHARA, Y.; HIYAMA, T.; ENAMI, I. The mechanism of the degradation of psaB gene product, one of the photosynthetic reaction center subunits of photosystem I, upon photoinhibition. **Photosynth Res** 53: 55–63, 1997.

SONOIKE, K. Photoinhibition of photosystem I. **Physiol. Plant.** 142: 56–64, 2011.

TAKAGI, D.; TAKUMI, S.; HASHIGUCHI, M.; SEJIMA, T.; MIYAKE, C. Superoxide and singlet oxygen produced within the thylakoid membranes both cause photosystem I photoinhibition. **Plant Physiology**. 2016a.



TAKAGI, D.; HASHIGUCHI, M.; SEJIMA, T.; MAKINO, A.; MIYAKE, C. Photorespiration provides the chance of cyclic electron flow to operate for the redox-regulation of P700 in photosynthetic electron transport system of sunflower leaves. **Photosynthesis Research**. 2016 b.

TAKAHASHI, S.; MURATA, N. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? **Trends in Plant Science**, 13(4), 178–82, 2008.

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**, 149(3), 1560–1567, 2009.

TERASHIMA, I.; FUNAYAMA, S.; SONOIKE, K. The site of photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. at low temperatures is photosystem I, not photosystem II. **Planta** 193:300–306, 1994.

TIKKANEN, M.; MEKALA, N. R.; ARO, E. Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. **BBA - Bioenergetics**, 1837(1), 210–215, 2014.

YAMORI, W.; SAKATA, N.; SUZUKI, Y.; SHIKANAI, T.; MAKINO, A. Cyclic electron flow around photosystem I via chloroplast NAD(P)H dehydrogenase (NDH) complex performs a significant physiological role during photosynthesis and plant growth at low temperature in rice. **The Plant Journal**, 68(6), 966–976, 2011.

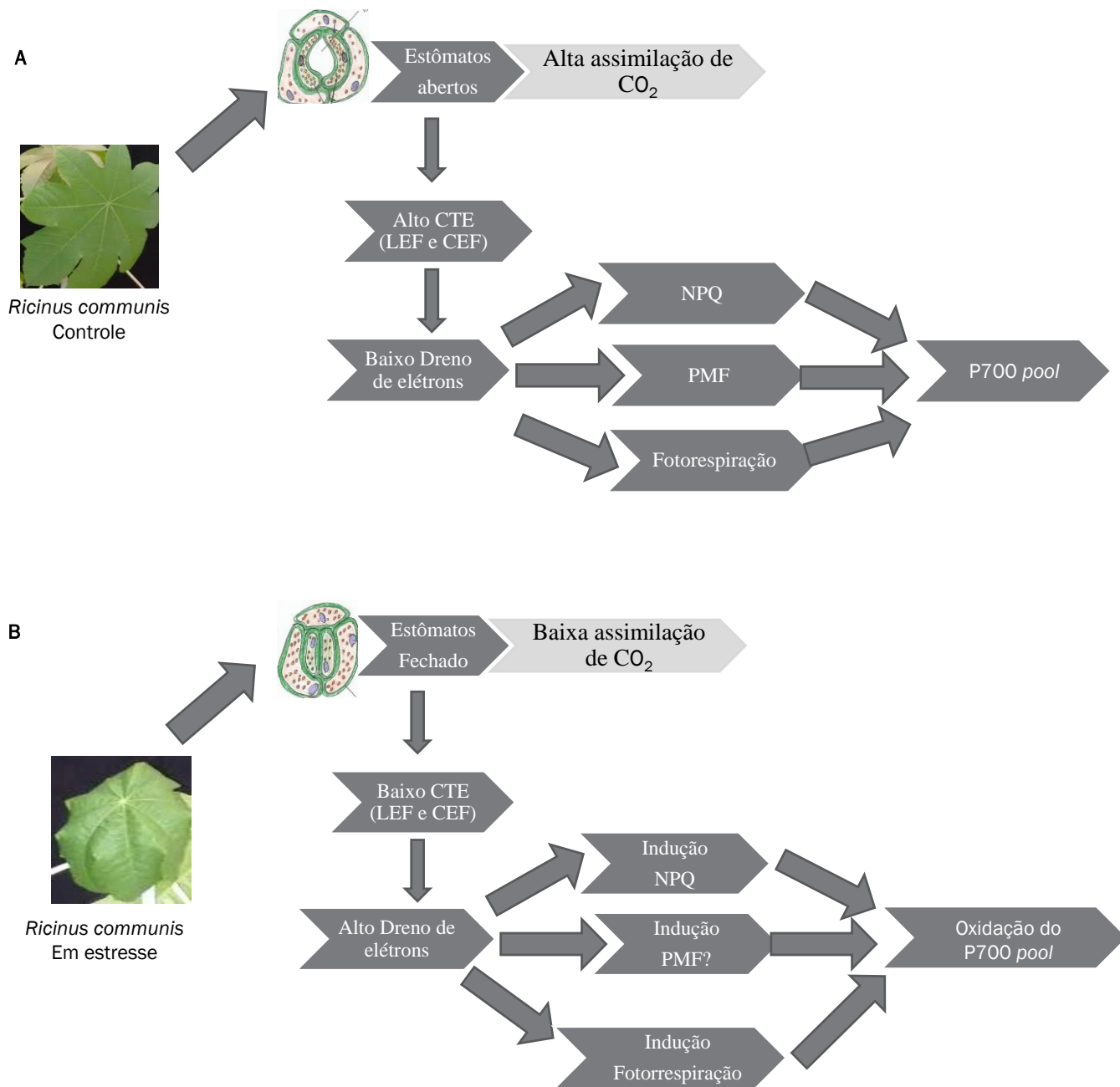
YAMORI, W.; MAKINO, A.; SHIKANAI, T. A physiological role of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis under fluctuating light in rice. **Nature Publishing Group**. 6:20147-55 2016.

ZHOU, M.; DIWU, Z.; PANCHUK-VOLOSHINA, N.; HAUGLAND, R. P. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Analytical biochemistry** 253, 162–8, 1997.

ZIVCAK, M.; KALAJI, H. M.; SHAO, H.-B.; OLSOVSKA, K.; BRESTIC, M. Photosynthetic proton and electron transport in wheat leaves under prolonged moderate drought stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, 137, 107–15, 2014.

ZIVCAK, M.; BRESTIC, M.; KUNDERLIKOVA, K.; SYTAR, O.; ALLAKHVERDIEV, I. Repetitive light pulse-induced photoinhibition of photosystem I severely affects CO<sub>2</sub> assimilation and photoprotection in wheat leaves. **Photosynthesis Research** 126:449–463, 2015.

**ANEXO**



**Anexo:** Esquema ilustrando mudanças promovidas pelo estresse abiótico em plantas de *Ricinus communis*. Em (A) as plantas estão em condições ótimas, como consequência há uma alta assimilação de  $\text{CO}_2$  o que se traduz em uma alta atividade da cadeia transportadora de elétrons (CTE). Como consequência os drenos alternativos de elétrons (NPQ e fotorrespiração) mantem-se em baixa atividade o que evita o aumento de pmf. Desse modo, o *pool* de P700 mantem-se em um estado estacionário. Em (B) o fechamento estomático limita a absorção de  $\text{CO}_2$  o que leva ao decréscimo de CTE. Os drenos alternativos foram induzidos o que permite supor que o PMF foi induzido. A oxidação do *pool* de P700 então poderia ser justificada pelo aumento no PMF.