

CARLOS ALBERTO VIEIRA DE SOUZA

**MUDANÇAS FOTO-OXIDATIVAS EM PLANTAS DE ARROZ COM
REDUZIDA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO SUBMETIDAS AO
ESTRESSE HIDRICO COMBINADO AO EXCESSO DE LUZ E CALOR**

Serra Talhada-PE
2016

CARLOS ALBERTO VIEIRA DE SOUZA

**MUDANÇAS FOTO-OXIDATIVAS EM PLANTAS DE ARROZ COM
REDUZIDA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO SUBMETIDAS AO
ESTRESSE HIDRICO COMBINADO AO EXCESSO DE LUZ E CALOR**

Dissertação apresentada a Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof^o DSc. Sérgio Luiz Ferreira da Silva

Co-orientador: Adriano do Nascimento Simões

Serra Talhada-PE
2016

CARLOS ALBERTO VIEIRA DE SOUZA

**MUDANÇAS FOTO-OXIDATIVAS EM PLANTAS DE ARROZ COM
REDUZIDA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO SUBMETIDAS AO
ESTRESSE HÍDRICO COMBINADO AO EXCESSO DE LUZ E CALOR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

APROVADO em ____/____/_____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sérgio Luiz Ferreira da Silva – UAST/UFRPE
Orientador

Prof. Dr. Juan Carlos Alvarez-Pizarro – UFCA
Examinador Externo

Prof. Dr. Adriano dos Nascimento Simões – UAST/UFRPE
Examinador Interno

Aos meus pais,
Alberto Vieira de Souza (in memorian) e Joana Seles de Souza Moura,
por todo amor, dedicação, incentivo e confiança em mim depositados.

A minha amada esposa,
Andriceia Arruda de Souza pelo amor, carinho, amizade e compreensão.

Aos meus irmãos,
José Jailson Vieira de Souza, Joana Darc Vieira de Souza, Joanaína Vieira de Souza
e minha sobrinha **Sheyla Samara de Souza Melo** pelo carinho e amizade.

Aos meus segundos pais,
Sogro, **Antônio Arruda da Silva** e sogra **Angelita de Souza e Silva**, verdadeiros pais
adotivos que Deus me presenteou e também aos meus cunhados,
Andrinea Arruda de Souza e José André de Souza e Silva verdadeiros irmãos.

Ao nosso grupo de pesquisa em **bioquímica da fotossíntese**, compostos pelos alunos de
Iniciação Científica
Maiany Alves Patriota, Daniel Lopes dos Santos, Adriana da Silva Nunes, Manuévely
Creuza da Silva e Mestrandos **Eugênio Silva Araújo Júnior, Tialla Laranjeira**
Amonrim e ao nosso Coordenador Professor DSc. **Sérgio Luiz Ferreira da Silva.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a DEUS, pela oportunidade a mim ofertada, pela aprendizagem e por me guiar em todo o meu caminho.

*Aos meus pais, **Alberto Vieira de Souza (in memorian) e Joana Seles de Souza Moura**, pelo amor, carinho, apoio, ensinamentos e dedicação em todos esses anos da minha vida.*

*A minha amada esposa, **Andriceia Arruda de Souza**, pelo amor, cuidado e compreensão.*

*Aos meus irmãos, **José Jailson Vieira de Souza, Joana Darc Vieira de Souza, Joanaína Vieira de Souza**, pela amizade e pelos incentivos dado nesta conquista. A minha sobrinha, **Sheylla Samara de Souza Melo**, alegria para mim.*

*Ao meu professor orientador **DSc. Sérgio Luiz Ferreira da Silva**, pela dedicação na orientação, ensinamentos transmitidos e pela grande contribuição a minha formação profissional. Ao meu co-orientador Professor **DSc. Adriano do Nascimento Simões** pelo apoio ao desenvolvimento da pesquisa.*

*Ao nosso grupo de pesquisa em **bioquímica da fotossíntese**, compostos pelos alunos de Iniciação Científica **Edson Luiz Dias Soares Junior, Maiany dos Santos, Daniel dos Santos Lopes, Adriana Nunes, Manuevely Creuza da Silva** e Mestrandos **Eugênio Silva Araújo Junior, Tialla Laranjeira Amonrim** e ao nosso Coordenador Professor **DSc. Sérgio Luiz Ferreira da Silva**.*

*A todos os meus colegas da Pós-Graduação da UFRPE-UAST, destacando-se, **Eugênio Silva Araújo Júnior, Tialla Laranjeira Amonrim, Sílvio Bezerra, Nathália Bandeira Diniz, Ervanis Adelino Bezerra** pela amizade e apoio.*

*À **Programa de Pós-Graduação em Produção vegetal** da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE-UAST), por possibilitar a conquista do título de mestre.*

A FACEPE pelo financiamento da bolsa.

A todos meus sinceros agradecimentos.

“Eu estou contigo e te guardarei em todo lugar aonde fores, e te reconduzirei a esta terra, porque não te deixarei enquanto não cumprir tudo o que te prometi.”

(Gênesis 28: 15)

Sumário

Lista de tabelas	ix
Lista de figuras	x
RESUMO	xv
ABSTRAT	xvi
CAPÍTULO I-(REVISÃO DE LITERATURA)	
METABOLISMO FOTO-OXIDATIVO EM PLANTAS EM RESPOSTA A ESTRESSES ABIÓTICOS	1
1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA (Estado da arte)	2
1.1-ESTRESSES ABIÓTICOS	2
1.1.1-Estresses hídrico.....	4
1.1.2-Estresse pelo excesso de luz.....	5
1.1.3-Estresse de temperatura elevadas	9
1.1.4-Combinação dos estresses.....	11
1.2-METABOLISMO FOTO-OXIDATIVO	16
1.2.1-Fotossíntese.....	16
1.2.2-Fotorrespiração e suas vias alternativas	18
1.2.3-Estresse oxidativo	23
1.2.3.1-Formação de EROs e danos	23
1.2.3.2-Proteção oxidativa.....	26
1.2.3.2.1-Enzimáticos.....	27
1.2.3.2.2-Não enzimáticos.....	28
1.3-O MODELO VEGETAL (<i>Oryza sativa</i> L.).....	31
2-JUSTIFICATIVA E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	33
3-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
4-HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	51
4.1-HIPÓTESE.....	51
4.2-OBJETIVOS	51
4.2.1-Objetivo geral.....	51
4.2.2-Objetivos específicos	51
5-ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	52
5.1-ESTUDOS REALIZADOS	52
CAPÍTULO II- ACLIMATAÇÃO FOTO-OXIDATIVA EM ARROZ COM REDUZIDA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO EXPOSTAS AOS ESTRESSES ISOLADOS E COMBINADOS DE SECA E EXCESSO DE CALOR	
1-INTRODUÇÃO.....	54

2-MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1-MATERIAL VEGETAL E APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.....	56
2.2-AVALIAÇÕES REALIZADAS	60
2.2.1-Conteúdo relativo de água (CRA).....	60
2.2.2-Dano de membrana pelo extravasamento de eletrólito	60
2.2.3-Conteúdo de clorofilas	60
2.3-DETERMINAÇÕES PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	61
2.3.1-Extração de proteínas	61
2.3.2-Atividades das enzimas	61
2.4-MEDIDAS DE FOTOSSÍNTESE	63
2.4.1-Trocas gasosas e curvas de resposta ao CO ₂	63
2.4.2-Fluorescência da clorofila	63
2.4.3-Estimativa da fotorrespiração.....	64
2.5-INDICADORES DE DANOS OXIDATIVOS	64
2.5.1-Conteúdo de H ₂ O ₂	64
2.5.2-Peroxidação de lipídios (TBARS).....	65
2.6-METABÓLITOS FOTORRESPIRATÓRIOS	65
2.6.1-Conteúdo de glioxilato	65
2.6.2-Conteúdos de glicina e serina.....	66
2.7-CONTEÚDOS DE ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS	66
2.7.1-Conteúdos de glutathione reduzida (GSH)	66
2.7.2-Conteúdos de ascorbato reduzido (ASA).....	67
2.8-WESTERN BLOTING PARA RUBISCO	67
2.9-DELINEAMENTO ESTATÍSTICO E ANÁLISE DOS DADOS.....	67
3-RESULTADOS	68
3.1-O ESTRESSE HÍDRICO ASSOCIADO AO CALOR AFETA INTEGRIDADE CELULAR E INDUZ A OXIDAÇÃO DE CLOROFILAS, RESPOSTAS NÃO DEPENDENTE DA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO	68
3.2-REDUÇÃO DA FOTOSSÍNTESE EM RESPOSTAS AO ESTRESSE HÍDRICO É INTENSIFICADA PELO EXCESSO DE CALOR E ESTÁ ASSOCIADA AO FECHAMENTO ESTOMÁTICO EM PLANTAS DE ARROZ.....	70
3.3-MUDANÇAS DA ATIVIDADE FOTOQUÍMICA EM PLANTAS DE ARROZ EXPOSTAS AOS ESTRESSES DE SECA E CALOR QUANDO SUBMETIDAS À REDUÇÃO PARCIAL DE ATIVIDADE DA GO.....	75

3.4-MODULAÇÃO DA ENZIMA OXIDASE (GO) PELO INIBIDOR A-HIDROXISULFONATO E PELOS ESTRESSES DE SECA E CALOR NÃO ESTÁ ASSOCIADA A MUDANÇAS EM METABOLITOS ASSOCIADOS	78
3.5-ATIVIDADE DE ENZIMAS OXIDATIVAS (SOD, CAT E APX) E CONTEÚDO DE ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS (ASA E GSH) EM PLANTAS DE ARROZ COM REDUZIDA DE ATIVIDADE DA GO SOB ESTRESSES DE SECA E CALOR	81
3.6-MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA RUBISCO EM RESPOSTAS AOS ESTRESSES DE SECA E CALOR EM PLANTAS DE ARROZ COM REDUZIDA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO.....	85
4-DISCUSSÃO.....	87
4.1-MUDANÇAS NA UMIDADE, DANO CELULAR E ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA EM REPOSTAS AOS ESTRESSES ISOLADOS E COMBINADOS DE SECA E CALOR	87
4.2-OXIDASE GLICOLATO, MUDANÇAS EM METABÓLITOS ASSOCIADOS E MECANISMOS DE PROTEÇÃO OXIDATIVA	89
4.3-EXPRESSÃO DA RUBISCO EM RESPOSTAS A ESTRESSES ABIÓTICOS E SUA RELAÇÃO COM A FOTORRESPIRAÇÃO	91
5-CONCLUSÃO.....	93
6-REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	94
CAPITULO III-FOTOSSÍNTESE E MUDANÇAS OXIDATIVAS EM PLANTAS DE ARROZ COM REDUZIDA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO EXPOSTAS AOS ESTRESSES ISOLADOS E COMBINADOS DE SECA E EXCESSO DE LUZ....	104
1-INTRODUÇÃO.....	105
2-MATERIAL E MÉTODOS	108
2.1-MATERIAL VEGETAL E APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.....	108
2.2-AVALIAÇÕES REALIZADAS	109
2.2.1-Conteúdo relativo de água (CRA).....	109
2.2.2-Dano de membrana pelo extravasamento de eletrólito	110
2.2.3-Conteúdo de clorofilas	110
2.3-DETERMINAÇÕES PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	111
2.3.1-Extração de proteínas	111
2.3.2- Atividades das enzimas	111
2.4-MEDIDAS DE FOTOSSÍNTESE	112
2.4.1-Trocas gasosas e curvas de resposta ao CO ₂	112
2.4.2-Fluorescência da clorofila	113
2.4.3-Estimativa da fotorrespiração.....	114
2.5-INDICADORES DE DANOS OXIDATIVOS	114
2.5.1-Conteúdo de H ₂ O ₂	114
2.5.2-Peroxidação de lipídios (TBARS).....	114

2.6-METABÓLITOS FOTORRESPIRATÓRIOS	115
2.6.1-Conteúdo de glioxilato	115
2.6.2-Conteúdos de glicina e serina.....	115
2.7-CONTEÚDOS DE ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS	116
2.7.1-Conteúdos de glutathione reduzida (GSH)	116
2.7.2-Conteúdos de ascorbato reduzido (ASA).....	116
2.8-WESTERN BLOTING PARA RUBISCO	116
2.9-DELINEAMENTO ESTATÍSTICO E ANÁLISE DOS DADOS.....	117
3-RESULTADOS	117
3.1-STATUS HÍDRICO E DANO CELULAR EM PLANTAS DE ARROZ SOB ESTRESSE HÍDRICO ASSOCIADO À EXCESSO DE LUZ COM REDUZIDA DA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO.....	117
3.2-REDUÇÃO DE ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO ESTÁ ASSOCIADA À MAIOR FOTOSSÍNTESE EM RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO ASSOCIADO À EXCESSO DE LUZ EM PLANTAS DE ARROZ	120
3.3-MUDANÇAS DA ATIVIDADE FOTOQUÍMICA EM PLANTAS DE ARROZ EXPOSTAS AOS ESTRESSES DE SECA E EXCESSO DE LUZ QUANDO SUBMETIDAS À REDUÇÃO DA ATIVIDADE DA GO	124
3.4-MODULAÇÃO DA ENZIMA OXIDASE DO GLICOLATO (GO) PELO INIBIDOR A-HIDROXISULFONATO E PELOS ESTRESSES DE SECA E EXCESSO DE LUZ E MUDANÇAS EM METABOLITOS ASSOCIADOS.....	127
3.5-ATIVIDADE DE ENZIMAS OXIDATIVAS (SOD, CAT E APX) E CONTEÚDO DE ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS (ASA E GSH) EM PLANTAS DE ARROZ COM REDUZIDA DE ATIVIDADE DA GO SOB ESTRESSES DE SECA E LUMINOSIDADE ELEVADA	131
3.6-MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA RUBISCO EM RESPOSTAS AOS ESTRESSES DE SECA E EXCESSO DE LUZ EM PLANTAS DE ARROZ COM REDUZIDA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO	135
4-DISCUSSÃO.....	137
4.1-MUDANÇAS DO STATUS HÍDRICO E DANOS CELULARES EM REPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO ASSOCIADO À LUMINOSIDADE ELEVADA	137
4.2-OXIDASE DO GLICOLATO, MUDANÇAS EM METABÓLITOS ASSOCIADOS E MECANISMOS DE PROTEÇÃO OXIDATIVA	139
4.3-EXPRESSÃO DA RUBISCO EM RESPOSTAS A ESTRESSES ABIÓTICOS E SUA RELAÇÃO COM A FOTORRESPIRAÇÃO	142
5-CONCLUSÃO	144
6-REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	144
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	153

Lista de tabelas

Tabela 1. Redução de atividade da enzima glicolato oxidase em segmentos de folhas de arroz após 8 horas de incubação na presença de concentrações crescentes do inibidor da GO (HPMS) em câmara de crescimento sob condições controladas de temperatura (25 °C) e luminosidade ($200 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A partir desse ensaio, foi selecionada a concentração para aplicação nos experimentos com plantas que correspondeu a uma redução média de 50% da atividade da GO *in vivo*. 59

Tabela 2. Parâmetros associados com a eficiência fotossintética estimados a partir das curvas P_N -Ci em plantas de arroz sob os efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e excesso de calor, submetidas ao tratamento com inibidor para a oxidase do glicolato (α -hidroxissulfonato-HPMS). 74

Lista de figuras

CAPÍTULO-I

Figura 1. Representação esquemática da canalização do fluxo de energia e nutrientes para processo de crescimento e defesa vegetal em plantas crescendo sob condições adequadas ou expostas a fatores ambientais adversos. Sob condições de estresse, nutrientes e energia são redirecionados da produção de biomassa para processos de defesa. Além disso, a reprodução é acelerada sob condições ambientais adversas (adaptado de PRASCH e SONNEWALD, 2015)..... 3

Figura 2. Produção de oxigênio singlete (1O_2) e radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) na membrana dos tilacóides em cloroplastos. Setas abertas representam a fotoexcitação dos centros de reação e o fluxo dos elétrons gerados que são utilizados para assimilação de CO_2 . Setas escuras representam a intensidade de fótons que excedem a capacidade de transporte de fluxo de elétrons para assimilação de CO_2 gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). Sistemas de eliminação de EROs como dismutase do superóxido (CuZn-SOD) e peroxidase do ascorbato (APX) e antioxidantes como ascorbato (ASA) são importantes para manter a homeostase celular e proteção oxidativa (adaptado de ASADA, 2006). 7

Figura 3. Matriz representativa de possibilidades de interações positivas e negativas para diferentes tipos de estresses abióticos. Diferentes combinações de potenciais estresses ambientais que podem afetar as culturas no campo são apresentadas na forma de uma matriz. A Matrix é codificada por cores para indicar combinações de estresses que foram estudados com uma gama de culturas e seu efeito no crescimento das plantas e produtividade (adaptado de SUZUKI et al., 2014). 14

Figura 4. As principais características do metabolismo fotorrespiratório. O ciclo tem início com a oxigenação da enzima Rubisco que produz na reação uma molécula de 2-fosfoglicolato (1). Em seguida, essa molécula produzida na reação sofre uma desfosforilação no cloroplasto por uma fosfatase específica (PGP) e é transportada por um carreador para o peroxissomo na forma de 2-glicolato (2). Esse glicolato sofre uma oxidação a glioxilato na mesma organela (3.a) pela principal enzima deste ciclo, a glicolato oxidase (GO). Neste passo são produzidas grandes quantidades de H_2O_2 como subprodutos desta oxidação. A catalase, uma importante enzima oxidativa, contribui para manter o balanço redox no sistema eliminando o H_2O_2 em O_2 e H_2O (3.b). O glioxilato posteriormente é convertido ao aminoácido glicina pela ação tanto da serina: glioxilato aminotransferase (GGT) ou pela glutamato: glioxilato aminotransferase, ambas transferases (SGT) (5). Na mitocôndria, a glicina descarboxilase (GDC) combina duas moléculas de glicina a uma molécula de serina (6). Neste passo, são liberados CO_2 e amônia (NH_3). Nos peroxissomos, a serina é convertida a hidroxipiruvato pela (SGAT), que é reduzida a glicerato pela hidroxipiruvato redutase (HPR). O glicerato fosforilado por uma quinase no cloroplasto resulta em 3PGA sendo incorporado ao ciclo de Calvin (adaptado de WINGLER, et al., 2000; BAUWE et al., 2010). 20

Figura 5. Principais mecanismos geradores das diferentes espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos (adaptado de GILL e TUTEJA, 2010)..... 23

Figura 6. O ciclo de Ascorbato-Glutationa atua na desintoxicação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em H_2O através da ação da peroxidase de ascorbato (APX) (adaptado de GEST et al., 2013). 30

CAPÍTULO-II

Figura 1. Plantas de arroz crescendo em condições naturais de casa de vegetação aos 60 dias após o plantio das sementes.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 2. Ensaio de incubação com segmentos de folhas de arroz em meio líquido com concentrações crescentes do inibidor da oxidase do glicolato (GO), variando de 0 à 10 mM (A) e de 0 à 25 mM (B), e câmara de crescimento com condições controladas utilizada para acondicionar as placas contendo os segmentos durante o ensaio (C). 58

Figura 3. Mudanças no conteúdo relativo de água (A) e dano de membrana (B) em folhas de plantas de arroz expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e excesso de calor, quando submetidas à inibição parcial de atividade da enzima oxidase do glicolato após o tratamento com inibidor específico para essa enzima α -hidroxissulfonato (HPMS). Os valores representam médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 4. Mudanças nos conteúdos de clorofilas totais (A), clorofilas *a* (B) e clorofilas *b* (C) e relação clorofilas *a/b* (D) em folhas de plantas de arroz submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e excesso de calor, submetidas ao tratamento com inibidor para a enzima oxidase do glicolato (α -hidroxissulfonato-HPMS). Os valores representam médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 5. Assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (B), concentração intercelular de CO_2 (C), transpiração (D), eficiência instantânea de carboxilação (E) e eficiência no uso de água (F) em plantas de arroz (*Oryza sativa*) submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 6. Curvas P_N/C_i em plantas de arroz submetidas ao estresse hídrico associado a temperatura baixa (A) e elevada (B), quando submetidas ao tratamento com inibidor para a atividade da enzima oxidase do glicolato (α -hidroxissulfonato-HPMS). Os valores são médias de três repetições \pm desvio padrão. Durante as leituras a intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) foi mantida em $1500 \mu\text{mol. m}^{-2}\text{s}^{-1}$.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 7. Eficiência quântica máxima (A) e efetiva do PSII (B), quenching fotoquímico (C), quenching não fotoquímico (D), taxa aparente de transporte de elétrons (E) e excesso de elétrons para a fotossíntese dada pela razão ETR/P_N (E) em plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 8. Mudanças da atividade da enzima oxidase do glicolato GO (A) e nos conteúdos de glioxilato (B), peróxido de hidrogênio (C) e na peroxidação de lipídica (D) em plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 9. Conteúdo dos aminoácidos glicina (A) e serina (B) em plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 10. Atividade das enzimas dismutase do superóxido SOD (A), peroxidase do ascorbato APX (B) e catalase CAT (C) em plantas de arroz submetidas aos estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 11. Conteúdo de ascorbato (A), e glutathiona reduzidos (B) em plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 12. Mudanças na expressão da Rubisco avaliada com base na quantidade relativa da Rubisco (A) e western blotting (B), em folhas de plantas de arroz na ausência ou presença da inibição parcial da enzima glicolato oxidase, em respostas aos estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor. A sequência dos poços: 1 e 5 – Irrigados; 2 e 6 - Irrigados + HPMS; 3 e 7 – Seca; 4 e 8 - Seca +HPMS. Foram aplicados 5 μ g de proteínas em cada poço e a detecção realizadas por meio de anticorpo específico para a subunidade maior da Rubisco (Referência do anticorpo: GW23153/Sigma). Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não

diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$). **Erro! Indicador não definido.**

CAPÍTULO-III

Figura 1. Plantas de arroz crescendo em condições naturais de casa de vegetação aos 60 dias após o plantio das sementes. 108

Figura 2. Mudanças no conteúdo relativo de água (A) e dano de membrana (B) em folhas de plantas de arroz expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e excesso de luz, quando submetidas à inibição parcial de atividade da enzima oxidase do glicolato após o tratamento com inibidor específico para essa enzima α -hidroxissulfonato (HPMS). Os valores representam médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P < 0,05$). 118

Figura 3. Mudanças nos conteúdos de clorofilas totais (A), clorofilas *a* (B) e clorofilas *b* (C) e relação clorofilas *a/b* (D) em folhas de plantas de arroz submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e excesso de luz, submetidas ao tratamento com inibidor para a enzima oxidase do glicolato (α -hidroxissulfonato-HPMS). Os valores representam médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P < 0,05$). . 120

Figura 4. Assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (B), concentração intercelular de CO_2 (C), transpiração (D), eficiência instantânea de carboxilação (E) e eficiência no uso de água (F) em plantas de arroz submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e excesso de luz, submetidas ao tratamento com inibidor específico para a enzima oxidase do glicolato (α -hidroxissulfonato-HPMS). Os valores representam médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P < 0,05$). 123

Figura 5. Curvas P_N/C_i em plantas de arroz expostas ao estresse de seca associado a baixa (A) e elevada (B) luminosidade por três dias, quando submetidas ao tratamento com inibidor para a atividade da enzima oxidase do glicolato (α -hidroxissulfonato-HPMS). Os valores são médias de 3 repetições \pm desvio padrão. Baixa luminosidade ($300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e elevada ($1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Durante as leituras a intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) foi mantida em $1.500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 124

Figura 6. Eficiência quântica máxima (A) e efetiva do PSII (B), quenching fotoquímico (C), quenching não fotoquímico (D), taxa aparente de transporte de elétrons (E) e excesso de elétrons para a fotossíntese, dada pela razão ETR/P_N (F) em plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de luz. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P < 0,05$). . 126

Figura 7. Mudanças da atividade da enzima oxidase do glicolato GO (A) e dos conteúdos de glioxilato (B) e peróxido de hidrogênio(C) e peroxidação de lipídios (D) em plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de luz. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P<0,05$). 129

Figura 8. Conteúdo dos aminoácidos glicina (A) e serina (B) em plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de luz. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P<0,05$). . 131

Figura 9. Atividade das enzimas dismutase do superóxido SOD (A), catalase (B) e peroxidase do ascorbato (D) em plantas de arroz submetidas aos estresses isolados e combinados de seca e excesso de luz, na ausência e presença de inibição da enzima oxidase do glicolato. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P<0,05$). 133

Figura 10. Mudanças nos conteúdos de ascorbato (A) e glutathione reduzidos (B) em folhas de plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de luz, na ausência e presença de inibição da enzima oxidase do glicolato. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P<0,05$). 135

Figura 11. Mudanças na expressão da Rubisco avaliada com base na quantidade relativa da Rubisco (A) e western blotting (B), em folhas de plantas de arroz na ausência ou presença da inibição parcial da enzima glicolato oxidase, em respostas aos estresses isolados e combinados de seca e de excesso de luz. A sequência dos poços: 1 e 5 - Irrigados; 2 e 6 - Irrigados + HPMS; 3 e 7 - Seca; 4 e 8 - Seca +HPMS. Foram aplicados 5 μ g de proteínas em cada poço e a detecção realizadas por meio de anticorpo específico para a subunidade maior da Rubisco (Ref. do anticorpo: GW23153/Sigma). Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P<0,05$). 136

MUDANÇAS FOTO-OXIDATIVAS EM PLANTAS DE ARROZ COM REDUZIDA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO COMBINADO AO EXCESSO DE LUZ E CALOR

Autor: Carlos Alberto Vieira de Souza
Orientador: Sérgio Luiz Ferreira da Silva

RESUMO

No presente estudo foi caracterizado o papel da enzima oxidase do glicolato (GO) na modulação da fotossíntese e na geração de danos oxidativos em plantas de arroz, expostas aos efeitos dos estresses isolados e combinados de seca ao excesso luz e calor. As sementes de arroz (*Oryza sativa*), cv. Nipponbare, foram germinadas em vermiculita em casa de vegetação e as plantas, com 60 dias de idade, foram submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca, excesso de luz e calor, em câmara de crescimento. Nessas condições, as plantas foram submetidas ao tratamento para inibição parcial da atividade da enzima oxidase do glicolato pela aplicação de inibidor específico (α -hidroxisulfonato). Os resultados mostram que nas plantas submetidas ao estresse hídrico a redução da fotossíntese (P_N) foi devido a limitações estomáticas, menor condutância estomática (g_s) e transpiração (E), e metabólicas direta, restrições para a eficiência fotoquímica e carboxilação instantânea (P_N/C_i). Por outro lado, nas plantas expostas ao calor ocorreu restrição fotossintética associada a parâmetros estomáticos (g_s e E) e fotoquímicos ($\Delta F/F_m'$, qP e ETR). O estresse hídrico e a luminosidade elevada causaram redução no conteúdo de clorofilas, especialmente clorofila *b*, distúrbio não observado nas plantas submetidas a temperaturas elevadas (42°C). Os dados mostram que sob condição de seca, calor e excesso de luz, a menor atividade da GO não reduz a fotorrespiração (Pr) e não possui relação direta como os conteúdos de glioxilato, glicina e serina. As plantas submetidas à combinação de seca e calor apresentaram maior restrição estomática, comparadas àquelas expostas apenas a seca. Esse resultado indica que a seca combinado com o calor pode levar a maior limitação da dissipação térmica, via fluxo transpiratório, que o estresse hídrico. Os resultados sugerem uma interação negativa destes fatores, que reduziu a fotossíntese por intensificar a restrição estomática (g_s e E) e aumentar a atividade fotorrespiração (Pr) mesmo com redução da atividade da GO. Essa combinação também limitou proteção oxidativa conferida pelo sistema SOD-CAT-APX e ASA, que resultou em aumento na peroxidação de lipídios (TBARS) e foi associado à acumulação de H_2O_2 gerado por distúrbios fotossintéticos, aparentemente mais importante para induzir danos que a fotorrespiração. Por outro lado, quando o estresse hídrico foi combinado com alta luminosidade, a redução da atividade da GO favoreceu P_N e reduziu os danos oxidativos indicados pelo dano de membrana (DM) e peroxidação de lipídios (TBARS). No geral, os resultados mostram que a menor atividade da GO nas plantas expostas a combinação de seca e calor resulta em modulações distintas em relação aquelas sob seca e luz elevada. A redução de atividade da GO levou a uma melhor P_N em repostas a combinação de seca com luz elevada se comparado a seca com o calor. Por fim, a redução de atividade da GO não apresentou relação direta com os conteúdos de metabólitos da via fotorrespiratória, além de sugerir que essa via não foi a principal geradora de danos oxidativos nas plantas submetidas aos estresses aqui avaliados.

Palavras-chave: Estresses abióticos, proteção oxidativa, eficiência fotossintética.

**CHANGES PHOTO-OXIDATIVE IN RICE PLANTS WITH REDUCED
ACTIVITY OF GLYCOLATE OXIDASE SUBJECTED TO DROUGHT
COMBINED TO EXCESS HEAT AND LIGHT**

Author: Carlos Alberto Vieira de Souza

Adviser: Prof. Dr. Sérgio Luiz Ferreira da Silva

ABSTRACT

In the present study, was characterized the role of the glycolate oxidase (GO) enzyme in modulation of photosynthesis and in generation of oxidative damages in rice plants exposed to the isolate effects of drought and combined to light excess and heat. Rice seeds (*Oryza sativa*), cv Nippombare, were germinated in vermiculite under greenhouse conditions. Then, 60-days-old plants were exposure to the effects isolated and combined of drought, light excess and heat under controlled conditions in a growth chamber. In these conditions, plants were subject to treatment for partial inhibition of GO enzyme by spray with specific inhibitor (α -hidroxisulfonato). The results show that in the rice plants subjected to drought stress the reduction of net photosynthesis (P_N) was due to stomatal limitation, lower stomatal conductance (g_s) and transpiration (E), as well as direct metabolic, as indicated by restriction of efficiency instantaneous carboxylation (P_N/C_i ratio). On the other hand, in plants exposed to heat the photosynthetic restriction occurred associated with stomatal parameters (g_s and E) and photochemical ($\Delta F/F_m'$, qP e ETR). Drought and light excess caused a reduction in the content of chlorophyll, mainly chlorophyll *b*, response did not observed in plants subjected to high temperatures ($42^\circ C$). Data show that under conditions of drought, excessive heat and light, the lower GO activity does not reduce photorespiration (Pr) and has no direct relation with contents of glyoxylate, glycine and serine. Plants subjected to a combination of drought and heat had higher stomatal restriction, if compared to those exposed only to dry. Reduction of GO activity did not stimulate photosynthesis, however modulates the H_2O_2 and TBARS content. The enzymatic oxidative protective mechanisms composed of the SOD-CAT-APX system, not enzyme GSH-ASA is responsible for maintaining the redox homeostasis. However, plants when subjected to a combination of dry and elevated temperature showed greater stomatal restriction compared to those exposed only to dry. This result indicates that water stress combined with heat can lead to further limit heat dissipation via the transpiration stream, the water stress. Furthermore, the results suggest a negative interaction of these factors reduced photosynthesis by step stomatal constraint (and E g_s) and increase photorespiration (Pr) even with reduction of the GO activity. However, plants when subjected to a combination of dry and elevated temperature showed greater stomatal restriction compared to those exposed only to dry. This result indicates that water stress combined with heat can lead to further limit heat dissipation via the transpiration stream, the water stress. Furthermore, the results suggest a negative interaction of these factors reduced photosynthesis by step stomatal constraint (and E g_s) and increase photorespiration (Pr) even with reduction of the GO activity. On the other hand, when the water stress was combined with high brightness, reduction of the GO activity favored a higher photosynthesis (P_N) and reduced oxidative damage indicated by membrane damage (DM) and lipid peroxidation (TBARS). The reduced GO activity led to a better P_N in plants under combination of drought with high light, if compared to dry with heat. Finally, the reduction of GO activity showed no direct relationship with the metabolites

content of photorespiration and suggests that this pathway was not the main generator of oxidative damage in plants subjected to stress here evaluated.

Keywords: Abiotic stress, oxidative protection, photosynthetic efficiency.

**CAPÍTULO I-(REVISÃO DE LITERATURA)
METABOLISMO FOTO-OXIDATIVO EM PLANTAS EM RESPOSTA A
ESTRESSES ABIÓTICOS**

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA (Estado da arte)

1.1-ESTRESSES ABIÓTICOS

As plantas estão sujeitas a inúmeras condições ambientais desfavoráveis que dificultam seu pleno crescimento e desenvolvimento (ASHRAF e FOOLAD, 2007; STORME e GEELLEN, 2014). Dentre estas condições ambientais desfavoráveis, os estresses abióticos como: calor, frio, seca, salinidade, luminosidade elevada têm um enorme impacto sobre agricultura mundial causando intensas perdas (MITTLER, 2006). Assim, a consciência do crescente impacto dos estresses ambientais, tem levado a todo o mundo despende esforços na melhoria da produção agrícola em tais condições (WANG e FREY, 2011), principalmente em um cenário de mudanças climáticas (MITTLER e BLUMWALD, 2010) e aumento das populações, requerendo cada vez mais das culturas agrícolas grandes rendimentos (RAINES, 2011; ZISKA et al., 2012).

Estratégias propostas para enfrentar estes desafios incluem melhoria da gestão agrônômica e a utilização de genótipos adaptados para estes ambientes. Por exemplo, pesquisas de melhoramento genético de plantas já foram iniciadas para adaptar novas variedades importantes de cereais, como por exemplo, o milho a seca (CASTIGLIONI et al., 2008). O foco destas pesquisas agrônômicas e seus esforços sem dúvida tem sido atenuar as grandes perdas de rendimento ocasionadas por esses fatores (MITTLER, 2006; WANG e FREY, 2011). Algumas estimativas do percentual destas perdas podem chegar a valores maiores que 50% para as principais plantas cultivadas (WANG et al., 2004). Para se ter uma idéia da dimensão real, um relatório da FAO em 2007, afirmou que apenas 3,5% da área terrestre do mundo não são afetados por algum fator ambiental (CRAMER et al., 2011).

A compreensão das respostas dos vegetais a estas condições são relevantes e pertinentes, motivo que tem levado o aumento do número de publicações relacionadas de forma exponencial nos últimos anos (CRAMER et al., 2011). As plantas são organismos complexos e a exposição a estresses ambientais conduz a numerosas alterações fisiológicas, provocando uma grande variedade de respostas. Por exemplo, mudanças na fotossíntese e nas trocas gasosas (SILVA et al., 2010), efeito na translocação de nutrientes (DEMIDCHIK, 2015), reações antioxidantes (SOUSA et al., 2015), morte celular programada (MITTLER, 2002), alterações a nível de expressão de genes (SHAO et al., 2008) e atividades enzimáticas (FERREIRA-SILVA et al., 2012).

Todos estes efeitos levam a mudanças na taxa de crescimento e por fim na produtividade das plantas (SHAO et al., 2008). Para se ter uma idéia, no crescimento, praticamente toda matéria orgânica de uma planta acumulada tem origem no processo fotossintético de fixação de carbono atmosférico, o que representa ao redor de 95% de toda sua fitomassa seca (MACHADO et al., 2005). Com desequilíbrios induzidos por estresses abióticos citados anteriormente, as plantas direcionam sua energia e nutrientes para reprodução e mecanismos de defesa, com isso reduzindo sua taxa de crescimento resultando em menor produção da biomassa (PRASCH e SONNEWALD, 2015). Esses processos estão ilustrados na figura abaixo (Figura 1).

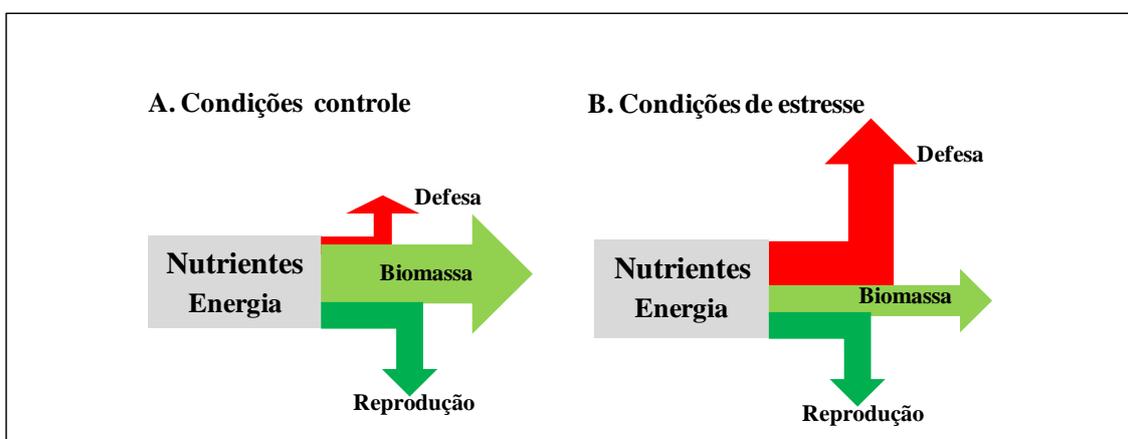


Figura 1. Representação esquemática da canalização do fluxo de energia e nutrientes para processo de crescimento e defesa vegetal em plantas crescendo sob condições adequadas ou expostas a fatores ambientais adversos. Sob condições de estresse, nutrientes e energia são redirecionados da produção de biomassa para processos de defesa. Além disso, a reprodução é acelerada sob condições ambientais adversas (adaptado de PRASCH e SONNEWALD, 2015).

A redução de biomassa, em virtude do efeito destes estresses, ocorre principalmente em plantas de metabolismo C3, que representam aproximadamente 85% de todas as espécies de plantas superiores (YAMORI et al., 2014), no qual as maiorias das espécies cultiváveis e de importância econômica se enquadram. O motivo principal desta redução é devido o aumento da atividade fotorrespiratória, quando as plantas C3 são expostas a tais condições de estresses. O processo fotorrespiratório compete com a fotossíntese promovendo uma perda em torno de 25% no carbono fixado pela reação de oxigenase da Rubisco (RAINES, 2011; VOSS et al., 2013; LU et al., 2014).

Assim, o tema central das pesquisas visando à melhoria da tolerância das culturas aos estresses abióticos tem como principal desafio a compreensão de como as plantas se

aclimatam a tais condições, visando usar esse conhecimento para desenvolver culturas com maior tolerância a esses fatores ambientais adversos. Além disto, faz necessário também o desenvolvimento de novas metodologias como, por exemplo, entender sobre redes metabólicas e seu papel na tolerância ao estresse (MITTLER e BLUMWALD, 2010).

1.1.1-Estresses hídrico

A seca é um dos estresses abióticos mais comuns (YUAN et al., 2016). Esse fator ambiental associado com a temperatura elevada ou excesso de radiação representa uma condição restritiva para sobrevivência e rendimento das culturas. Os efeitos adversos desses fatores abióticos (seca associada ao calor e ao excesso de luz) afetam processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares essenciais (DELUC et al., 2009) causando distúrbios que resultam efetivamente em sérios problemas para a agricultura, limitando o crescimento, a produtividade e qualidade das culturas (WANG e FREI, 2011; YUAN et al., 2016).

As respostas vegetais para resistir e/ou tolerar à restrição hídrica são relativamente complexas, envolvendo mudanças adaptativas e/ou efeitos deletérios. Por exemplo, uma característica adaptativa importante que normalmente acontece é a redução da área foliar pela maioria das plantas (PEREYRA-IRUJO et al., 2008). Para lidar com o déficit hídrico as plantas fecham os estômatos para manter o turgor celular (PEREYRA-IRUJO et al., 2008; PRASCH e SONNEWALD, 2015). Uma consequência do fechamento estomático, sob condições de seca, é a diminuição da condutância estomática, afetando processos de trocas gasosas e da eficiência de carboxilação, ocasionando uma menor assimilação líquida de CO₂ (SILVA et al., 2010). A limitação da fixação de CO₂ sob condições de estresses resulta na diminuição de redução de carbono pelo Ciclo de Calvin e no aumento da relação NADPH/NADP⁺ no estroma dos cloroplastos, reduzindo a concentração de NADP⁺ que é o principal acceptor de elétrons fotossintéticos.

Nessas condições, ocorre rapidamente uma sobrecarga de energia na cadeia transportadora de elétrons (CTE) do cloroplasto e o excesso de elétrons pode ser desviado para redução parcial do O₂ (FOYER e NOCTOR, 2000). Em estado de super-redução do fotossistema I (PSI) ocorre a foto-redução do O₂, podendo produzir o radical superóxido (O₂^{•-}), pela reação de Mehler, que ativa uma reação em cadeia e produz mais

espécies reativas do oxigênio (EROs) nos cloroplastos. Essa intensa produção pode levar a perda da homeostase metabólica, causando conseqüentemente o acúmulo destas EROs, que são formas parcialmente reduzidas do oxigênio molecular e podem ser extremamente prejudiciais ao funcionamento celular quando produzidas em excesso.

Apesar de alguns EROs atuar também como uma importante molécula sinalizadora em respostas a estresses, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FOYER e NOCTOR, 2003; DEMIDCHIK, 2015) o acúmulo excessivo dessas moléculas (EROs) nas células e tecidos, tais como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e inclusive o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxilas (OH^{\bullet}), é amplamente relatado como um dos principais distúrbios metabólicos responsáveis por danos significativos às plantas em condições ambientais adversas (MITTLER, 2002).

Esforços têm sido tomados para melhorar a tolerância das culturas a estes efeitos negativos no metabolismo vegetal que restringem o rendimento das culturas. Por exemplo, a melhoria do manejo agrônômico na irrigação (CIFRE et al., 2005) e o melhoramento genético para vários cereais com o aumento da capacidade de adaptação a seca (ARAUS et al., 2008). O melhoramento genético tem papel crucial no desenvolvimento de plantas com o aumento da capacidade de sobrevivência e crescimento durante o estresse hídrico, e o parâmetro de eficiência do uso da água (EUA) é um caráter de seleção importante a ser considerado (OSAKABE, 2014).

Assim, a engenharia genética (abordagem transgênica) em menor espaço de tempo, tem potencial para tornar uma característica desejada que confere tolerância as culturas de importância econômica possível (ASHRAF, 2010). No entanto, para ter êxito nestes programas, é essencial compreender os vários mecanismos reguladores que controlam a produtividade, e melhorar as respostas adaptativas ao estresse em diferentes espécies de plantas. Como por exemplo, respostas estomáticas, ativação de vias de sinalização e respostas protetoras contra danos na fotossíntese (OSAKABE et al., 2014).

1.1.2-Estresse pelo excesso de luz

A luz tem um papel primordial em organismos fotossintetizantes, principalmente para as plantas. Elas absorvem a luz solar para impulsionar as reações fotoquímicas da fotossíntese. A assimilação de CO_2 no ciclo de Calvin compreende duas etapas. A fotoquímica, presente nas membranas dos tilacóides, e a bioquímica que ocorre na região aquosa do cloroplasto, denominado estroma (RAINES, 2011; EVANS, 2013).

As plantas como organismos autotróficos possuem a habilidade de converter a energia da luz em energia química para gerar produtos ricos em energia como o ATP e poder redutor na forma de NADPH, através do transporte fotossintético de elétrons (RAINES, 2011; VOSS et al., 2013). Esta energia é utilizada para a fixação de CO₂ no ciclo de Calvin e gerar compostos orgânicos e oxigênio molecular, que são essenciais para a vida na Terra (EVANS, 2013).

Nas plantas superiores o mesófilo foliar é o tecido fotossintético mais ativo. Células desse tecido contêm muitos cloroplastos que é a organela celular onde a fotossíntese acontece em organismos eucarióticos e é principalmente encontrado em folhas e caules. Neste processo, a energia luminosa na forma de fótons é absorvida pelas clorofilas e carotenóides para oxidar a molécula de água no fotossistema II, dando início ao transporte de elétrons entre os fotossistemas (TAKAHASHI e MURATA, 2008). O fluxo de elétrons na CTE cloroplástica, tem início com a clorofila do centro de reação do PSII que ao ser excitada (P680*) dar início ao transporte de elétrons para a feofitina (Pheo) e para as plastoquinonasceptoras (Q_A e Q_B). Em continuidade, o complexo citocromo *b₆f* transfere esses elétrons para a plastocianina (PC), uma proteína solúvel, que por sua vez reduz o P700* (P700 oxidado).

Uma série de proteínas transfere esses elétrons para ferredoxina solúvel (Fd) e uma flavoproteína solúvel ferredoxina-NADP redutase (FNR) reduz o NADP⁺ a NADPH, que será utilizado no ciclo de Calvin para reduzir o CO₂ (ASADA, 2006). Entretanto, o excesso de luz acima da necessidade para promover a assimilação de CO₂ também leva a fotoprodução de espécies reativas de oxigênio como oxigênio singlete (¹O₂) no PSII, radical superóxido (O₂^{•-}) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no PSI (ASADA, 2006) (Figura 2). Essas EROs são geradas como subprodutos normais do metabolismo fotossintético e podem atuar como moléculas sinalizadoras em quase todos os processos de desenvolvimento das plantas (FOYER e NOCTOR, 2003; ISHIBASHI et al., 2011).

Porém, quando sua produção atinge um limiar acima da sua função como sinalizador celular pode levar a dano oxidativo (MITTLER, 2002; MOLLER, 2007; DELMIDICK, 2015). Por exemplo, o excesso de H₂O₂ produzido no PSI pode impedir o reparo da proteína D1 do centro de reação do PSII, causando fotoinibição permanente (FOYER e NOCTOR, 2000; TAKAHASHI e MURATA, 2008; TAKAHASHI e BADGER, 2011). Esse tipo de fotoinibição que ocorre em condições ambientais adversas, afeta a atividade fotossintética, o crescimento e a produtividade das culturas

(LI et al., 2009). A ocorrência de fotoinibição pode ser estimada pela diminuição na eficiência quântica máxima do PSII, expressa pela relação F_v/F_m , em que F_v e F_m consiste fluorescência variável e máxima das clorofilas, respectivamente (TAKAHASHI et al., 2010). Recentes estudos têm demonstrado que estresses abióticos como seca, calor e luminosidade elevada, condições que limitam o ciclo de Calvin, podem acelerar o processo de fotoinibição por inibir o processo de reparo do PSII, (TAKAHASHI e MURATA, 2008; MURATA et al., 2012; NISHIYAMA e MURATA, 2014).

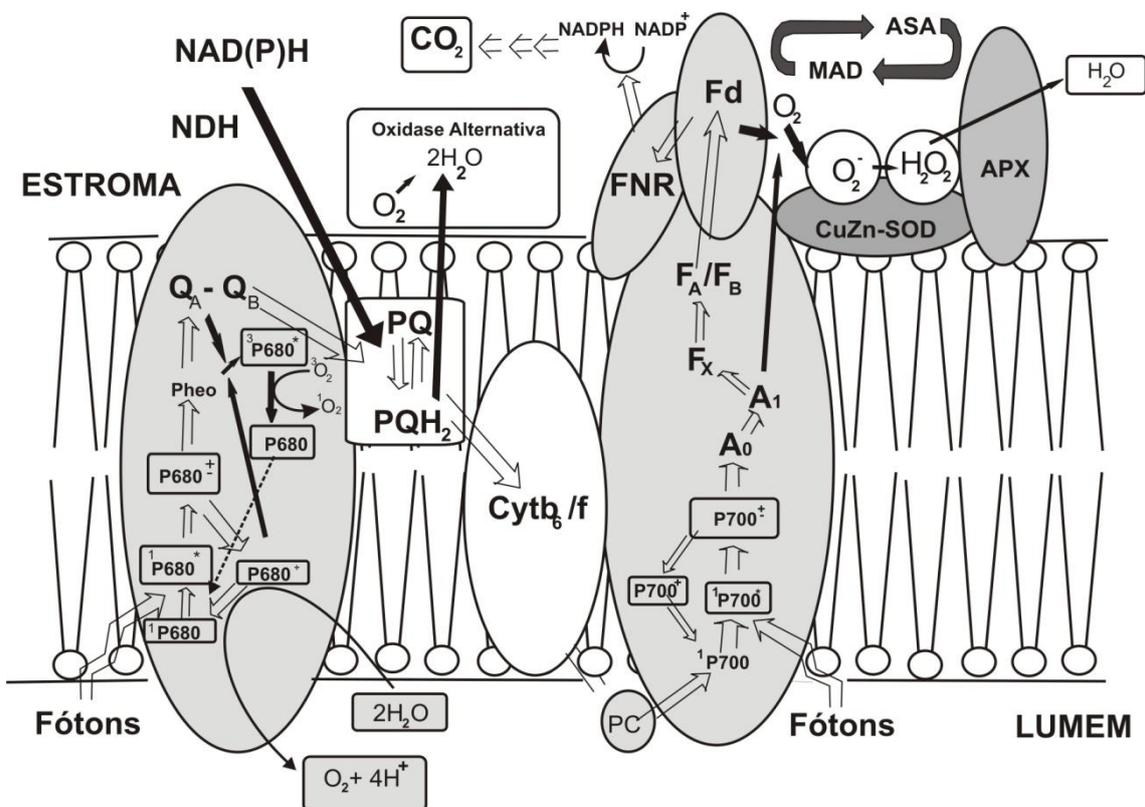


Figura 2. Produção de oxigênio singleto (1O_2) e radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) na membrana dos tilacóides em cloroplastos. Setas abertas representam a fotoexcitação dos centros de reação e o fluxo dos elétrons gerados que são utilizados para assimilação de CO_2 . Setas escuras representam a intensidade de fótons que excedem a capacidade de transporte de fluxo de elétrons para assimilação de CO_2 gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). Sistemas de eliminação de EROs como dismutase do superóxido (CuZn-SOD) e peroxidase do ascorbato (APX) e antioxidantes como ascorbato (ASA) são importantes para manter a homeostase celular e proteção oxidativa (adaptado de ASADA, 2006).

As plantas desenvolveram diversos mecanismos de fotoproteção para lidar com alta luminosidade e evitar os danos causados a moléculas importantes no estroma e

membrana dos tilacóides. Por exemplo, movimento das folhas e cloroplastos, sistemas de eliminação das espécies reativas de oxigênio, dissipação da energia absorvida na forma de calor pelo quenching não fotoquímico (NPQ) e aumento da via fotorrespiratória (ASADA, 2006; ZHOU et al., 2007; TAKAHASHI e BADGER, 2011; VOSS et al., 2013), as quais são de fundamental importância para proteção do aparato fotossintético.

As enzimas antioxidantes tais como a superóxido dismutase (SOD), catalases e peroxidases do ascorbato (APX), em suas diversas isoformas, juntamente com o ciclo ascorbato glutationa, mantêm níveis celulares baixos de EROs (TEIXEIRA et al., 2006; MURATA et al., 2012; SGOBBA et al., 2015; ZHANG et al., 2016). A SOD constitui a primeira linha de defesa oxidativa das plantas, pois elimina o radical superóxido produzindo H_2O_2 (ALSCHER et al., 2002). As catalases são peroxidases localizadas nos peroxissomos em tecidos fotossintéticos, onde atuam na eliminação do H_2O_2 , produzido pela atividade da enzima oxidase do glicolato (GO) na via fotorrespiratória (ZHANG et al., 2016). Diferente da SOD e da CAT, as peroxidases do ascorbato (APX) usam o ascorbato (ASA) como doador de elétrons para converter o H_2O_2 em H_2O e O_2 em diversos compartimentos celulares (NISHIYAMA e MURATA, 2014).

As APXs possuem uma alta especificidade por ASA e sua atividade é reduzida em baixas concentrações desse antioxidante (SHIGEOKA et al., 2002). Recentes estudos têm revelado o importante papel das isoformas da APX cloroplasmática e citosólica na regulação da fotossíntese sob exposição à alta luminosidade. O silenciamento destas isoformas de APX ativa mecanismos compensatórios que conferem proteção contra danos oxidativos (CAVERZAN et al., 2014; CARVALHO et al., 2014). Esses estudos têm dado contribuições importantes para compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na adaptação das plantas a ambientes restritivos a produção agrícola, esperada com maior frequência. Estas previsões climáticas têm ocasionado um maior número de estudos em plantas, na busca de maior tolerância aos efeitos adversos dos estresses abióticos (MITTLER e BLUMWALD, 2010; GAMÉS et al., 2013).

Uma característica que tem sido associado à tolerância é o aumento da atividade de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos mantendo níveis baixos de EROs (DEMIREVSKA et al., 2010; SGOBBA et al., 2015). Por outro lado, o quenching não fotoquímico (NPQ) é também um eficiente mecanismo fotoprotetor em condições de alta luminosidade (ZHOU et al., 2007; BAKER, 2008). Ele elimina o excesso de luz na

forma de calor, fenômeno também referido como a extinção não-fotoquímica (NPQ) que pode ser monitorado em termos de fluorescência da clorofila. Além destes, a via fotorrespiratória também pode atuar como uma rota alternativa de elétrons para proteger o aparato fotossintético (VOSS et al., 2013). Portanto, todos estes mecanismos citados acima são essenciais para manter maiores taxas fotossintéticas e evitar danos oxidativos sob alta incidência luminosa.

1.1.3-Estresse de temperatura elevadas

No mundo em que vivemos, mudanças climáticas deixaram de ser assunto fictício e já são uma realidade. Na literatura existem diversas fontes que documentam essas mudanças com implicações importantes para a agricultura (IPCC, 2007; GORNALL et al., 2010; MITTLER e BLUMWALD, 2010; GAMÉS et al., 2013). Vários estudos têm mostrado que ondas de calor e altas temperaturas aumentaram em frequência, intensidade e também duração (MEEHL e TEBALDI, 2004). Para se ter uma idéia, no século 20, a temperatura média do ar aumentou em cerca de 0,6 °C, devido à emissão antropogênica dos gases do efeito estufa (GEE).

Esses gases absorvem mais radiação solar e conseqüentemente promovem o aquecimento da atmosfera (PIMENTEL, 2011). A estimativa projetada para os próximos 50 ou 100 anos é que a temperatura média anual irá subir 3 a 5° C devido aos GEE (IPCC, 2007). Assim, as regiões agrícolas do nosso planeta são susceptíveis de ser diferencialmente afetadas por estes eventos climáticos. No entanto, todas essas projeções feitas por modelos climáticos podem variar. Existe um consenso geral entre cientistas e pesquisadores, que essas mudanças climáticas vão influenciar significativamente a produção agrícola futura (MITTLER e BLUMWALD, 2010). Nas últimas décadas, o aumento da temperatura causará sérios impactos em várias culturas em diferentes partes do mundo.

Na China, por exemplo, um grande produtor mundial de arroz (*Oriza sativa* L.), uma redução na qualidade de sementes em torno de 10% sob exposição prolongada desta condição (TIAN et al., 2009). Na Europa, o aumento de 6°C acima do normal acompanhando pela seca, levou a mesma a enfrentar o verão mais quente em 2003 e ocasionou sérias perdas de produtividade nas culturas (STOTT et al., 2004, CIAIS et al., 2005). Nas plantas, o estresse por excesso de calor afeta diversos processos. Por

exemplo, mudanças fenológicas (IBÁÑEZ et al., 2010), abscisão e senescência de folhas, mudanças no crescimento e desenvolvimento (BITA et al., 2013).

No metabolismo vegetal, compromete a homeostase redox, aumentando a produção de EROs e prejudica os mecanismos de eliminação dessas formas tóxicas do O₂ nos diversos compartimentos celulares (LOCATO et al., 2009). As plantas desenvolveram diversos mecanismos de defesa para remover o excesso de EROs. Destes, fazem parte os enzimáticos, compreendidos em dismutase do superóxido (SOD), catalases (CAT), peroxidase dos ascorbato (APX) e os não enzimáticos que são o ascorbato (ASA) e glutathiona (GSH) (FOYER e NOCTOR, 2009). Além disso, foi demonstrado também que o estresse por calor diminui a síntese de proteínas normais e aceleram a tradução de proteínas de defesa, como as de choque térmico (HSPs) (KOTAK et al., 2007; SGOBBA et al., 2015).

Sgobba et al., (2015) estudando os mecanismos de defesa antioxidantes em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv.) sob estresse moderado e longo demonstraram que na condição de moderada exposição, a capacidade antioxidante foi melhorada mantendo o estado redox e evitando o dano oxidativo. Em contraste, a exposição ao calor (35°C) por longo prazo (7 dias) reduziu essa capacidade pela inativação das enzimas protetoras (CAT e APX) causando dano oxidativo e com isso, restringindo o crescimento. Elevadas temperaturas (42°C) promove uma considerada redução na eficiência fotossintética através da diminuição do conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides), eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm) e atividade da Rubisco. Em consequência, ocorre uma diminuição da assimilação líquida de CO₂ (LIU e HUANG, 2008).

A faixa de temperatura na qual a Rubisco opera de forma eficiente é geralmente entre 20 e 30°C, acima desta faixa as taxas fotossintéticas são reduzidas (YAMORI et al., 2014). A Rubisco (Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase) é a enzima responsável pela fixação de CO₂ nas plantas superiores (GOWIK e WESTHOF, 2011). Esta enzima é a proteína mais abundante nas plantas e é amplamente considerada como sendo particularmente ineficiente devido à sua capacidade para catalisar tanto a carboxilação como a oxigenação (PARRY et al., 2013). É justamente por esta duplicidade funcional desta proteína que o efeito da elevação da temperatura reduz fotossíntese. Ela diminui a solubilidade do CO₂, principal substrato da Rubisco, favorecendo o O₂.

Dessa forma, o O_2 é metabolizado aumentando a fotorrespiração, processo que compete com a fotossíntese (FOYER e NOCTOR, 2009) impedindo o ganho líquido de carbono (WILHELM e SELMAR, 2011) e gerando também as espécies reativas de oxigênio (EROs) (VOSS et al., 2013). Em adição, o aumento da temperatura diminui a afinidade pelo CO_2 que possui uma similaridade eletrostática muito grande com o O_2 . Esses fatores aumentam a atividade oxigenase da Rubisco (WHITNEY et al., 2011). As plantas possuem metabolismos diferentes e com isso reagem diferentes a estas condições. As plantas C4 e CAM possuem mecanismos de concentrações de CO_2 que lhe conferem uma maior eficiência fotossintética mesmo em altas temperaturas, diferente das plantas C3 (YAMORI et al., 2014).

As plantas C3 por não possuírem esses mecanismos de concentração de CO_2 , são as espécies que mais sofrem com o excesso de calor. Além disso, severas reduções são causadas aos complexos antena e reações fotoquímicas (LIU e HUANG, 2008). No entanto, elas representam aproximadamente 85% de todas de plantas superiores (YAMORI et al., 2014), além das mais importantes espécies cultivadas (KEBEISH et al., 2007; BETTI et al., 2016). No cenário futuro, as previsões é que a temperatura aumentará (MITTLER e BLUMWALD, 2010) principalmente como efeitos dos gases do efeito estufa (GEE). Essa elevação na temperatura será acompanhado também por um crescimento populacional requerendo cada vez mais das culturas maiores rendimentos (RAINES, 2011; EVANS, 2013). Assim, melhorar a tolerância das plantas nestas condições é uma abordagem promissora para aumentar o rendimento das culturas e garantir a segurança alimentar das populações. Portanto, compreender os processos que limitam a fotossíntese num cenário de altas temperaturas é um avanço importante.

1.1.4-Combinação dos estresses

As plantas são constantemente expostas a várias condições de estresse, principalmente as culturas de importância econômica. Os principais estresses abióticos como seca, calor e luminosidade elevada, que trazem prejuízos e afetam as culturas no campo estão sendo amplamente estudados (CRAMER et al., 2011). Na literatura, inúmeros são os trabalhos que registram estudos acerca dos impactos negativos dos estresses abióticos sobre o desempenho vegetal (CHAVES et al., 2003; LIU e HUANG, 2008; OSAKABE et al., 2014; SALES et al., 2015; YUAN et al., 2016).

No entanto, esses estudos na grande maioria mostram os efeitos destes estresses no metabolismo vegetal de forma isolada, como a seca (SALES et al., 2015; YUAN et al., 2016) e também o calor (LIU e HUANG, 2008; SGOBBA et al., 2015). Assim, o conhecimento gerado nestas condições, apesar da sua importância, não reflete de fato a realidade do que ocorre no campo (SUZUKI et al., 2014). Em condições de campo, a seca geralmente ocorre acompanhada pelo calor ou mesmo alta luminosidade, e estes atuam de forma combinada que interagem levando respostas distintas e complexas (RIZHSKY et al., 2002; MITTLER, 2006; ZHOU et al., 2007; ATKINSON e URWIN, 2012; PRASCH e SONNEWALD, 2015).

Um exemplo típico dos efeitos distintos da combinação dos estresses em parâmetros fisiológicos ocorre durante a combinação de seca e calor. Durante o estresse térmico, as plantas aumentam a condutância estomática, a fim de esfriar suas folhas pela transpiração. Entretanto, se o estresse térmico ocorrer juntamente com a seca, as plantas não seria capaz de abrir seus estômatos e sua temperatura da folha seria bem maior, cerca de 2 a 5°C (RIZHSKY et al., 2002). De maneira similar, a alta intensidade de luz poderia revelar-se problemática para as plantas submetidas à seca. Sob estas condições, as reações de fixação de carbono são parcialmente inibidas e a alta energia na forma de fótons, absorvida pela planta, induziria a foto-redução do oxigênio molecular, levando inevitavelmente a aumento produção de EROs (FOYER e NOCTOR, 2000; MITTLER, 2002).

Esses conhecimentos têm levado muitos pesquisadores a despendere esforços para reproduzir estas condições (estresses combinados) em laboratório sob condições controladas (SUZUKI et al., 2014). Mittler (2006) resume em uma “Matrix do estresse” alguns das principais combinações de estresses bióticos e abióticos que devem ser estudadas por causarem grandes impactos à produção agrícola. Além disso, mostrou também que existem interações potencialmente negativas, positivas, desconhecidas e as que não apresentam aparentemente nenhum tipo de interação. Suzuki et al., (2014) atualizou esta “matrix”, inserindo outros componentes para estudo como compactação do solo e o micronutriente Boro que pode atenuar a toxicidade do Na⁺ em folhas sob estresse salino (Figura 3).

Nesta “Matrix do estresse”, a seca acompanhada por alta temperatura e altas luminosidades, condições comuns em regiões Semiáridas do mundo todo, apresenta interação potencialmente negativas para o metabolismo vegetal e conseqüente rendimento das culturas. A seca e o calor estão entre os principais fatores ambientais

que limitam o crescimento e a produtividade das plantas em todo o mundo (MITTLER, 2006; MITTLER e BLUMWALD, 2010; SILVA et al., 2010). Recentemente, uma onda de calor acompanhando por um extenso período de déficit hídrico na Europa, foi suficiente para reduzir consideravelmente a produção agrícola em 2003 (CIAIS et al., 2005). Nos Estados Unidos, o prejuízo para agricultura decorrente desta combinação chegou à casa dos bilhões (MITTLER, 2006).

Recentes estudos têm dado contribuições importantes na compreensão dos efeitos isolados e combinados destes estresses de seca e calor. Silva et al., (2010), usando plantas de pinhão manso (*Jatropha curcas*), demonstraram que a combinação de seca e calor prejudicou mais intensamente a assimilação fotossintética de CO₂ associados a maiores danos fotoquímicos e oxidativos se comparado aos efeitos isolados destes estresses. No referido estudo, ficou claro que estes efeitos negativos são fortemente estimulados pelos estresses térmicos e que a combinação (seca + calor) provoca uma resposta complexa envolvendo interações antagônicas e sinérgicas. Prasad et al., (2011) demonstraram também o efeito negativo da seca, calor e a combinação destes em plantas de trigo. As taxas fotossintéticas (P_N), conteúdos de clorofila foram consideravelmente reduzidas em ambos os estresses isolados e mais ainda na combinação (seca + calor). Como consequência, essas plantas diminuíram a produção de grãos, devido principalmente a sensibilidade dos órgãos reprodutivos quando expostos a seca associado ao calor.

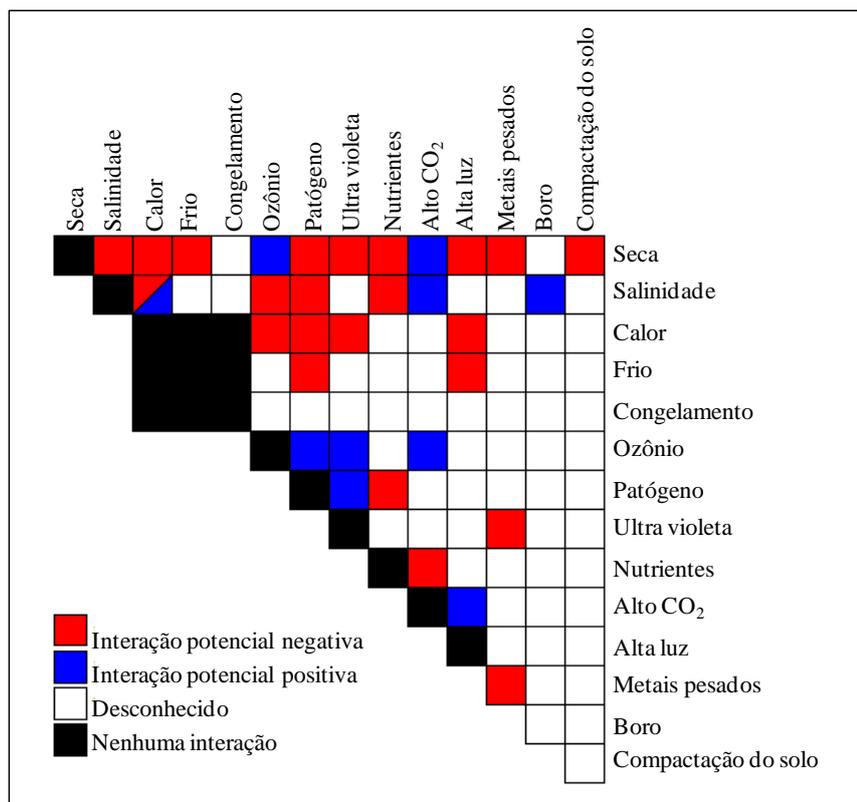


Figura 3. Matriz representativa de possibilidades de interações positivas e negativas para diferentes tipos de estresses abióticos. Diferentes combinações de potenciais estresses ambientais que podem afetar as culturas no campo são apresentadas na forma de uma matriz. A Matrix é codificada por cores para indicar combinações de estresses que foram estudados com uma gama de culturas e seu efeito no crescimento das plantas e produtividade (adaptado de SUZUKI et al., 2014).

Os efeitos adversos da seca podem se tornar ainda mais intensos sob condição de excesso de luminosidade. Além da seca acompanhada pelo calor, a combinação com a luminosidade elevada com o estresse hídrico pode trazer também grandes prejuízos ao metabolismo vegetal. A captação continuada de luz pode levar a uma sobrecarga de elétrons na cadeia transportadora de elétrons do cloroplasto. Nestas condições são produzidas espécies reativas de oxigênio que pode danificar o aparato fotossintético (ASADA, 2006) e provocar a perda de equilíbrio do funcionamento celular (MITTLER, 2002). Além disso, a via fotorrespiratória pode ser estimulada devido à restrição na assimilação de carbono imposta pela seca.

Zhou et al., (2007), estudando o efeito destes estresses (seca + excesso de luz) combinados no metabolismo vegetal em plantas de arroz (*Oriza sativa* L.), demonstrou

seus efeitos sinérgicos na limitação da condutância estomática (g_s) e fotossíntese líquida (P_N), acompanhada pela expressiva diminuição da velocidade máxima de carboxilação (V_{cmax}) e capacidade de regeneração (J_{max}). No estudo, os autores concluíram que o estresse hídrico associado com a luminosidade promove limitações metabólicas e que a dissipação térmica (NPQ) nestas condições é um processo importante para minimizar os efeitos adversos quando a fotossíntese é suprimida.

Apesar destes trabalhos, o conhecimento dos efeitos combinados de seca com calor e/ou luminosidade elevada no metabolismo vegetal, ainda é muito fragmentado. A comunidade científica entende que existe uma necessidade eminente de melhoria na produção de alimentos (RAINES, 2011). Os motivos são principalmente aumento da população mundial, requerendo cada vez mais das culturas maiores rendimentos, em condições de mudanças climáticas desfavoráveis (STOTT et al., 2004; MITTLER e BLUMWALD, 2010; LI et al., 2013). Dessa forma, a necessidade de culturas mais tolerantes a combinação de estresses é de extrema importância para o futuro (MITTLER e BLUMWALD, 2010).

No século 20, especialmente para os cereais, foi observado que ocorreram aumentos em produtividade durante a revolução verde. Entretanto, nos recentes anos esses aumentos para algumas culturas como a do arroz (*Oriza sativa* L.) têm sido escassa (ZHU et al., 2010) com dados mostrando que é possível de ter chegado ao seu rendimento máximo (TILMAN et al., 2002). O aumento no uso de fertilizantes possivelmente não trará bons resultados, porque os países em sua grande maioria têm tentado minimizar o uso intensivo na agricultura. Estes fertilizantes tanto nitrogenados como os fosfatados podem contaminar o meio ambiente além de ser muito caro para maioria dos produtores.

Devido a estes motivos, a melhoria da eficiência fotossintética para as espécies de importância econômica pode ser um caminho promissor, considerando que este processo metabólico ainda pode alcançar maior eficiência (BETTI et al., 2016; TIMM et al., 2016). Assim, o conhecimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares que regulam as respostas das plantas a fatores abióticos é necessário para ter êxito nos programas de melhoramento, visando culturas mais tolerantes. Um mecanismo que parece estar associado com a tolerância de plantas a combinação de estresses é uma maior capacidade antioxidante, por envolver processos celulares relacionados tanto a sinalização quanto danos (SALES et al., 2013).

1.2-METABOLISMO FOTO-OXIDATIVO

1.2.1-Fotossíntese

A fotossíntese é um dos fenômenos biológicos naturais mais importantes para manutenção da vida na terra (FOYER e SHIGEOKA, 2011). Representa o maior fluxo de carbono orgânico que entra na biosfera, assimilando cerca de 100 bilhões de toneladas de carbono por ano (RAINES, 2011). De forma conceitual, é o processo que as plantas usam para capturar energia da luz solar e convertê-la em energia bioquímica, que é subsequentemente utilizado para suportar quase toda a vida na Terra (EVANS, 2013). Os organismos com fotossíntese aeróbica convertem a energia luminosa em energia bioquímica (na forma de ATP e NADPH) através do transporte fotossintético de elétrons na membrana dos tilacóides.

Como processo biológico, a fotossíntese gera componentes orgânicos e oxigênio molecular, que são essenciais para vida na terra. São conhecidas nas plantas três vias fotossintéticas para fixação de carbono, as quais podem ser denominadas de plantas C3, C4 ou CAM. Nestas três vias, exceto as suas particularidades, as diferentes espécies vegetais usam a enzima Rubisco para assimilação de CO₂ no ciclo de Calvin-Benson (GOWIK e WESTHOF, 2011). Neste ciclo, o primeiro produto estável formado é um composto de 3 carbonos, 3-fosfoglicerato (3-PGA). Este ciclo compreende três fases: carboxilação, redução e regeneração. A fase de carboxilação tem início pela ação da enzima Rubisco, que catalisa a carboxilação da ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) com o CO₂ atmosférico, utilizando produtos ricos em energia produzidos pelas reações fotoquímicas (ATP e NADPH).

O 3-PGA formado na reação é usado para formar as trioses fosfato, gliceraldeído fosfato (3-GP) e dihidroxicetona fosfato, via duas reações que consomem energia (fase de redução). Na fase regenerativa, uma série de reações regeneram a molécula aceptora do CO₂ (RuBP) do ciclo a partir de trioses fosfatos. Os compostos de carbono produzidos nestas reações são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. A maioria das trioses fosfatos (5/6) produzidos neste ciclo são usados para regenerar a RuBP e manter funcionamento do mesmo, enquanto que apenas 1/6 dessas trioses é usado para a biossíntese de outros componentes e moléculas.

Nesse Ciclo o papel da Rubisco está diretamente relacionado com a eficiência da fixação do CO₂, uma vez que essa enzima pode catalisar tanto a reação de carboxilação quanto de oxigenação da RuBP. Esta enzima, possui característica bifuncional, podendo

catalisar tanto a reação de carboxilação como de oxigenação da RuBP (PARRY et al., 2013). A reação de oxigenação desta enzima leva a ativação da via fotorrespiratória, processo metabólico que compete com a fotossíntese (FOYER e NOCTOR, 2009), podendo resultar em uma perda em torno de 25 a 30% do carbono fixado (RAINES, 2011). Variáveis ambientais como seca, altas temperaturas e luminosidade elevadas podem favorecer esta reação (oxigenase) e uma possibilidade potencial para aumentar a fotossíntese é reduzi-la (KEBEISH et al., 2007).

Interessantemente, quando a fotossíntese aeróbica evoluiu, a fotorrespiração não foi um problema, porque a atmosfera era rica em CO₂ e possuía pouco oxigênio. No entanto, ao longo do tempo, a fotossíntese transformou a atmosfera ao seu estado presente, rico em oxigênio (DEMIDCHIK, 2015). Nestes ambientes, as plantas evoluíram estratégias para aumentar a concentração de CO₂ na vizinhança da Rubisco, que foi prejudicada pelo aumento natural da proporção de O₂ em relação ao CO₂ (WITNEY et al., 2011). Em primeiro lugar, as plantas alteraram as propriedades cinéticas da Rubisco para melhorar a sua capacidade para distinguir entre CO₂ e O₂. Em segundo lugar, mecanismos de concentração de CO₂ evoluíram para permitir que a Rubisco opere num espaço rico em CO₂ (EVANS, 2013).

Deste mecanismo de concentração, apareceram o metabolismo C4 e CAM, sempre envolvendo a fosfoenolpiruvato carboxilase (YAMORI et al., 2014). A maioria das espécies de plantas de interesse econômico são plantas C3 (BETTI et al., 2016). Essas espécies não possuem mecanismos de concentração de CO₂ como a C4 e CAM. Dessa forma, em condições de estresses como seca, calor e luminosidade elevada, a oxigenação da Rubisco (fotorrespiração) é inevitável levando a redução de crescimento e produtividade das culturas. Com os programas de melhoramento passado, atingiram-se bons rendimentos agrícolas, porém atualmente são agora exigidos maiores rendimentos das culturas. Um componente fundamental da produtividade das plantas que não tenha sido utilizado para selecionar plantas mais produtivas é a fotossíntese (RAINES, 2011).

Um processo metabólico que compete com a fotossíntese e limita a produtividade das culturas agrícolas, especialmente as plantas C3 é a fotorrespiração (FOYER e NOCTOR, 2009). Há algum tempo, muitos cientistas, têm dedicado esforços para abolir a via da fotorrespiração visando à redução da atividade oxigenase da Rubisco e aumentar a produtividade das culturas (OGREN, 1984; KEBEISH et al., 2007; XU et al., 2009; LU et al., 2014). Além destas estratégias relacionadas à

fotorrespiração, outras abordagens também foram feitas, como melhorar as propriedades cinéticas da Rubisco (WHITNEY et al., 2011; PARRY et al., 2013), introdução da via C4 para culturas C3 (GOWIK e WESTHOFF, 2011) e também a introdução de mecanismos de concentração de CO₂ de cianobactérias em cloroplastos (LIN et al., 2014).

1.2.2-Fotorrespiração e suas vias alternativas

Com o estabelecimento do dióxido de carbono na atmosfera e assimilação pelo ciclo de Calvin, descobriu-se que folhas de plantas quando iluminadas liberam de volta quantidades de CO₂ recém-assimilados para atmosfera (BAUWE, et al., 2010; VOSS et al., 2013). A este processo que consome oxigênio e libera CO₂ na presença da luz, foi denominado fotorrespiração (FOYER e NOCTOR, 2000; SOMERVILLE, 2001). A dedução de que o O₂ e CO₂ competiam como substrato para a Rubisco (ribulose 1,5-bifosfato carboxila e oxigenase), foi um grande avanço na biologia vegetal no século 20 (SOMERVILLE, 2001). Em plantas superiores o ciclo fotorrespiratório (C2) necessita da atividade de 8 enzimas localizadas em diferentes organelas, além de algumas enzimas auxiliares, para reciclar o carbono na molécula de 2-fosfoglicerato (2-PGA) gerado pela atividade oxigenase da Rubisco (BAUWE et al., 2010).

Este processo requer um fluxo de substratos através de membranas que envolvem três organelas celulares: cloroplasto, peroxissomo e mitocôndria (BAUWE et al., 2010). Inicialmente este processo tem início com a oxigenação da Rubisco que produz uma molécula de 2-fosfoglicerato (2PGA) e uma molécula de 2-fosfoglicolato (2PG) no cloroplasto. A molécula de (2-PGA) é incorporada ao ciclo de Calvin, entretanto, a molécula de (2PG) não pode ser incorporada ao mesmo. Por este fato, a molécula de 2-fosfoglicolato (2PG) sofre uma desfosforilação no cloroplasto gerando o glicolato, em seguida esse composto é translocado através de um transportador específico para o peroxissomo onde é oxidado a glioxilato.

A oxidação do glicolato à glioxilato nos peroxissomos é uma reação catalisada pela enzima oxidase do glicolato (GO; EC, 1.1.3.15), uma proteína que contém a flavina adenina mononucleotídeo (FMN) como cofator (ZELITCH e OCHOA, 1953). Essa enzima está localizada nos peroxissomos, onde realiza um passo essencial no funcionamento do ciclo fotorrespiratório (DEL RIO et al., 2006). Na seqüência da via, ocorre a transaminação do glioxilato para glicina no peroxissomo, a glicina em seguida

é descarboxilada na mitocôndria produzindo serina e CO₂ (TOLBERT, 1971). A serina é convertida à glicerato no peroxissomo, e em seguida esse composto é transportado para o cloroplasto onde atuará como precursor para a síntese e regeneração do 3-fosfoglicerato (BAWER et al., 2010; 2012) (Figura 4). A estequiometria da via, é que para cada molécula de CO₂ liberada, são consumidas duas de 2PG reduzindo assim a produção de açúcares e biomassa, além da liberação de energia e amônia.

Esta via metabólica tem sido considerada como desperdício de carbono podendo limitar a fotossíntese e a produtividade das plantas. Como resultado, alguns cientistas já algum tempo tem dedicado seus esforços com grande entusiasmo a descobrir maneiras de abolir esta via com o objetivo de aumentar a produtividade das plantas (OGREN, 1984). Grandes avanços foram feitos na compreensão desta via, principalmente com mutantes de *Arabidopsis thaliana*, deficientes em várias enzimas da fotorrespiração (SOMERVILLE, 2001) e também para outras culturas como o arroz (TIMM e BAWUE, 2013). No entanto, outros trabalhos com abordagens diferentes, tem também dado sua parcela de contribuição e acirrado ainda mais o debate sobre a fotorrespiração (KEBEISH et al., 2007; XU et al., 2009; LU et al., 2014).

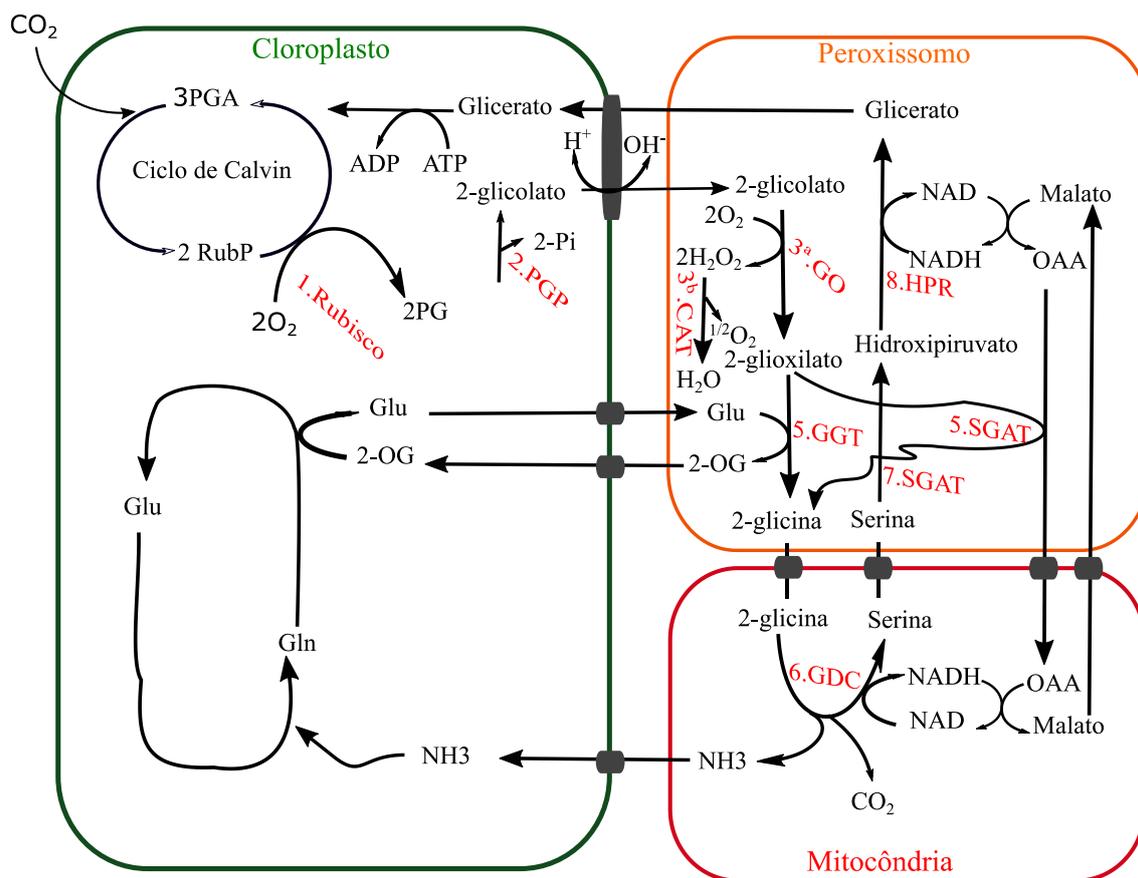


Figura 4. As principais características do metabolismo fotorrespiratório. O ciclo tem início com a oxigenação da enzima Rubisco que produz na reação uma molécula de 2-fosfoglicolato (1). Em seguida, essa molécula produzida na reação sofre uma desfosforilação no cloroplasto por uma fosfatase específica (PGP) e é transportada por um carreador para o peroxissomo na forma de 2-glicolato (2). Esse glicolato sofre uma oxidação a glioxilato na mesma organela (3.a) pela principal enzima deste ciclo, a glicolato oxidase (GO). Neste passo são produzidas grandes quantidades de H_2O_2 como subprodutos desta oxidação. A catalase, uma importante enzima oxidativa, contribui para manter o balanço redox no sistema eliminando o H_2O_2 em O_2 e H_2O (3.b). O glioxilato posteriormente é convertido ao aminoácido glicina pela ação tanto da serina: glioxilato aminotransferase (GGT) ou pela glutamato: glioxilato aminotransferase, ambas transferases (SGT) (5). Na mitocôndria, a glicina descarboxilase (GDC) combina duas moléculas de glicina a uma molécula de serina (6). Neste passo, são liberados CO_2 e amônia (NH_3). Nos peroxissomos, a serina é convertida a hidroxipiruvato pela (SGAT), que é reduzida a glicerato pela hidroxipiruvato redutase (HPR). O glicerato fosforilado por uma quinase no cloroplasto resulta em 3PGA sendo incorporado ao ciclo de Calvin (adaptado de WINGLER, et al., 2000; BAUWE et al., 2010).

Atualmente a visão tradicional da fotorrespiração tem sido mudada e tem sido reconhecida como uma via metabólica que interage com outras vias (BAUWE et al., 2010). Além disso, o conceito de que a fotorrespiração representa uma via metabólica fútil, tem sido bastante discutida. Nesta discussão, estão aspectos relacionados ao papel da via na sobrevivência de plantas que utilizam apenas a Rubisco para fixação/assimilação de CO₂ (ZELITCH et al., 2009), bem como a sua contribuição para prevenir o estresse oxidativo gerado por EROs, por atuar como dreno de poder redutor, apesar de ser considerada uma importante fonte de EROs nos peroxissomos (VOSS et al., 2013).

Três vias alternativas para fotorrespiração têm sido propostas denominadas “Bypass” (PETERHANSEL et al., 2013). A primeira foi estabelecida por um grupo de pesquisa visando à redução da fotorrespiração desviando o glicolato produzido pela oxigenação da Rubisco no cloroplasto (KEBEISH et al., 2007). Foi introduzido um gene da bactéria *Escherichia coli*, em *Arabidopsis thaliana* que utilizam o glicolato como fonte de carbono. Esse gene codifica para as proteínas glicolato dehydrogenase (GDH), glioxilato carboligase (GCL) e Tartrônico semialdeído redutase (TSR) nos cloroplastos. Na reação, o glicolato é oxidado a glioxilato pela GDH. Em sequência, duas moléculas de glioxilato são ligadas pela (GCL) para formar uma molécula de tartrônico semialdeído (TSR) e uma molécula de CO₂ é liberada. O tartrônico semialdeído (TSR) produzido é convertido a glicerato por uma tartrônico semialdeído redutase no próprio cloroplasto.

Como consequência, o fluxo de carbono pela oxigenação é reduzido e também a produção de amônia. O resultado foi animador porque as plantas transgênicas cresceram mais rapidamente, produziram mais biomassa de caules e raízes e continha mais açúcares solúveis, refletindo a redução da fotorrespiração. Interessantemente, a maior fotossíntese foi correlacionada com a diminuição da fotorrespiração e um aumento cloroplasmático na concentração de CO₂ na vizinhança da Rubisco.

A segunda via alternativa, é semelhante à primeira. A nova via foi manipulado com duas enzimas: carboligase do glioxilato (GCL; CE 4.1.1.47), que converte o glioxilato a tartrônico semialdeído e CO₂, e isomerase do hydroxypyruvato (Hyi; EC 5.3.1.22), que converte semialdeído tartrônico para hydroxypyruvato, uma via conhecida por operar também em *E. coli*. Nesta via a liberação de amônia é abolida e três quartos do carbono a partir de glicolato são convertidos em 3-PGA. Este equilíbrio

é idêntico ao saldo de desvio 1 (CARVALHO et al., 2012; PETERHANSEL et al., 2013).

A terceira via alternativa foi proposta por Fahanestich et al., (2008) e Maier et al., (2012). Neste modelo, foi introduzido a oxidase do glicolato (GO) de plantas do peroxissomo para o cloroplasto. Como resultado, as plantas aumentaram o conteúdo de peróxido de hidrogênio e a atividade de enzimas que atuam na proteção oxidativa, especialmente a catalase. Resultados similares foram obtidos aos “Bypass” anteriores. As plantas mostraram maiores taxas fotossintéticas, e mudanças na relação de glicina/serina em comparação com o tipo selvagem. Estes resultados foram tão satisfatórios que levaram a introdução do “Bypass” de Kebeich et al., (2007) para outras culturas como batata, (*Solanum tuberosum*) (NOLKE et al., 2014) e também na oleaginosas, (*Camelina sativa*) (DALAL et al., 2015).

Entretanto, esses benefícios pode não acontecer no campo, onde o ambiente é muito heterogêneo e testes são necessários para confirmar estes benefícios (BETTI et al., 2016). Todas estas vias alternativas demonstraram que podem aumentar a assimilação de carbono restringindo o fluxo fotorrespiratório. O reaproveitamento do CO₂ fotorrespiratório a partir de mitocôndrias em cloroplastos, reduzindo os custos de energia e evitando a liberação da amônia, foi demonstrado ser os principais fatores que contribuíram para uma maior eficiência fotossintética (XIN et al., 2015). No entanto, a via fotorrespiratória pode interagir de perto com muitas outras vias, tais como o metabolismo do nitrogênio e a respiração (BAUWE et al., 2010).

Aquela idéia sobre a fotorrespiração, que representava apenas uma via metabólica conhecida por reciclar o carbono da molécula de 2PG não se sustenta, tendo em vista as muitas evidências já publicadas que contrariam essa idéia (ZELITCH et al., 2009; XU et al., 2009) e também sua estreita relação com aumentos em produtividade (ALIEYEV et al., 2012). Todas estas evidências sugerem muitas outras funções pouco conhecidas e mais complexas que o Ciclo de Calvin, bem como a conclusão que nosso conhecimento gerado é muito fragmentado (BETTI et al., 2016; TIMM et al., 2016). A necessidade de mais pesquisas sobre a relação entre fotorrespiração e a fotossíntese em ambientes adversos são eminentes.

1.2.3-Estresse oxidativo

1.2.3.1-Formação de EROs e danos

O oxigênio molecular (O_2) é indispensável às funções celulares nos organismos aeróbicos. Ele é pouco reativo e não é tóxico para os organismos aeróbicos (DEMIDCHIK, 2015). Entretanto, com a evolução de processos metabólicos aeróbicos como a fotossíntese em plantas, que ocorreram a bilhões de anos, liberando grandes quantidades de oxigênio, levaram inevitavelmente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (FOYER e NOCTOR, 2000; 2003; DEL RIO et al., 2006; GIL e TUTEJA, 2010). EROs são radicais livres do oxigênio produzidos como subprodutos normais de reações de oxidação-redução (reações redox), em vários processos metabólicos (H_2O_2 não é um radical) (DOWLING e SIMMONS, 2009).

Essas substâncias podem ser geradas como resultado de excitação, formando oxigênio singlete (1O_2), ou de sucessivas adições de elétrons ao oxigênio molecular O_2 formando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) (GILL e TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012; BARBOSA et al., 2014) (Figura 5). Quando seus níveis são baixos, são conhecidos também por atuarem como moléculas de sinalização importantes (FOYER e NOCTOR, 2003; DOWLING e SIMMONS, 2009).

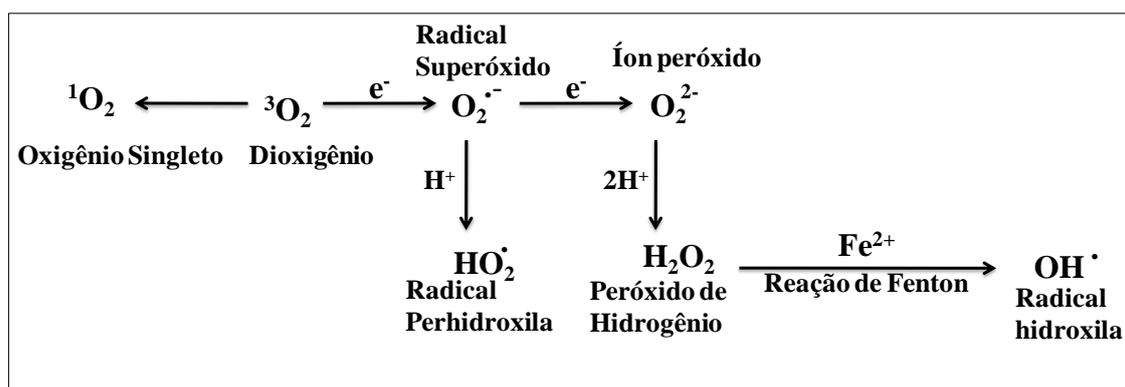


Figura 5. Principais mecanismos geradores das diferentes espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos (adaptado de GILL e TUTEJA, 2010).

O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) tem a sua formação oriunda de duas fontes. O desvio de elétrons pela cadeia de transporte de elétrons (CTA) no fotossistema I (PSI) (ASADA, 2006; TAKASHI e BAGDER, 2011), ou mesmo pelo funcionamento da enzima NADPH oxidase (MOLLER, 2007; DEMIDCHIK, 2015). Este radical atua

como um agente redutor, possui uma meia vida de 1 μ S que permite sua difusão durante alguns nanômetros, a partir do sítio de geração (MOLLER, 2007). Dessa forma, devido a sua pouca mobilidade na célula e meia vida curta não pode atingir e modificar quimicamente muitas macromoléculas biológicas, mas é uma das principais fontes de estresse oxidativo (DEMIDCHIK, 2015).

Por outro lado, o H_2O_2 é uma molécula apolar e por não possuir carga elétrica residual pode representar um problema potencialmente maior para gerar danos as células vegetais quando acumulado em excesso. A fotorrespiração é um dos principais processos metabólicos que levam a sua produção (FOYER e NOCTOR, 2003). Em peroxissomos, grandes quantidades de H_2O_2 são formadas a partir da ação da enzima glicolato oxidase (FOYER et al., 2009). Entretanto, pode também existir outras fontes, tais como a xantina oxidase (DEL RIO et al., 2006; CORPAS et al. 2008). Das EROs formadas, o H_2O_2 é ainda aquela mais instável quimicamente (DEMIDCHIK, 2015). Possui uma meia vida relativamente longa (cerca de 1 ms), com isso, sua capacidade de transporte entre membranas celulares é maior em relação a outras EROs, principalmente através de proteínas específicas chamadas de aquaporinas (BIENERT e CHAUMONT, 2014).

Essa facilidade de transporte entre membranas e suas características moleculares o torna (H_2O_2) um potente causador de estresse oxidativos e por isso o principal mecanismo de eliminação, a enzima catalase, estar presente apenas nos peroxissomos, principal sítio de sua produção (ZIMMERMAN et al., 2006; MAHANDI et al., 2010; BAUWE et al., 2010). Apesar deste efeito negativo, o H_2O_2 quando em baixas concentrações pode atuar também como uma importante molécula sinalizadora em resposta a estresses bióticos e abióticos. Por exemplo, em resposta ao ataque de patógenos (DOWLING e SIMMONS, 2009; MITTLER et al., 2011), e regulação de genes em respostas a estresses ambientais como a seca (ISHIBASHI et al., 2011).

Em estudo conduzido por Ishibashi et al., (2011) foi evidenciado o papel promissor do H_2O_2 quando aplicado de forma exógena para induzir respostas aclimatativas a seca. Todos as EROs que são geradas, o radical hidroxila (OH^\bullet) tem a maior capacidade de danificar moléculas biológicas, como DNA e proteínas. Essa capacidade é atribuída principalmente à alta reatividade desse radical com os diferentes componentes celulares (MOLLER, 2007). As plantas não evoluíram mecanismos de defesa contra este radical, daí a única forma de evitar os danos ocasionados é evitar a concentração de íons como Fe^{+2} e Cu^{+2} que podem levar sua geração pela reação de

Fenton (MOLLER, 2007; DEMIDCHK, 2015). No século 19 foi descoberto que essa reação é o centro da biossíntese deste radical. Ele é formado a partir de reações com metais de transição Fe^{+2} e Cu^{+2} na presença de H_2O_2 (GOLDSTEIN et al., 1993). Em organismos fotossintéticos a geração de EROs ocorre principalmente em três organelas: cloroplastos, peroxissomos e mitocôndria (APEL e HIRT, 2004).

No cloroplasto, durante a fotossíntese, se constitui uma importante fonte de produção de EROs. Os fotossistemas PSI e PSII que formam os núcleos do sistema de coleta de luz na membrana dos tilacóides são os principais locais desta produção (ASADA, 2006; DAS e ROYCHOUDHURY, 2014). O oxigênio gerado durante a fotossíntese pode aceitar elétrons a partir dos fotossistemas, resultando na formação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Consecutivamente, na presença de metais de transição como Fe^{+2} e Cu^{+2} , juntamente com o H_2O_2 pode formar o radical hidroxila pela reação de Fenton (DAS e ROYCHOUDHURY, 2014; DELMIDCHIK, 2015). Dessa forma, levando a danos permanentes em componentes celulares (MOLLER, 2007).

Já os peroxissomos, uma organela subcelular, é considerada também um sítio importante de produção de EROs (GILL e TUTEJA, 2010), e o maior na geração de H_2O_2 (FOYER e NOCTOR, 2003). Nesta reação, o glicolato produzido pela oxigenação da ribulose-1,5 bifosfato (Rubisco) é oxidado a glioxilato pela oxidase glicolato, produzindo grandes quantidades de H_2O_2 em uma etapa intermediária da via fotorrespiratória (FOYER e NOCTOR; 2003; DEL RIO et al., 2006). Desta forma, justifica-se o porquê da presença exclusiva da enzima catalase nesta organela, enzima responsável pelo maior mecanismo de eliminação de H_2O_2 (FOYER e NOCTOR, 2003).

Por outro lado, nas mitocôndrias apesar da geração das EROS (H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$) ocorrer em menor escala, comparado com as outras organelas, estes são também prejudiciais ao funcionamento celular. Mitocôndrias em plantas são diferentes das que ocorrem em animais, principalmente por estar envolvidas em processos metabólicos diferentes, como a fotossíntese e fotorrespiração (DAS e ROYCHOUDHURY, 2014). Por exemplo, em plantas sob moderada a alta intensidade luminosa a formação de H_2O_2 em cloroplastos e peroxissomos pode ser cerca de 30 a 100 vezes maior que em mitocôndrias (FOYER e NOCTOR, 2003). Um dos maiores sítios de produção de EROs em mitocôndrias é a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Ela possui energia

suficiente para reduzir o O_2 para outras formas de EROs nos Complexo I e III, como H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ (DAS e ROYCHOUDHURY, 2014).

Embora o $O_2^{\cdot-}$ seja uma das principais EROs produzidos na mitocôndria, ele é convertido em H_2O_2 pela isoforma da superóxido dismutase dependente de manganês (Mn-SOD), presente nessa organela, a qual é considerada a primeira linha de defesa enzimática antioxidante (SHARMA et al., 2012). Condições de estresses abióticos, tais como, seca, calor e excesso de luz, condições que limitam a assimilação CO_2 no ciclo de Calvin, podem aumentar a produção de EROs levando a danos permanentes nos vários componentes celulares, como oxidação de lipídios de membrana, DNA e proteínas (MITLLER, 2002; APEL e HIRT, 2004; MOLLER, 2007; GILL e TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012).

1.2.3.2-Proteção oxidativa

Os efeitos dos produtos da redução parcial do oxigênio molecular (O_2) nos organismos aeróbicos e fotossintéticos, acredita-se ser o estresse mais antigo do planeta. As plantas têm freqüentemente lidado por pelo menos 1,7 bilhões de anos com estas formas de oxigênio desde que iniciou a produção de O_2 a partir do CO_2 e H_2O (DOWLING e SIMMONS, 2009; DEMIDCHIK, 2015). Interessantemente, as plantas desenvolveram a capacidade de empregar o estresse oxidativo para necessidades de sinalização, regulação de crescimento, detecção de hormônios e agentes reguladores (DEMIDCHIK, 2015). Além disso, como parte do processo evolutivo, desenvolveu também mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos para evitar a acumulação destas EROs e consequente danos celulares (MITLLER, 2002; GILL e TUTEJA, 2010; XU et al., 2013; BARBOSA et al., 2014).

O sistema não enzimático é constituído principalmente por componentes hidrofílicos, como o ácido ascórbico (ASA) e a glutathiona (GSH), enquanto que a proteção enzimática é composta por um complexo sistema de enzimas, presentes em várias organelas e atuando de forma coordenada na proteção oxidativa. As principais enzimas oxidativas são a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase de ascorbato (APX), a redutase da glutathiona (GR), a redutase do monodeidroascorbato (MDHAR) e redutase do deidroascorbato (DHAR) (FOYER e NOCTOR, 2003; SGGIBA et al., 2015).

1.2.3.2.1-Enzimáticos

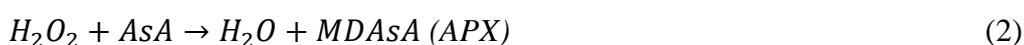
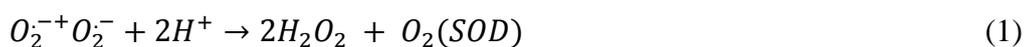
As enzimas são essenciais para vida dos organismos vivos. Elas catalisam reações químicas e mediam todas as reações bioquímicas que constituem a vida. Enzimas antioxidantes estão presentes em diferentes compartimentos celulares (cloroplasto, mitocôndria, peroxissomo, membrana plasmática, e contribuem para evitar o acúmulo das EROs em plantas, o que confere um estado de homeostase (equilíbrio) redox no sistema (MITLLER, 2002; BARBOSA et al., 2014; SGGOBA et al., 2015). Fazem parte do complexo de defesa enzimático de alta afinidade para EROs específicos, algumas enzimas oxidativas principais como; superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), peroxidase do ascorbato (APX; EC 1.11.1.11) e catalase (CAT; EC 1.11.1.6) (APEL e HIRT, 2004; XU et al., 2013).

O mecanismo de defesa enzimático é composto pelo sistema SOD-CAT-APX, que atuam de forma coordenada para promover o equilíbrio redox no meio celular que é perturbado pelo acúmulo dos EROs. A dismutase do superóxido (SOD) está presentes em todos os organismos aeróbicos e se constitui a primeira linha de defesa em condição de estresse. Estão em variados compartimentos celulares, como as citosólicas (Cu-Zn-SOD), mitocondrial (Mn-SOD) e cloroplastídica (Fe-SOD) (DAS e ROYCHOUDHURY, 2014). Todas estas isoformas oxidam o radical $O^{\bullet-}$ a H_2O_2 e O_2 (Eq. 1). Este radical é gerado na etapa fotoquímica da fotossíntese, quando a energia na forma fótons são maiores que a capacidade de absorção. Como consequência, os elétrons são desviados para o oxigênio molecular em cloroplastos gerando $O^{\bullet-}$ (ASADA, 2006; TAKASHI e MURATA, 2008; DEMIDCHIK, 2015).

Em seguida, a peroxidase do ascorbato (APX) com o auxílio de um importante agente redutor, o ascorbato (ASA), desintoxifica o meio do acúmulo de H_2O_2 em organismos fotossintéticos (SHIGEOKA et al., 2002). Esta enzima utiliza o ascorbato como doador de elétrons para reduzir o peróxido de hidrogênio a H_2O e O_2 (Eq. 2). Como produtos destas reações são gerados formas oxidadas do ascorbato, que através da ação de enzimas redutoras, a forma reduzida é regenerado (SHIGEOKA et al., 2002).

Por outro lado, as catalases dentre as enzimas antioxidantes, são as únicas que não exigem equivalentes redutores celulares, como a APX. Mesmo assim, as mesmas têm uma taxa de degradação muito rápida do peróxido, mas uma afinidade muito mais baixa comparada a APX (SHARMA et al., 2012). É uma enzima que catalisa a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 (Eq. 3). As catalases só conseguem enxergar o

peróxido em concentrações na ordem de (mM), sendo a linha de defesa mais importante para remover o H₂O₂ em condições fotorrespiratórias (ZHANG et al., 2016). Esta enzima tem uma baixa afinidade comparada a outras peroxidases como as APX, que identifica o peróxido em concentrações muito baixas (µM), podendo ser responsável por modular processos de sinalização (MITTLER, 2002). Os peroxissomos são importantes locais de produção de H₂O₂ quando o glicolato é oxidado a glioxilato pela enzima glicolato oxidase na via fotorrespiratória (FOYER et al., 2009; SHARMA et al., 2012).



1.2.3.2.2-Não enzimáticos

Entre os metabólitos não enzimáticos, o ascorbato (ASA) e a glutathiona (GSH) são os mais importantes para defesa e tolerância das plantas a condições ambientais adversas (SGOBBA et al., 2015). Além destes, existe outros, como os flavonóides, alcalóides, compostos fenólicos e carotenóides (SHIGEOKA et al., 2002; SHARMA et al., 2012). Esses antioxidantes podem atuar tanto como cofatores de enzimas antioxidativas ou também desintoxicar os EROs diretamente (SHARMA et al., 2012). Essa ação direta na eliminação dos EROs faz com que passe da forma reduzida para oxidada, e através de enzimas redutoras sua forma reduzida é regenerada (MITLLER et al., 2002).

O ASA é o mais abundante antioxidante de baixo peso molecular (FOYER e NOCTOR, 2011). Tem um papel fundamental na defesa contra os estresses oxidativos causado por níveis elevados de EROs e é considerado um excelente antioxidante pelas inúmeras reações em que participa (SHIGEOKA et al., 2002; FOYER e NOCTOR, 2011; GEST et al., 2013). Animais e plantas empregam diferentes vias de síntese de ASA. Em plantas, por uma série de reações bioquímicas, o ascorbato é sintetizado na mitocôndria por L-galactono-γ-lactona desidrogenase (FOYER e NOCTOR, 2011) e é transportado para os outros componentes celulares.

Nas células, o ASA estar presente em maior concentração nos peroxissomos, cerca de 22,8 mM, organela considerada a maior de produtora de H₂O₂ durante a

fotorrespiração (FOYER e NOCTOR, 2003; GEST et al., 2013). Esta molécula é envolvida em diversos processos fisiológicos como fotoproteção, biossíntese de compostos essenciais e em várias fases do desenvolvimento vegetal (GILL e TUTEJA, 2010; FOYER e NOCTOR, 2012; GEST et al., 2013). Relacionados à fotoproteção, pode eliminar o H_2O_2 via APX, ou de forma direta eliminar $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} e 1O_2 (SMIRNOFF, 1996; FOYER e NOCTOR, 2012). Adicionalmente, pode também doar elétrons para o fotossistema II(PSII) e também atuar como um cofator para violaxantina de-epoxidase no ciclo das xantofilas (GEST et al., 2013).

Destas muitas funções do ascorbato, todas estão diretamente relacionadas com a fotossíntese. Além disso, nos cloroplastos, APXs são particularmente sensíveis a inibição por concentrações baixas de ascorbato (FOYER e NOCTOR, 2011; GEST et al., 2013). No cloroplasto, a remoção do H_2O_2 via o ciclo ASA-GSH é um importante mecanismo na proteção oxidativa (MITTLER, 2002; TAKASHI e MURATA, 2008). Neste ciclo, a APX utiliza o ASA como doador de elétrons para reduzir o H_2O_2 a água produzindo monodehidroascorbato (MDHA). Subsequentemente pela ação da monodehidroascorbato redutase, que usa o NADH como doador de elétrons regenera na forma reduzida o ASA (SHIGEOKA et al., 2002; ASADA, 2006; SHARMA et al., 2012)(Figura 6).

Estudos têm demonstrado seu importante papel na defesa de plantas contra estresses bióticos e também contra estresse oxidativos. Por exemplo, reduções nos níveis de ASA podem diminuir a resistência de plantas em resposta a ataque de patógenos (PAVET et al., 2005). Esses estudos sugerem que os aumentos nos níveis de ASA podem conferir tolerância a estresses bióticos. Em relação a estresses abióticos, pesquisadores usando mutantes de *Arabidopsis thaliana*, têm demonstrado que quando os níveis de ascorbato diminuem em folhas, é um indicativo de senescência prematura (BARTH et al., 2004). Outros estudos têm mostrado também que os níveis de ASA são alterados em respostas a vários estresses como a seca, e que plantas de trigo quando aclimatadas a seca, exibem um eficiente mecanismo antioxidante reduzindo o dano celular na raiz (SELOTE e KHANNA-CHOPRA, 2010).

Esses resultados sugerem que o aumento nos níveis de ascorbato em plantas pode também conferir tolerância a estresses abióticos como também foi demonstrado por Hemavathi et al., (2009). Semelhante ao ascorbato, a glutathione (GSH) também é um antioxidante solúvel em água, e muito abundantes em plantas (FOYER e NOCTOR, 2011). O Tripeptídeo glutathione (γ glu-cys-gly) também é um dos metabólitos essenciais

em plantas para defesa contra danos oxidativos. Sua presença em tecidos de plantas ocorre principalmente na sua forma reduzida (GSH) e é localizado em todos os compartimentos celulares como citosol, retículo endoplasmático, vacúolo, mitocôndria, cloroplasto, peroxissomo e também no apoplasto (JIMENEZ et al., 1998).

Em plantas, os tecidos metabolicamente ativos como os cloroplastos possuem concentrações relativamente altas de GSH, cerca de 4,5 mM (FOYER e NOCTOR, 2005). Esta molécula desempenha importantes funções em processos fisiológicos como, transdução de sinais, conjugação de metabólitos, eliminação de EROs e também a expressão de genes em respostas a estresses (LEISINGER et al., 2001; FOYER e NOCTOR, 2005). Quando sintetizado, GSH funciona como substrato para múltiplas reações celulares que geram como produto destas reações a forma oxidada (GSSG). O balanço entre as formas GSH e GSSG desempenha um importante papel no balanço redox nas células (GILL e TUTEJA, 2010). A forma oxidada é regenerada pela ação da peroxidase de glutathione (GR) que consome NADPH na reação. Em adição, pode também participar na regeneração do ASA através da enzima deidroascorbato redutase (DHAR) (Figura 6).

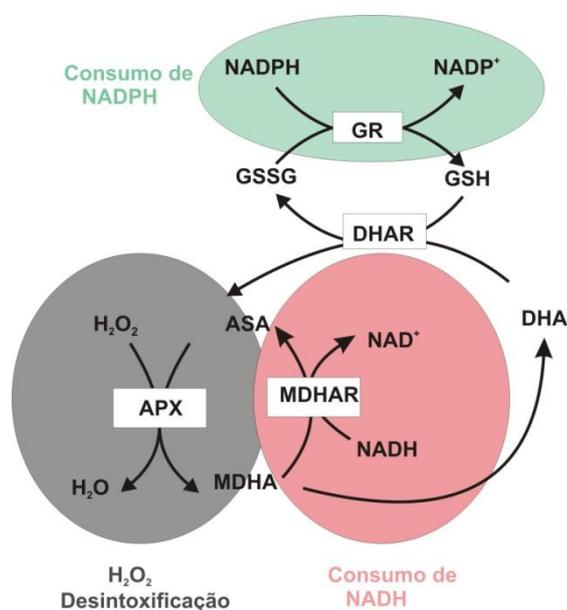


Figura 6. O ciclo de Ascorbato-Glutationa atua na desintoxicação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em H_2O através da ação da peroxidase de ascorbato (APX) (adaptado de GEST et al., 2013).

Recentes estudos com mutantes de *Arabidopsis thaliana*, têm confirmado a importância da GSH na proteção oxidativa em plantas sob condição de estresse. Nesse estudo, mutantes deficientes em glutathione (GSH) apresentaram distúrbios fenotípicos e acentuado estresse oxidativo. Com isso, mecanismos compensatórios foram induzidos pelo aumento da atividade de enzimas oxidativas, como o sistema SOD-CAT-APX em resposta ao estresse (JOZEFCAK, et al., 2015). Nas plantas, a presença destes antioxidantes (ASA e GSH) em tecidos metabolicamente ativos são cruciais na proteção oxidativa e regulação de processos fisiológicos essenciais como a fotossíntese. Todo o conhecimento produzido até hoje, mostraram a importância e funcionalidade dos mecanismos antioxidativos na tolerância da célula a fatores ambientais adversos.

1.3-O MODELO VEGETAL (*Oryza sativa* L.)

O arroz é um dos cereais mais importantes do mundo (FURUTA et al., 2015). Possui duas espécies cultivadas em todo o mundo, o arroz asiático, *Oriza sativa*, e o arroz africano, *Oriza glaberrima*, que é cultivado em escala limitada no Oeste da África (KUSH, 1997). Destas espécies citadas acima, a espécie *O. sativa* destaca-se por ser de grande importância para alimentação humana. Acredita-se que tenha sido domesticado a cerca de 8.000 anos atrás (FURUTA et al., 2015), diferente da espécie *O. glaberrima*, domesticado a cerca de 3.500 anos (LI et al., 2011). Esta domesticação levou a diferenciação varietal em duas principais subespécies de *O. sativa*, o *indica* e *japonica* (VAUGHAN et al., 2003).

A espécie *Oryza sativa* pertence a Divisão Magnoliophyta (Angiospermae), Classe Liliopsida (Monocotiledônea), Ordem Poales, Família Poaceae (Gramineae), Subfamília Oryzoideae (Bambusoideae), Tribo Oryzeae, Gênero *Oryza*. Estas duas subespécies devido aos processos de domesticação possuem características morfológicas distintas, como por exemplo, relacionados aos grãos. A subespécie *O. Sativa indica* possui grãos longos e finos diferente da *O. Sativa japonica* que possui grãos largos. Além disso, o *indica* é predominante em regiões onde o clima varia de tropical a subtropical, como toda a Ásia tropical. Por outro lado, a subespécie *japonica* apresenta variedades tropicais e temperadas, e é cultivado no Leste Asiático, América do Norte, América Latina, Norte da África e Europa.

No Brasil estas subespécies (*japonica* e *indica*) foram introduzidas pelos portugueses e os espanhóis levaram para outros países da América Latina. Assim, a

maioria das variedades de sequeiro que foram introduzidas no Brasil foram *Japonica* e das terras baixas variedades que pertencem ao grupo *indica* (KUSH, 1997). O arroz juntamente com o trigo e algumas leguminosas, representam uma parte importante da dieta do Brasil e do mundo. É uma excelente fonte de energia devido à alta concentração de amido, fornecendo também proteínas, vitaminas e minerais, e possui baixo teor de lipídios (WALTER et al., 2008).

O sistema de produção no Brasil onde o arroz é cultivado compreende dois tipos, o de várzeas, irrigado por inundação controlada, e o de terras altas, também conhecido por sequeiro, com ou sem irrigação por aspersão. Quando cultivado sob condições de seca, sua produção é comprometida, pela ocorrência deste fator abiótico que freqüentemente ocorre associado com calor e alta luminosidade (MITLLER e BLUMWALD, 2010). Esses fatores isolados ou combinados causam impactos negativos em processos metabólicos essenciais, como a fotossíntese, primeiro processo a ser afetado nestas condições (LIU e HUANG, 2008; SGOBBA et al., 2015; YUAN et al., 2016; ZHOU et al., 2007; SILVA et al., 2010).

Foram obtidos aumentos em produtividades para cereais como o arroz durante a revolução verde mediante variedades melhoradas (EVANS, 2013). Entretanto, acredita-se que ganhos em rendimento nos últimos anos praticamente não ocorreram (ZHU et al., 2010). O foco agora é melhorar a fotossíntese, processo que ainda é ineficiente para resolver este problema (BETTI et al., 2016). Em plantas C3, um processo que compete com a fotossíntese e limita a produtividade das culturas é a fotorrespiração (FOYER et al., 2009) e tem sido alvo de pesquisas importantes, principalmente a enzima oxidase do glicolato, que efetua um passo essencial na via fotorrespiratória (KEBEISH et al., 2007; FAHNENSTICH et al., 2008; MAIER et al., 2012). Entretanto, sua relação com a fotossíntese e metabolismo oxidativo ainda não são claros fazendo-se necessárias mais pesquisas (TIMM et al., 2016).

O arroz é um modelo vegetal utilizado recentemente em estudos de fisiologia vegetal visando elucidar mecanismos regulatórios do metabolismo primário (XU et al., 2009; LU et al., 2014) e de processos associados com sinalização/danos celulares (SOUSA et al., 2015; ZHANG et al., 2016). O arroz (*Oryza sativa L., spp. japonica*) foi a primeira espécie vegetal dos cereais de importância econômica a ter o genoma completamente seqüenciado (GOFF et al., 2002). Esse seqüenciamento permitiu estudos mais aprofundados acerca de processos celulares envolvendo a expressão e manipulação

gênica (RIBEIRO et al., 2012; PASSAIA et al., 2014) bem como respostas metabólicas (CAVERZAN et al., 2014).

Esses estudos têm contribuído para o entendimento dos distúrbios celulares causados por fatores ambientais adversos sobre o crescimento de espécies vegetais de importância econômica. A maior parte do entendimento acerca dos processos celulares relacionados com a performance das plantas frente aos impactos ambientais foi obtida a partir de *Arabidopsis thaliana*, a primeira espécie com genoma sequenciado (SOMERVILLE, 2001). No entanto, essa espécie possui genoma relativamente simples se comparado a espécies agrícolas, tendo limitado a extrapolação de resultados envolvendo respostas celulares a fatores abióticos para plantas com genomas mais complexos (POETHIG, 2001). Por exemplo, estudos com plantas de arroz têm mostrado que essa espécie possui respostas metabólicas e mecanismos fisiológicos diferentes de *Arabidopsis thaliana* para lidar com estresses abióticos, como calor e excesso de luz (BONIFÁCIO et al., 2011).

Esses estudos mostram que plantas de arroz são relativamente mais tolerantes ao estresse oxidativo que plantas de *Arabidopsis thaliana*, por possuírem diversos genes que codificam proteínas envolvidas em processos similares, possibilitando mecanismos compensatórios. Por exemplo, o duplo silenciamento de isoformas de peroxidase do ascorbato (APX1/2), resultou em aumento nos níveis de antioxidantes não enzimáticos, ascorbato e glutathione e também enzimáticos como a CAT e GPX. Além disso, esses mutantes exibiram uma taxa fotossintética e eficiência fotoquímica semelhante às plantas não transformadas (BONIFÁCIO et al., 2011). O arroz é uma gramínea C3, e diferente de plantas C4 como o milho, possui uma alta atividade fotorrespiratória. Segundo Ueno et al., (2005), a atividade da enzima chave da via fotorrespiratória, glicolato oxidase, em arroz é cerca de 12 vezes maior quando comparadas com milho. Por estas características, a espécie vem sendo considerada um bom modelo vegetal para estudos relacionados à fotossíntese e metabolismo oxidativo.

2-JUSTIFICATIVA E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

As plantas necessitam de condições ambientais adequadas para crescer, desenvolver e expressar seu potencial agrícola. Entretanto, devido ao seu estilo de vida sésil, são continuamente expostas a uma ampla gama de pressões ambientais que perturbam seu potencial genético para produção. Destas pressões ambientais, a seca,

calor e luminosidade elevada têm sido bastante estudados nos últimos anos pelos prejuízos causados a agricultura no mundo todo (MITTLER e BLUMWALD, 2010; CRAMER et al., 2011). Resultado destes estudos tem demonstrado consistentemente que estes estresses abióticos promovem intensos impactos no metabolismo vegetal, e que um dos primeiro processo a ser afetado nestas condições é a fotossíntese, reduzindo sua eficiência consideravelmente (LIU e HUANG, 2008).

Essa diminuição é atribuída em parte ao aumento da atividade fotorrespiratória, processo metabólico que compete com a fotossíntese e trás grandes prejuízos a produtividade das culturas (FOYER et al., 2009). Em plantas, a Rubisco é a enzima responsável pela fixação de carbono na fotossíntese, e apesar de ser a proteína mais abundante em tecidos fotossintéticos possui uma característica bifuncional. Esta proteína pode catalisar tanto a carboxilação da molécula de CO₂, quanto a oxigenação, que é o consumo de O₂. Todos os estresses citados acima favorecem a atividade oxigenase, induzindo o aumento da fotorrespiração e reduzindo o ganho líquido de carbono pela fotossíntese (VOSS et al., 2013; PETERHANSEL e MAURINO, 2011).

O estresse hídrico causa fechamento estomático e conseqüentemente redução da condutância estomática, afetando os processos de trocas gasosas e dificultando o influxo de CO₂ da atmosfera para os sítios de carboxilação da Rubisco (VOSS et al., 2013). Como resultado, reduz a assimilação líquida de CO₂ diminuindo a concentração do principal acceptor de elétrons, o NADP⁺ (TAKASHI e MURATA et al., 2008). A diminuição do NADP⁺ leva a um desvio de elétrons para redução do O₂ a formas tóxicas, comprometendo a geração de ATP e NADPH e conseqüente restrição fotossintética. Por outro lado, o calor aumenta a solubilidade do CO₂ na água em menor intensidade se comparada com a solubilidade do O₂ nas mesmas condições.

Esse fato torna o oxigênio mais disponível que o CO₂ para o sítio catalítico da Rubisco, favorecendo a atividade oxigenase e o aumento da fotorrespiração (PETERHANSEL E MAURINO et al., 2011). Além disso, o excesso de calor pode afetar as propriedades cinéticas da Rubisco, que juntamente com a maior proporção atmosférica de O₂ (21%) em relação ao CO₂ (0,04%) são condições que favorecem também a atividade oxigenase (WHITNEY et al., 2011).

Esses efeitos podem se tornar ainda mais intensos sob condições de excesso de luminosidade. Nessas condições, a captação continuada de luz pode sobrecarregar a cadeia de transporte de elétrons no cloroplasto, e a via fotorrespiratória pode atuar como uma rota alternativa para dissipação de energia e proteção contra estresses (VOSS et al.,

2013). Além destes efeitos na fixação de CO₂, ocasiona também a interrupção da homeostase celular redox, aumentando a produção de EROs e conseqüentemente estresse oxidativo (MOLLER, 2007). A geração de EROs ocorre principalmente pela atividade da glicolato oxidase (GO) que desempenha um passo essencial na fotorrespiração. Ela oxida o glicolato, produzido pela atividade de oxigenase da Rubisco, em glioxilato gerando como produto peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nos peroxissomos (BARBOSA et al., 2014).

Essa espécie reativa de oxigênio possui a capacidade de danificar moléculas biológicas importantes como DNA, proteínas e oxidação de lipídio de membranas (DEMIDCHIK, 2015). A fotorrespiração está presente tanto em plantas C₃ (XU et al., 2009) quanto em plantas C₄ (ZELITCH et al., 2009). Entretanto, esta via é mais intensa em plantas C₃ (TIMM et al., 2016; BETTI et al., 2016). Por exemplo, uma espécie C₃ como o arroz tem uma atividade da glicolato oxidase (GO) cerca de 12 vezes maior que uma planta C₄, como o milho (UENO et al., 2005). Assim, esses estresses abióticos isoladamente, déficit hídrico, temperatura elevada e luminosidade excessiva, representam estímulos potenciais para a indução da atividade fotorrespiratória em plantas.

No campo, as plantas estão sujeitas a combinação de um, dois ou mais estresses levando a respostas complexas (PRASCH e SONNEWALD, 2015). Além disso, nessas condições a presença de um desses fatores pode interagir e potencializar os efeitos adversos dos demais estresses no metabolismo celular. Desta forma, é eminente a necessidade de culturas mais tolerantes a essas pressões (estresses combinados), porque a população cada vez mais requer das culturas maiores produtividades (RAINES, 2011; ZISKA et al., 2012) e principalmente num cenário mundial de mudanças climáticas (MITTLER e BLUMWALD, 2010; LI et al., 2013). Segundo projeções, essas mudanças ocorrerão, por exemplo, com amplitudes de seca acompanhadas por temperaturas elevadas (IPCC, 2008). Portanto, faz necessário a investigação do impacto destes fatores abióticos combinados na eficiência fotossintética e também entender os mecanismos de proteção oxidativa (enzimáticos e não enzimáticos) que as plantas desenvolveram para se adaptar nestas condições.

3-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIYEV, J. A. Photosynthesis, photorespiration and productivity of wheat and soybean genotypes. **Physiologia Plantarum**, v. 145, p. 369-383, 2012.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 373-99, 2004.

ARAUS, J. L.; SLAFER, G. A.; ROYO, C.; SERRET, M. D. Breeding for Yield Potential and Stress Adaptation in Cereals. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 27, p. 377-412, 2008.

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

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206-216, 2007.

ASHRAF, M. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 169-183, 2010.

ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 3523-3544, 2012.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.44, p. 453-460, 2014.

BARTH, C.; MOEDER, W.; KLESSIG, D. F.; CONKLIN, P. L. The Timing of Senescence and Response to Pathogens Is Altered in the Ascorbate-Deficient Arabidopsis Mutant vitamin c⁻¹. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1784-1792, 2004.

BAUWE, H., HAGEMANN, M., FERNIE, A. R. Photorespiration: players, partners and origin. **Trends in Plant Science**, v.15, p. 330-336, 2010.

BAUWE, H.; HAGEMANN, M.; KERN, R.; TIMM, S. Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v.15, p. 269-275, 2012.

BAKER, N. R.; Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 59, p. 89-113, 2008.

BETTI, M.; BAUWE, H.; BUSCH, F. A.; FERNIE, A. R.; KEECH, O.; LEVEY, M.; ORT, D. R.; PARRY, M. A. J.; SAGE, R.; TIMM, S.; WALKER, B.; WEBER, A. P. M. Manipulating photorespiration to increase plant productivity: recent advances and perspectives for crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 2977-2988, 2016.

BIENERT, G. P.; CHAUMONT, F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, p. 1596-1604, 2014.

BITA, C. E.; GERATS, T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 1-18, 2013.

BONIFACIO, A.; MARTINS, M. O.; RIBEIRO, C. W.; FONTENELE, A. V.; CARVALHO, F. E. L.; MARGIS-PINHEIRO, M.; SILVEIRA, J. A. V. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, p. 1705-1722, 2011.

CARVALHO, J. F. C.; MADGWICK, P. J.; POWERS, S. J.; KEYS, A. J.; LEA, P. J.; PARRY, M. A. J. An engineered pathway for glyoxylate metabolism in tobacco plants aimed to avoid the release of ammonia in photorespiration. **BMC Biotechnology**, p. 2-17, 2012.

CARVALHO, F. E. L.; RIBEIRO, C. W.; MARTINS, M. O.; BONIFACIO, A.; STAATS, C. C.; ANDRADE, C. M. B.; CERQUEIRA, J. V.; MARGIS-PINHEIRO, M.; SILVEIRA, J. A. G. Cytosolic APX knockdown rice plants sustain photosynthesis by regulation of protein expression related to photochemistry, Calvin cycle and photorespiration. **Physiologia Plantarum**, v. 150, p. 632-645, 2014.

CASTIGLIONI, P.; WARNER, D.; BENSON, R. J.; ANSTROM, D. C.; HARRISON, J.; STOECKER, M.; ABAD, M.; KUMAR, G.; SALVADOR, S.; D'ORDINE, R.; NAVARRO, S.; BACK, S.; FERNANDES, M.; TARGOLLI, J.; DASGUPTA, S.; BONIN, C.; LUETHY, M. H.; HEARD, J. Bacterial RNA Chaperones Confer Abiotic Stress Tolerance in Plants and Improved Grain Yield in Maize under Water-Limited Conditions. **Plant Physiology**, v. 147, p. 446-455, 2008.

CAVERZAN, A.; BONIFACIO, A.; CARVALHO, F. E. L.; ANDRADE, C. M. B.; PASSAIA, G.; SCHÜNEMANN, M.; MARASCHIN, F. S.; MARTINS, M. O.; TEIXEIRA, F. K.; RAUBER, R.; MARGIS, R.; SILVEIRA, J. A. G.; MARGIS-PINHEIRO, M. The knockdown of chloroplastic ascorbate peroxidases reveals its regulatory role in the photosynthesis and protection under photo-oxidative stress in rice. **Plant Science**, v. 214, p.74-87, 2014.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plants responses to drought-from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 239-264, 2003.

CIFRE, J.; BOTA, J.; ESCALONA, J. M.; MEDRANO, H.; FLEXAS J. Physiological tools for irrigation scheduling in grapevine (*Vitis vinifera* L.)An open gate to improve water-use efficiency? **Agriculture, Ecosystems and Environment**., v. 106, p. 159-170, 2005.

CIAIS, PH.; REICHSTEIN, M.; VIOVY, N.; GRANIER, A.; OGEE, J.; ALLARD, V.; AUBINET, M.; BUCHMANN, N.; BERNHOFER, CHR.; CARRARA, A.; CHEVALLIER, F.; NOBLET, N.; FRIEND, A. D.; FRIEDLINGSTEIN, P.; GRUNWALD, T.; HEINESCH, B.; KERONEN, P.; KNOHL, A.; KRINNER, G.; LOUSTAU, D.; MANCA, G.; MATTEUCCI, G.; MIGLIETTA, F.; OURCIVAL, J. M.; PAPALE, D.; PILEGAARD, K.; RAMBAL, S.; SEUFERT, G.; SOUSSANA, J. F.; SANZ, M. J.; SCHULZE, E. D.; VESALA, T.; VALENTINI, R. Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. **Nature**, v. 437, p. 529-533, 2005.

CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; VALDERRAMA, R.;BARROSO, J. B.; RIO, L. A. D. Peroxisomal xanthine oxido reductase: Characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves, **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1319-1330, 2008.

CRAMER, G. R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, v. 11, p. 2-14, 2011.

DALAL, J.; LOPEZ, H.; VASANI, N. B.; HU, Z.; SWIFT, J. E.;YALAMANCHILI, R.; DVORA, M.; LIN, X.; XIE, D.; QU, R.; SEDEROFF, H. W. A photorespiratory bypass increases plant growth and seed yield in biofuel crop *Camelina sativa*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 2-22, 2015.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Environmental Science**, v. 2; p. 1-13, 2014.

DELUC, L. G.; QUILICI, D. R.; DECENDIT, A.; GRIMPLET, J.; WHEATLEY, M. D.; SCHLAUCH, K. A.; MÉRILLON, J. M.; CUSHMAN, J. C.; CRAMER, G. R. Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. **BMC Genomics**, v. 10, p. 1-33, 2009.

DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; BARROSO, J. B. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling, **Plant Physiology**, v. 141, p. 330-335, 2006.

DEMIREVSKA, K.; SIMOVA-STOILOVA, L.; FEDINA, I.; GEORGIEVA, K; KUNERT, K. Response of oryza cystatin I transformed tobacco plants to drought, heat and light stress. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 196, p. 90-99, 2010.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212-228, 2015.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution, **Proc. R. Soc. Part B, Biol. Sci.**, v. 276, p. 1737-1745, 2009.

EVANS, J. R. Improving Photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 162, p. 1780-1793, 2013.

FAHNENSTICH, H.; SCARPECI, T. E.; VALLE, E. M.; FLUGGE, U. I.; MAURINO, V. G. Generation of Hydrogen Peroxide in Chloroplasts of *Arabidopsis* Overexpressing Glycolate Oxidase as an Inducible System to Study Oxidative Stress. **Plant Physiology**, v. 148, p. 719-729, 2008.

FERREIRA-SILVA, S. L.; VOIGT; E. L.; SILVA, E. N.; MAIA, J. M.; ARAGÃO, T. C. R.; SILVEIRA, J. A. G. Partial oxidative protection by enzymatic and non-enzymatic components in cashew leaves under high salinity. **Biologia Plantarum**, v. 56, p. 172-176, 2012.

FOYER, C., NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytol.**, v. 146, p. 359-388, 2000.

FOYER, C.H., NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355-364, 2003.

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, p. 93-100, 2011.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, 1056-1071, 2005.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications, **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, p. 862-868, 2009.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub, **Plant Physiology**, v. 155, p. 2-18, 2011.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Managing the cellular redox hub in photosynthetic organisms. **Plant, Cell and Environment**, v. 35, 199-201, 2012.

FURUTA, T.; KOMEDA, N.; ASANO, K.; UEHARA, K.; GAMUYAO, R.; ANGELES-SHIM, R. B.; NAGAI, K.; DOI, K.; WANG, D. R.; YASUI, H.; YOSHIMURA, A.; WU, J.; MCCOUCH, S. R.; ASHIKARI, M. Convergent Loss of Awn in Two Cultivated Rice Species *Oryza sativa* and *Oryza glaberrima* Is Caused by Mutations in Different Loci. **G3 Genes/Genoms/ Genetics**, v. 5, p. 2267-2274, 2015.

GALMÉS, J.; ARANJUELO, I.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. **Photosynth Res**, v. 117, p. 73-90, 2013.

GEST, N.; GAUTIER, H.; STEVENS, R. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 695-709, 2013.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GOFF, S. A.; RICKE, D.; LAN, T-H.; PRESTING, G.; WANG, R.; DUNN, M.; GLAZEBROOK, J.; SESSIONS, A.; OELLER, P.; VARMA, H.; HADLEY, D.; HUTCHISON, D.; MARTIN, C.; KATAGIRI, F.; LANGE, B. M.; MOUGHAMER, T.; XIA, Y.; BUDWORTH, P.; ZHONG, J.; MIGUEL, T.; PASZKOWSKI, U.; ZHANG, S.; COLBERT, M.; SUN, W-L; CHEN, L.; COOPER, B.; PARK, S.; WOOD, T. C.; MAO, L.; QUAIL, P.; WING, R.; DEAN, R.; YU, Y.; ZHARKIKH, A.; SHEN, R.; SAHASRABUDHE, S.; THOMAS, A.; CANNINGS, R.; GUTIN, A.; PRUSS, D.; REID, J.; TAVTIGIAN, S.; MITCHELL, J.; ELDREDGE, G.; SCHOLL, T.; MILLER, R. M.; BHATNAGAR, S.; ADEY, N.; RUBANO, T.; TUSNEEM, N.; ROBINSON, R.; FELDHAUS, J.; MACALMA, T.; OLIPHANT, A.; BRIGGS, S. Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). **Science**, v. 296, p. 92-100, 2002.

GOLDSTEIN, S.; MEYERSTEIN, D.; CZAPSKI, G. The Fenton Reagents, **Free Radical Biology & Medicine**, v. 15, p. 435-445, 1993.

GORNALL, J.; BETTS, R.; BURKE, E.; CLARK, R.; CAMP, J.; WILLETT, K.; WILTSHIRE, A. Implications of climate change for agricultural productivity in the early twenty-first century. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 365, p. 2973-2989, 2010.

GOWIK, U.; WESTHOFF, P. The Path from C3 to C4 Photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, p. 56-63, 2011.

HEMAVATHI, UPADHYAYA, C. P.; YOUNG, K. E.; AKULA, N.; KIM, H. S. HEUNG, J. J.; OH, O. M.; ASWATH, C. R.; CHUN, S. C.; KIM, D. H.; PARK, S. W. Over-expression of strawberry D-galacturonic acid reductase in potato leads to accumulation of vitamin C with enhanced abiotic stress tolerance, **Plant Science**, v. 177, p. 659-667, 2009.

IBÁNÊZ, I.; PRIMACK, R. B.; MILLER-RUSHING, A. J.; ELLWOOD, E.; HIGUCHI, H.; LEE, S. D.; KOBORI, H.; SILANDER, J. A. Forecasting phenology under global warming. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 365, p. 3247-3260, 2010.

IPCC. 2007. SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K. B.; TIGNOR, M.; MILLER, H. L., eds. **Climate change 2007: the physical science basis**. Contribution of Working Group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, UK & New York, NY, USA: Cambridge University Press.

IPCC. 2008. KUNDZEWICZ, Z. W.; PALUTIKOF, J.; WU, S. eds. **Climate change and water**. Technical paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, UK & New York, NY, USA: Cambridge University Press.

ISHIBASHI, Y.; YAMAGUCHI, H.; YUASA, T.; IWAYA-INOUE, M.; ARIMA, S.; ZHENG, S-H. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1562-1567, 2011.

JIMENEZ, A.; HERNANDEZ, J. A.; PASTORI, G.; DEL RIO, L.A.; SEVILLA, F. Role of the Ascorbate-Glutathione Cycle of Mitochondria and Peroxisomes in the Senescence of Pea Leaves. **Plant Physiol.**, v. 118, p. 1327-1335, 1998.

JOZEFCAK, M.; BOHLER, S.; SCHAT, H.; HOREMANS, N.; GUISEZ, Y.; REMANS, T.; VANGRONVELD, J.; CUYPERS, A. Both the concentration and redox state of glutathione and ascorbate influence the sensitivity of arabidopsis to cadmium. **Annals of Botany**, v. 116, p. 601-612, 2015.

KEBEISH, R.; NIESSEN, M.; THIRUVEEDHI, K.; BARI, R.; HIRSCH, H.J.; ROSENKRANZ, R.; STABLER, N.; SCHONFELD, B.; KREUZALER, F.; PETERHANSEL, C. Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 25, p. 593-599, 2007.

KHUSH, G. S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, v. 35, p. 25-34, 1997.

KOTAK, S.; LARKINDALE, J.; LEE, U.; KOSKULL-DORING, P. V.; VIERLING, E.; SCHARF, K. D. Complexity of the heat stress response in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 310-316, 2007.

LEISINGER, U.; RUFENACHT, K.; FISCHER, B.; PESARO, M.; SPENGLER, A.; ZEHNDER, A. J. B.; EGGEN, R. I. L. The glutathione peroxidase homologous gene from *Chlamydomonas reinhardtii* is transcriptionally up-regulated by singlet oxygen. **Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 395-408, 2001.

LI, J.; LIN, X.; CHEN, A.; PETERSON, T.; MA, K.; BERTZKY, M.; CIAIS, P.; KAPOV, V.; PENG, C.; POULTER, B. Global Priority Conservation Areas in the Face of 21 Century Climate Change. **PLoS One**, v. 8, p. 1-9, 2013.

LIN, M.; OCCHIALINI, A.; ANDRALOJC, P. J.; PARRY, M. A. J.; HANSON, M. R. A faster Rubisco with potential to increase photosynthesis in crops. **Nature**, v. 513, p. 547-550, 2014.

LI, Z.; WAKAO, S.; FICHER, B. B.; NIYOGI, K. Sensing and Responding to Excess Light. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 60, p. 60-239, 2009.

LI, Z. M.; ZHENG, X. M.; GE, S. Genetic diversity and domestication history of African rice (*Oryza glaberrima*) as inferred from multiple gene sequences. **Theor Appl Genet**, v. 123, p. 21-31, 2011.

LIU, X.; HUANG, B. Photosynthetic acclimation to high temperatures associated with heat tolerance in creeping bentgrass. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p. 1947-1953, 2008.

LOCATO, V.; PINTO, M. C.; GARA, L. Different involvement of the mitochondrial, plastidial and cytosolic ascorbate-glutathione redox enzymes in heat shock responses. **Physiologia Plantarum**, v. 135, p. 296-306, 2009.

LU, Y.; LI, Y.; YANG, Q.; ZHANG, Z.; CHEN, Y.; ZHANG, S.; PENG, X. X. Suppression of glycolate oxidase causes glyoxylate accumulation that inhibits photosynthesis through deactivating Rubisco in rice. **Physiologia Plantarum**, v. 150, p. 463-476, 2014.

MACHADO, E. C.; SCHMIDT, P. T.; MEDINA, C. L.; RIBEIRO, R. V. Respostas da fotossíntese de três espécies de citrosa fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 1161-1170, 2005.

MAIER, A.; FAHNENSTICH, H.; CAEMMERER, S. V.; ENGQVIST, M. K. M.; WEBER, A. M.; FLUGGE, U. I.; MAURINO, V. G. Transgenic introduction of a glycolate oxidative cycle into *A. thaliana* Chloroplast leads to growth improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 1-12, 2012.

MEEHL, G. A.; TEBALDI, C. More intense, more frequent, and longer lasting heat waves in the 21st century. **Science**, v. 305, p. 994-997, 2004.

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

MITTLER, R.; BLUMWALD, E. Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 61, p. 443-62, 2010.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v.11, p.15-19, 2006.

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

MITTLER, R.; FINKA, A.; GOLOUBINOFF, P. How do plants feel the heat? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 886, p. 1-8, 2011.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A.; Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 58, p. 459-81, 2007.

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

NISHIYAMA, Y.; MURATA, N. Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, p. 8777-8796, 2014.

NÖLKE, G.; HOUDELET, M.; KREUZALER, F.; PETERHÄNSEL, C.; SCHILLBERG, S. The expression of a recombinant glycolate dehydrogenase polyprotein in potato (*Solanum tuberosum*) plastids strongly enhances photosynthesis and tuber yield. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 734-742, 2014.

OGREN, W. L. Photorespiration: pathways, regulation, and modification. **Annu Rev Plant Physiol**, v. 35, p. 415-422, 1984.

OSAKABE, Y.; OSAKABE, K.; SHINOZAKI, K.; TRAN, L. S. P. Response of plants to water stress. **Frontiers Plant Science**, v. 5, p. 1-8, 2014.

PAVET, V.; OLMOS, E.; KIDDLE, G.; MOWLA, S.; KUMAR, S.; ANTONIW, J.; ALVAREZ, M. E.; FOYER, C. H. Ascorbic Acid Deficiency Activates Cell Death and Disease Resistance Responses in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 139, p. 1291-1303, 2005.

PARRY, M. A. J.; ANDRALOJC, P. J.; SCALES, J. C.; SALVUCCI, M. E.; CARMO-SILVA, A. E.; ALONSO, H.; WHITNEY, S. M. Rubisco activity and regulation as targets for crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 717-730, 2013.

PASSAIA, G.; CAVERZAN, A.; FONINI, L. S.; CARVALHO, F. E. L.; SILVEIRA, J. A. G.; MARGIS-PINHEIRO, M. Chloroplastic and mitochondrial *GPX* genes play a critical role in rice development. **Biologia Plantarum**, v. 58, p. 375-378, 2014.

PEREYRA-IRUJO, G. A.; VELASZQUEZ, L.; LECHNER, L.; AGUIRREZABAL, L. A. N. Genetic variability for leaf growth rate and duration under water deficit in sunflower: analysis of responses at cell, organ, and plant level. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 2221-2232, 2008.

PETERHANSEL, C.; BLUME, C.; OFFERMANN, S. Photorespiratory bypasses: how can they work? **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 709-715, 2013.

PETERHANSEL, C.; MAURINO, V. G. Photorespiration Redesigned. **Plant Physiology**, v. 155, p. 49-55, 2011.

PIMENTEL, C. Metabolismo de carbono de plantas cultivadas e o aumento de CO₂ e de O₃ atmosférico: situação e previsões. **Bragantia**, v. 70, p.1-12, 2011.

POETHIG, R. S. Life with 25,000 Genes. **Genome Research**, v. 11, p. 313-316, 2001.

PRASCH, C. M.; SONNEWALD, U. Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture. **Environmental and Experimental Botany**, v. 114, p. 4-14, 2015.

PRASAD, P. V. V.; PISIPATI, S. R.; MOMCILOVIC, I.; RISTIC, Z. Independent and Combined Effects of High Temperature and Drought Stress During Grain Filling on Plant Yield and Chloroplast EF-Tu Expression in Spring Wheat. **Jornal Agronomy & Crop Science**, p. 430-441, 2011.

RAINES, C. A. Increasing Photosynthetic Carbon Assimilation in C₃Plants to Improve Crop Yield: Current and Future Strategies. **Plant Physiology**, v. 155, p. 36-42, 2011.

RIBEIRO, C. W.; CARVALHO, F. E. L.; ROSA, S. B.; ALVES-FERREIRA, M.; ANDRADE, C. M. B.; RIBEIRO-ALVES, M.; SILVEIRA, J. A. G.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Modulation of genes related to specific metabolic pathways in response to cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants. **Plant Biology**, p. 1-12, 2012.

RIZHISKY, L.; LIANG, H.; MITTLER, R. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1143-115, 2002.

SALES, C. R.; RIBEIRO, R. V.; SILVEIRA, J. A.; MACHADO, E. C.; MARTINS, M. O.; LAGOA, A. M. Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 326-336, 2013.

SALES, C. R. G.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, R. S.; FONTENELE, A. V.; MACHADO, E. C.; SILVEIRA, J. A. G.; RIBEIRO, R. V. Photosynthetic and antioxidant responses to drought during sugarcane ripening. **Photosynthetica**, v. 53, p. 547-554, 2015.

SELOTE, D. S.; KHANNA-CHOPRA, R. Antioxidant response of wheat roots to drought acclimation. **Protoplasma**, v. 245, p.153-163, 2010.

SGOBBA, A.; PARADISO, A.; DIPIERRO, S.; GARA, L.; PINTO, M. C. Changes in antioxidants are critical in determining cell responses to short- and long-term heat stress. **Physiologia Plantarum**, v. 153, p. 68-78, 2015.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, A. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions, **Journal of Botany**, p. 2-26, 2012.

SHAO, H. B.; CHU, L.Y.; JALEEL, C. A.; ZHAO, C. X. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **C. R. Biologies**, v. 331, p. 215-225, 2008.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, T. Regulation e function of ascorbato peroxidase isoenzymes. **Jornal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1305-1319, 2002.

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

SMIRNOFF, N. The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. **Annals of Botany**, v. 78, p. 661-669, 1996.

SOUSA, R. H. V.; CARVALHO, F. E. L.; RIBEIRO, C. W.; PASSAIA, G.; CUNHA, J. R.; LIMA-MELO, Y.; MARGIS-PINHEIRO, M.; SILVEIRA, J. A. G. Peroxisomal APX knockdown triggers antioxidant mechanisms favourable for coping with high photorespiratory H₂O₂ induced by CAT deficiency in Rice. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, p. 499-513, 2015.

SOMERVILLE, C. R. An Early *Arabidopsis* Demonstration. Resolving a Few Issues Concerning Photorespiration. **Plant Physiology**, v. 155, p. 20-24, 2001.

STORME, N.; GEELLEN, D. The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms. **Plant, Cell and Environment**, v.37, p. 1-18, 2014.

STOTT, P. A.; STONE, D. A.; ALLEN, M. R. Human contribution to the European heat wave of 2003. **Nature**, v. 432, p. 610-614, 2004.

SUZUKI, N.; RIVERO, R. M.; SHULAEV, V.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, v. 203, p. 32-43, 2014.

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

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

TAKAHASHI, S.; MILWARD, S. E.; YAMORI, W.; EVANS, J.; HILLIER, W.; BADGER, M. R. The Solar Action Spectrum of Photosystem II Damage. **Plant Physiology**, v. 153, p. 988-993, 2010.

TEIXEIRA, F. K.; MENEZES-BENAVENTE, L.; GALVAO, V. C.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoformas localized in different subcellular compartments. **Planta**, v. 224, p. 300-314, 2006.

TIAN, X.; LUO, H.; ZHOU, H.; WU, C. Research on heat stress of rice in China: progress and prospect. **Chin. Agric. Sci. Bull.**, v. 25, p. 166-168, 2009.

TILMAN, D.; CASSMAN, K. G.; MATSON, P. A.; NAYLOR, R.; POLASKY, S. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v.418, p. 671-677, 2002.

TIMM, S.; BAUWE, H. The variety of photorespiratory phenotypes-employing the current status for future research directions on photorespiration. **Plant Biology**, v. 15, p. 737-747, 2013.

TIMM, S.; FLORIAN, A.; FERNIE, A. R.; BAUWE, H. The regulatory interplay between photorespiration and photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 2923-2929, 2016.

TOLBERT, N. E. Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. **Annu Rev Plant Physiol**, v. 22, p. 45-74, 1971.

UENO, O. A.; YOSHIMURA, Y.; SENTOKU, N. Variation in the Activity of Some Enzymes of Photorespiratory Metabolism in C4 Grasses. **Annals of Botany**, v. 96, p. 863-869, 2005.

VAUGHAN, D. A.; MORISHIMA, H.; KADOWAKI, K. Diversity in the *Oryza* genus. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 139-146, 2003.

VOSS; SUNIL, B.; SCHEIBE, R.; RAGHAVENDRA, A. S. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. **Plant Biology**, v. 15, p.713-722, 2013.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 38, p.1184-1192, 2008.

WANG, Y., FREI, M. Stressed food-The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. **Agriculture, Ecosystems and Environment.**, v.141, p. 271-286, 2011.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 244-252, 2004.

WHITNEY, S. M.; HOUTZ, R. L.; ALONSO, H. Advancing Our Understanding and Capacity to Engineer Nature's CO₂-Sequestering Enzyme, Rubisco. **Plant Physiology**, v. 155, p. 27-35, 2011.

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**, v. 168, p. 79-87, 2011.

WINGLER, A.; LEA, P. J.; QUICK, W. P.; LEEGOOD, R. C. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 355, p. 1517-1529, 2000.

XIN, C. P.; THOLEN, D.; DEVLOO, V.; ZHU, X. H. The Benefits of Photorespiratory Bypasses: How Can They Work? **Plant Physiology**, v. 167, p. 574-585, 2015.

XU, H.; ZHANG, J.; ZENG, J.; JIANG, L.; LIU, E.; PENG, C.; HE, Z.; PENG, X. Inducible antisense suppression of glycolate oxidase reveals its strong regulation over photosynthesis in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 1799-1809, 2009.

XU, J.; DUAN, X.; YANG, J.; BEECHING, J. R.; ZHANG, P. Enhanced Reactive Oxygen Species Scavenging by Overproduction of Superoxide Dismutase and Catalase Delays Postharvest Physiological Deterioration of Cassava Storage Roots. **Plant Physiology**, v. 161, p. 1517-1528, 2013.

YAMORI, W.; HIKOSAKA, K.; WAY, D. A. Temperature response of photosynthesis in C₃, C₄, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. **Photosynth Res**, v.119, p. 101-117, 2014.

YUAN, X. K.; YANG, Z. Q.; LI, Y. X.; LIU, Q.; HAN, W. Effects of different levels of water stress on leaf photosynthetic characteristics and antioxidant enzyme activities of greenhouse tomato. **Photosynthetica**, v. 54, p. 28-39, 2016.

ZELITCH, I., OCHOA, S. Oxidation and reduction of glycolic and glyoxylic acid in plants. I. Glycolic acid oxidase. **J. Biol. Chem**, v. 201, p. 707-718, 1953.

ZELITCH, I.; SCHULTES, N. P.; PETERSON, R.B.; BROWN, P.; BRUTNELL, T. P. High Glycolate Oxidase Activity Is Required for Survival of Maize in Normal Air. **Plant Physiology**, v. 149, p. 195-204, 2009.

ZHANG, Z.; XU, Y.; XIE, Z.; LI, X.; HE, Z-H.; PENG, X-X. Association-Dissociation of Glycolate Oxidase with Catalase in Rice: A Potential Switch to Modulate Intracellular H₂O₂ Levels. **Molecular Plant**, v. 9, p. 737-748, 2016.

ZHOU, Y.; LAM, H. M.; ZHANG, J. Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1207-1217, 2007.

ZHU, X-G.; LONG, S. P.; ORT, D. R. Improving Photosynthetic Efficiency for Greater Yield. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v 61, p. 235-61, 2010.

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

ZISKA, L.H.; BUNCE, J. A.; SHIMONO, H.; GEALY, D. R.; BAKER, J. T.; NEWTON, P. C. D.; REYNOLDS, M. P.; JAGADISH, K. S. V.; ZHU, C.; HOWDEN, M.; WILSON, L. T. Food security and climate change: on the potential to adapt global crop production by active selection to rising atmospheric carbon dioxide. **Proc. Biol. Sci.**, v. 279, p. 4097-4105, 2012.

4-HIPÓTESE E OBJETIVOS

4.1-HIPÓTESE

A redução da atividade fotorrespiratória, induzida pela menor atividade da enzima oxidase do glicolato, pode aumentar a eficiência fotossintética e atenuar os danos foto-oxidativos em plantas de arroz expostas ao estresse de seca isolado e combinado com excesso de calor e luz.

4.2-OBJETIVOS

4.2.1-Objetivo geral

Demonstrar que a redução da fotorrespiração, induzida pela menor atividade da GO, pode aumentar a eficiência fotossintética e atenuar os danos foto-oxidativos em plantas de arroz na ausência e presença dos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca, temperatura elevada e excesso de luminosidade.

4.2.2-Objetivos específicos

- ✓ Estimar as concentrações do inibidor α -hidroxisulfonato necessárias para reduzir em 50% a atividade da GO de folhas de arroz, por meio de ensaio de inibição em segmentos de tecidos utilizando doses crescentes do inibidor no meio;
- ✓ Induzir uma redução da atividade da via fotorrespiratória pela inibição parcial de atividade da enzima GO em plantas de arroz, pela aplicação do inibidor HPMS;
- ✓ Reduzir a atividade da via fotorrespiratória, pela redução de atividade da GO, por meio da aplicação, nas plantas de arroz, de uma concentração do inibidor de GO capaz de reduzir em cerca de 50% a atividade dessa enzima;
- ✓ Avaliar as mudanças nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila em plantas de arroz, submetidas ou não à redução de atividade da GO, cultivadas na ausência e presença dos estresses de seca e excesso de calor e luz;

- ✓ Determinar a atividade da GO e das enzimas antioxidativas CAT, SOD e APX nas plantas, submetidas ou não à redução de atividade da GO, cultivadas na ausência e presença de seca e excesso de calor e luz;
- ✓ Determinar a expressão (imunoblot) da Rubisco em plantas arroz, submetidas ou não à redução de atividade da GO, cultivadas na ausência e presença dos estresses de seca e temperatura e luminosidade elevada;
- ✓ Medir o conteúdo dos antioxidantes não enzimáticos ascorbato e glutathione em plantas de arroz, submetidas ou não à redução de atividade da GO, cultivadas na ausência e presença dos estresses de seca e temperatura e luminosidade elevada;
- ✓ Avaliar o acúmulo de EROs (conteúdo de H₂O₂) e danos oxidativos (conteúdo de TBARS) em folhas plantas de arroz, submetidas ou não à redução de atividade da GO, cultivadas na ausência e presença dos estresses de seca e temperatura e luminosidade elevada;

5-ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

5.1-ESTUDOS REALIZADOS

O presente trabalho foi realizado com base em três estudos seqüenciais, sendo cada estudo apresentado na forma de capítulo. Inicialmente foi realizada uma revisão de literatura para conhecer o estado da arte e caracterizar os danos como também os mecanismos de proteção oxidativa em plantas frente aos efeitos isolados dos estresses hídrico e combinados com excesso de luz e calor (CAPÍTULO I). Em seguida, foram realizados dois estudos em arranjo experimental do tipo fatorial (2 x 2 x 2), permitindo avaliar os efeitos isolados e combinados do estresse hídrico com excesso de calor (CAPÍTULO II) e de luz (CAPÍTULO III). A descrição detalhada de cada experimento mencionado acima se encontra no segmento “material e métodos” dos respectivos capítulos a seguir.

CAPÍTULO-II

ACLIMATAÇÃO FOTO-OXIDATIVA EM ARROZ COM REDUZIDA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO EXPOSTAS AOS ESTRESSES ISOLADOS E COMBINADOS DE SECA E EXCESSO DE CALOR

1-INTRODUÇÃO

As plantas devido ao seu estilo de vida sésil são simultaneamente expostas a um grande número de estresses abióticos. Essas condições ambientais restritivas para plantas são responsáveis por ocasionar grandes perdas a produção agrícola no mundo todo (MITLLER, 2006). Essas perdas para agricultura podem ser agravadas devido às mudanças climáticas, uma realidade preocupante que pode comprometer a produção de alimentos (MITTLER, 2006; IPCC, 2007; MITTLER e BLUMWALD, 2010; GAMÉS et al., 2013). A estimativa projetada para os próximos 50-100 anos é que a temperatura média anual irá elevar de 3 a 5° C (IPCC, 2007). Neste cenário de mudanças climáticas, as regiões agrícolas do nosso planeta são susceptíveis de ser diferencialmente afetadas (STOTT et al., 2004; CIAIS et al., 2005; TIAN et al., 2009).

Os efeitos adversos destes fatores abióticos, como a seca e excesso de calor, afetam processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares essenciais para as plantas (DELUC et al., 2009). Um dos primeiros processos a ser afetados por estes estresses é a fotossíntese (LIU e HUANG, 2008). No metabolismo fotossintético, as respostas vegetais aos efeitos negativos da seca e do calor são diferentes (SUZUKI et al., 2014). Sob condições de seca, a diminuição da fotossíntese ocorre por fatores estomáticos. As plantas fecham os estômatos diminuindo a condutância estomática, afetando processos de trocas gasosas e a eficiência de carboxilação (SILVA et al., 2010; SALES et al., 2015; YUAN et al., 2016). Por outro lado, o excesso de calor promove uma diminuição da fotossíntese por fatores não estomáticos, como a diminuição da atividade da Rubisco e da taxa aparente de transporte de elétrons (LIU e HUANG, 2008; WAY e OREN, 2010).

O excesso de calor afeta as propriedades cinéticas da Rubisco, estimulando a atividade de oxigenase (PETERSHANSEL e MAURINO, 2011). No campo, essas condições ambientais restritivas para as plantas ocorrem frequentemente combinadas, ou seja, a seca ocorre associada ao excesso de calor (MITLLER, 2006). A combinação destes estresses (seca e excesso de calor) causa fechamento estomático que reduz a disponibilidade de CO₂, favorecendo a atividade de oxigenação da Rubisco nos cloroplastos (FOYER e NOCTOR, 2000). Como efeito desta menor disponibilidade de CO₂, ocorre uma redução do principal aceptor de elétrons na etapa fotoquímica nos cloroplastos, o NADP⁺, desviando elétrons para o oxigênio molecular e gerando

espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs quando presentes em baixas concentrações podem atuar como moléculas sinalizadoras em diversos processos de desenvolvimento (FOYER e NOCTOR, 2003; ISHIBASHI et al., 2011). Contudo, a produção excessiva de EROs pode ocasionar dano oxidativo (MOLLER, 2007; DEMIDCHIK, 2015).

As plantas possuem diversos mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para eliminação dos EROs (MITLLER, 2002; MOLLER, 2007; GILL e TUTEJA, 2010; XU et al., 2013; BARBOSA et al., 2014; SGOBBA et al., 2015). O sistema não enzimático é constituído principalmente por componentes hidrofílicos, como o ácido ascórbico (ASA) e a glutatona (GSH). A proteção enzimática é composta por um complexo sistema de enzimas SOD-CAT-APX, presentes em várias organelas e atuando de forma coordenada na proteção oxidativa (FOYER e NOCTOR, 2003).

O estresse hídrico e o excesso de calor isoladamente são estímulos potenciais para a fotorrespiração e a combinação destes fatores pode intensificar a atividade dessa via, considerada uma das principais fontes de EROs na célula vegetal que produz principalmente o peróxido de hidrogênio (FOYER e NOCTOR, 2003). A atividade da oxidase glicolato desempenha um passo essencial na via fotorrespiratória, oxidando o glicolato, que é produzido pela atividade oxigenase da Rubisco, em glioxilato nos peroxissomos (XU et al., 2009; LU et al., 2014). Nessa reação catalisada pela GO, ocorre a produção paralela de quantidades elevadas de peróxido de hidrogênio (MOLLER, 2007; VOSS et al., 2013; BARBOSA et al., 2014).

A fotorrespiração é considerada uma via metabólica fútil por levar a perda de carbono e pelo alto consumo de energia, além de ser uma fonte de estresse oxidativo (VOSS et al., 2013; BETTI et al., 2016). A maioria das culturas de importância econômica são plantas C3 onde a via fotorrespiratória é mais intensa, como em arroz (UENO et al., 2005). Este fato levou cientistas à busca de abolir esta via metabólica para aumentar a produtividade das culturas (OGREN, 1984). Entretanto, os resultados encontrados a partir dos mutantes para as várias enzimas do ciclo não alcançaram este alto desempenho fotossintético. Por outro lado, quando a fotorrespiração foi tolerada e buscou-se diminuir o fluxo fotorrespiratório por um desvio do glicolato produzido nos cloroplastos, resultados satisfatórios foram obtidos indicando que a diminuição no fluxo de carbono fotorrespiratório pode aumentar a fotossíntese e o rendimento das culturas (KEBEISH et al., 2007; NOLKE et al., 2014; DALAL et al., 2015).

Como modelo para estudos sobre a fotorrespiração, a redução da atividade da GO poderia também diminuir o fluxo fotorrespiratório devido o papel chave (3° reação) na rota efetuada nos peroxissomos. Dos estudos conduzidos, tem sido mostrado que uma menor atividade da GO está diretamente relacionado com um menor conteúdo de glioxilato e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), indicando ainda que a GO pode exercer um papel regulatório na fotorrespiração (SOUSA et al., 2015). Entretanto, estudos com nocaute gênico mostraram resultados controversos, indicando que a menor expressão e atividade da GO podem reduzir a fotossíntese em espécies C3 como arroz (XU et al., 2009) e espécies C4, como o milho (ZELITCH et al., 2009). Esses resultados são ainda controversos, mas vêm mostrando que a fotorrespiração exerce um papel regulatório na fotossíntese, com parte desses mecanismos regulatórios coordenados pela atividade da oxidase do glicolato (BETTI et al., 2016; TIMM et al., 2016).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o papel da enzima oxidase do glicolato (GO) na geração de danos oxidativos bem como na modulação da fotossíntese, em plantas de arroz expostas a estresses isolados e combinados de seca e calor. As plantas de arroz foram submetidas a inibição parcial da atividade da GO pela aplicação de um inibidor para essa enzima (α -hidroxissulfonato/HPMS), seguido da exposição as diferentes condições de estresses de seca e calor. Essa estratégia permitiu identificar distúrbios associados com a fotorrespiração, a fotossíntese e danos oxidativos que podem ser ativados pelo papel da GO naquelas condições ambientais.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-MATERIAL VEGETAL E APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS

As sementes de arroz (*Oryza sativa*), cv Nippombare, foram desinfetadas em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por 5 min, lavadas com água destilada e germinadas em mistura de areia com vermiculita (v/v) na proporção de 1:1 em vasos de 2 litros, sob condições naturais de casa de vegetação localizada na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada (Figura 1). Durante a germinação o substrato foi mantido úmido com água destilada e após a germinação (8 dias) as plântulas foram irrigadas diariamente com solução nutritiva (HOAGLAND e ARNON, 1950) diluída ¼ durante 30 dias. Em seguida, passaram a receber a mesma solução

nutritiva diluída $\frac{1}{2}$ a cada três dias (sendo irrigadas com água destiladas no intervalo dos três dias) por mais um mês.

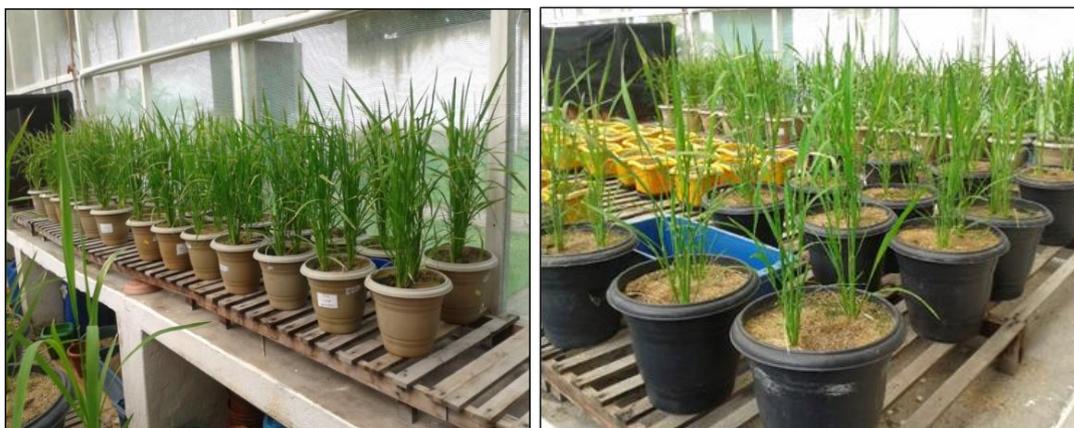


Figura 1. Plantas de arroz crescendo em condições naturais de casa de vegetação aos 60 dias após o plantio das sementes.

Em seguida segmentos (2 cm) de folhas, amostrados da parte mediana de diferentes plantas, foram coletados e incubados em meio líquido, em placas de Petri, contendo concentrações crescentes (0 a 25 mM) de α -hidroxissulfonato, inibidor específico para GO (Figura 2). Após acondicionamento sob baixa luminosidade ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 25°C durante 8 horas, os segmentos foram lavados com água destilada, submetidos à extração de proteínas e o extrato protéico foi utilizado para determinar a atividade de GO. Com os dados das atividades foi estimada a regressão linear em função das concentrações do inibidor, e a concentração correspondente a 50% de inibição da atividade da GO foi determinada a partir da equação da regressão.

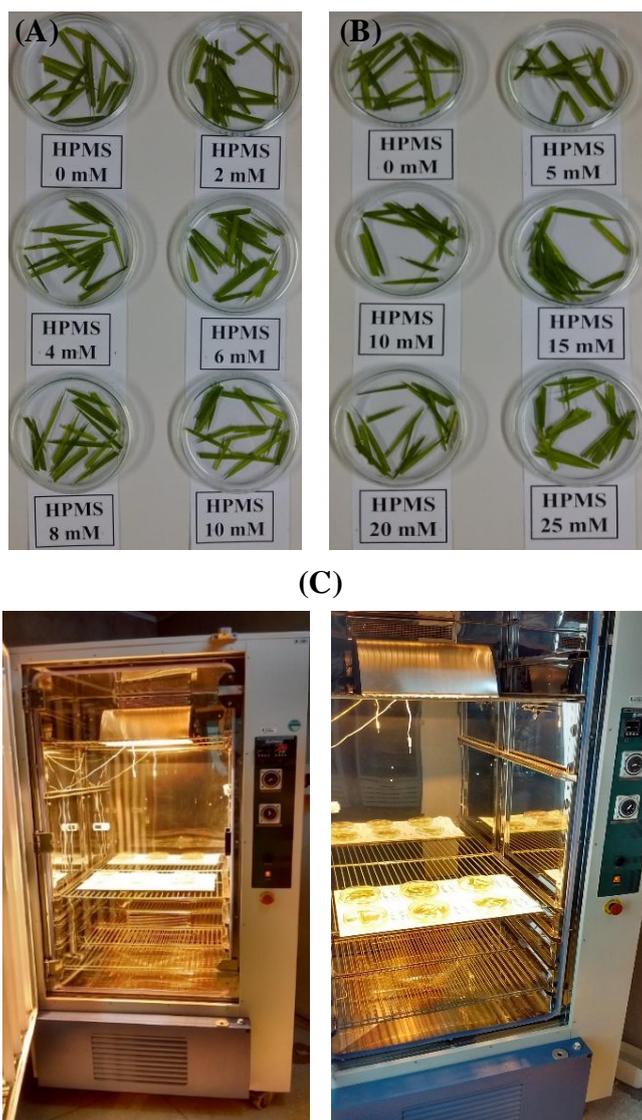


Figura 2. Ensaio de incubação com segmentos de folhas de arroz em meio líquido com concentrações crescentes do inibidor da oxidase do glicolato (GO), variando de 0 à 10 mM (A) e de 0 à 25 mM (B), e câmara de crescimento com condições controladas utilizada para acondicionar as placas contendo os segmentos durante o ensaio (C).

A faixa de concentração (0-10 mM) do inibidor foi selecionada com base no estudo realizado por Zelitch (1973), o qual demonstra que a dose de 10 mM do inibidor elimina a atividade de GO em tecidos foliares de plantas de Milho (*Zea mays*) e Tabaco (*Nicotiana tabacum*). No entanto, foi necessário fazer algumas adaptações tendo em vista que a redução da atividade da GO em segmentos de folhas se mostrou diferente quando aplicado na planta. Dessa forma, foram testadas outras ordens crescentes de (0, 5, 10, 15, 20, 25) Tabela 1.

Tabela 1. Redução de atividade da enzima glicolato oxidase em segmentos de folhas de arroz após 8 horas de incubação na presença de concentrações crescentes do inibidor da GO (HPMS) em câmara de crescimento sob condições controladas de temperatura (25 °C) e luminosidade (200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). A partir desse ensaio, foi selecionada a concentração para aplicação nos experimentos com plantas que correspondeu a uma redução média de 50% da atividade da GO *in vivo*.

HPMS (mM)	Atividade da GO ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{MF min}^{-1}$)	(%)	HPMS (mM)	Atividade da GO ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{MF min}^{-1}$)	(%)
0	60a	0	0	61a	0
2	58,33a	3	5	58,33a	4
4	57,66a	4	10	47b	23
6	58a	3	15	38,66c	37
8	51b	15	20	31,66d	48
10	45b	25	25	27,66e	54

Valores são médias de três repetições \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Para aplicar os tratamentos isolados e combinados de seca e temperatura elevada, as plantas (60 dias pós-plantio) foram acondicionadas em câmara de crescimento (Câmara Climática SGC 120, Modelo FT-612000, Marca FITOTRON) em condições controladas de luminosidade (300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), umidade relativa (60%), temperatura (27 \pm 2 °C) e fotoperíodo de 12 horas (12h/12h). Nessas condições, as plantas foram divididas em dois grupos, onde um permaneceu sendo irrigado e o outro foi submetido à suspensão da rega. Dois dias após a transferência para a câmara, as plantas foram submetidas aos tratamentos isolados e combinados de seca e temperatura elevada na ausência e presença de inibição da enzima GO, como descrito a seguir: controle (irrigado + 25°C); temperatura elevada (irrigado + 42°C); redução de atividade da GO (irrigado + HPMS + 25°C); temperatura elevada + redução atividade da GO (irrigado + HPMS + 42°C); seca (suspensão da rega + 25°C); seca + temperatura elevada (suspensão da rega + 42°C); seca + redução da GO (suspensão + HPMS + 25°C); seca + temperatura elevada + redução de GO (suspensão + HPMS + 42°C), durante três dias consecutivos. Para o tratamento de inibição da GO, o inibidor α -hidroxissulfonato (25 mM) diluído em tampão HEPES 10 mM pH 6,0, contendo Triton (0,10%), foi aplicado via aspersão nas folhas das plantas todos os dias às 07:00 horas, durante os três últimos dias.

2.2-AVALIAÇÕES REALIZADAS

2.2.1-Conteúdo relativo de água (CRA)

O conteúdo relativo de água foi determinado conforme Fidalgo et al., (2004). Ao final do experimento foram coletados 30 segmentos foliares (10 mm) e a massa fresca (MF) determinada imediatamente. Em seguida, os segmentos foram imersos em 30 ml de água deionizada por 8 horas em placas de *petri* e após breve secagem dos segmentos em papel toalha, para remover o excesso de umidade, foi determinada a massa túrgida (MT). A massa seca (MS) foi determinada após secagem dos discos a 70°C, durante 48 h em estufa, e o CRA foi estimado pela seguinte relação descrita na equação abaixo (1):

$$CRA = [(MF-MS)/(MT-MS)] \times 100 \quad (1)$$

2.2.2-Dano de membrana pelo extravasamento de eletrólito

O dano de membrana foi determinado com base no vazamento de eletrólitos, como descrito por Shanahan et al., (1990). Ao final do ensaio foram coletados vinte discos foliares (10 mm de diâmetro) que foram imersos em 10 ml de água deionizada em tubos fechados e incubados a 40 °C durante 30 min e determinada a condutividade elétrica da solução (C1). Em seguida, os tubos foram incubados a 100 °C por 1 h e após atingir a temperatura ambiente foi determinada a condutividade elétrica da solução (C2). O dano de membrana (DM) foi estimado pela relação descritas na equação (2) abaixo:

$$DM = (C1/C2) \times 100 \quad (2)$$

Essa medida foi utilizada como um indicador do extravasamento o conteúdo citoplasmático através da membrana plasmática, marcador diretamente relacionado com a viabilidade celular.

2.2.3-Conteúdo de clorofilas

Uma folha de cada planta foi coletada e imediatamente colocada em sacos plásticos devidamente identificados, refrigerados em recipiente com gelo e em seguida armazenadas em um Freezer a -80 °C no Laboratório de Produção Vegetal da Unidade Acadêmica de Serra Talhada. Para determinar o teor de clorofila foi utilizado a

metodologia de Chagas et al. (2008), com modificações. Para isto, foi obtido 100 miligramas de cada folha e a clorofila foi extraída através da maceração em almofariz, adicionando-se 5 ml de acetona (80% v/v). O sobrenadante foi colocado em tubos de ensaios de 15 ml, filtrado e realizadas leituras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 645, 652 e 663 nm (ARNON, 1949). As concentrações de clorofilas foram estimadas pelas seguintes equações (3, 4 e 5):

$$\text{Clorofila } a = [(12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}) / (1000 \times W)] \times V \quad (3)$$

$$\text{Clorofila } b = [(22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}) / (1000 \times W)] \times V \quad (4)$$

$$\text{Clorofilas totais} = [(A_{652} \times 1000) / (34,5)] \times (V / 1000 \times W) \quad (5)$$

Onde: A = absorvância; V = volume final do extrato (5 ml); W = peso em gramas. Os conteúdos de clorofilas foram expressos em mg. g⁻¹MF.

2.3-DETERMINAÇÕES PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

2.3.1-Extração de proteínas

A extração de proteína foi realizada conforme Zimmermam et al., (2006), com modificações. Amostra de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido seguido da extração em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 contendo EDTA 1 mM. Para a extração das enzimas peroxidase de ascorbato foi adicionado ascorbato 1 mM ao tampão. Após a extração, o extrato foi centrifugado a 14.000 x g em temperatura de 4 °C durante 30 min. O conteúdo de proteínas solúveis foi determinado conforme Bradford (1976) e estimado com base em curva padrão, utilizando BSA.

2.3.2-Atividades das enzimas

A atividade da Oxidase do glicolato (GO: EC; 1.1.3.15) foi determinada conforme o princípio de reação do método descrito por Baker e Tolbert (1966). Esse método se baseia na produção do complexo glioxilato-fenilhidrazona, produzido a partir da conversão do glicolato para glioxilato pela GO no meio. Alíquotas de 100 µL do extrato foram adicionadas a 2,9 mL de meio de reação contendo tampão fosfato de

potássio 100 mM, pH 8,3, adicionado de cisteína 4 mM, Glicolato 7 mM, Fenilhidrazina-HCl 4 mM e FMN 0,033 mM. O incremento da produção do complexo (glioxilato-fenilhidrazona), referente à atividade da enzima, será medido a 324 nm em espectrofotômetro após 5 min de reação. A atividade da GO foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 17 mM^{-1} e expressa em $\mu\text{mol de glicolato g}^{-1} \text{ MF min}^{-1}$.

A atividade da catalase (CAT; EC: 1.11.1.6) foi determinada conforme Havir e McHale, (1987). Alíquotas de 0,05 ml de extrato protéico foram adicionados a 2,95 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 30°C e acompanhado o decaimento da absorbância a 204 nm em espectrofotômetro durante 300 segundos, com leituras sucessivas a cada 30 seg. A atividade da enzima foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a 240 nm, para o H_2O_2 e expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MF min}^{-1}$ ou de forma específica, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ prot. min}^{-1}$.

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

A atividade da peroxidase de ascorbato (APX; EC: 1.11.1.1) foi determinada conforme método descrito por Nakano e Asada (1981). Alíquotas de 0,1 ml de extrato protéico foram adicionadas ao meio de reação composto de 2,7 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0), contendo 0,5 mM de ácido ascórbico p. a. A reação foi iniciada pela adição de H_2O_2 30 mM ao meio de reação e acompanhada pelo decaimento da absorbância em 290 nm em espectrofotômetro durante 300 segundos, com leituras sucessivas em intervalos de 30 segundos. A atividade da APX foi estimada utilizando o coeficiente e de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o ascorbato, em 290 nm, e expressa como $\mu\text{mol ASA g}^{-1} \text{ MF min}^{-1}$ ou de forma específica, $\mu\text{mol ASA g}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot. min}^{-1}$.

2.4-MEDIDAS DE FOTOSSÍNTESE

2.4.1-Trocas gasosas e curvas de resposta ao CO₂

As medidas de trocas gasosas e as curvas de respostas ao CO₂ foram realizadas com um analisador portátil de fotossíntese (IRGA, modelo L1-6400XT, Fabricante LICOR, EUA). As medidas da assimilação líquida de CO₂ (P_N), taxa de transpiração (E), condutância estomática (g_s) e pressão parcial de CO₂ intercelular (C_i) foram realizadas em folhas saudáveis completamente expandidas sob luz de 1000 $\mu\text{mol. m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 28 °C, mantidas na câmara de leitura do IRGA. Com as medidas de trocas gasosas, foi estimada a eficiência de carboxilação instantânea, pela razão da fotossíntese com a concentração intercelular de CO₂ (P_N/C_i) e também a eficiência no uso de água pela razão da fotossíntese com a transpiração (P_N/E).

Para a realização das curvas de resposta da fotossíntese líquida (P_N) ao aumento do CO₂, as medidas de P_N foram acompanhadas na câmara de medida em resposta ao incremento da pressão do CO₂ no interior da câmara (400, 300, 200, 100, 50, 400, 600, 800, 1000, 1200 e 1600 ppm). A partir das curvas, foram calculados a eficiência de carboxilação máxima da Rubisco (V_{cmax}), a taxa de regeneração da RuBP (J_{max}) e a respiração na presença da luz (R_d). Durante as curvas de respostas ao C_i a intensidade da luz da medida no IRGA foi de 1000 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (SHARKEY et al., 2007).

2.4.2-Fluorescência da clorofila

As medidas da fluorescência da clorofila *a* foram feitas em folhas saudáveis completamente expandidas através do método do pulso de saturação utilizando um fluorômetro modulado (Modelo MINI-PAM-II, fabricante Heinz Walz GmbH). A partir das leituras, foram calculados a eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) (6), e os seguintes parâmetros: eficiência quântica efetiva do fotossistema II ($\Phi_{\text{efetiva}}\text{FSII}$) (7), taxa de transporte de elétrons (ETR)(8) e os coeficientes de quenching fotoquímico (qP) (9) e não fotoquímico (NPQ) (10).

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m \quad (6)$$

$$\Phi_{\text{efetiva}}\text{FSII} = [(F_m' - F_s)/F_m'] \quad (7)$$

$$\text{ETR} = \Phi_{\text{efetiva}}\text{FSII} * \text{DFFF} * 0.5 * 0.84 \quad (8)$$

$$qP = (Fm' - Fs) / (Fm' - Fo') \quad (9)$$

$$NPQ = [(Fm - Fm') / Fm'] \quad (10)$$

As variáveis Fm, Fo e Fv representam, respectivamente, a fluorescência máxima, mínima e variável após adaptação das folhas a 30min de escuro; Fm', Fo' e Fs representam, respectivamente, a fluorescência máxima, mínima e no estado de equilíbrio dinâmico na presença de luz e DFFF equivale à densidade de fluxo de fótons fotossintéticos. As medidas realizadas na presença de luz foram feitas em folhas adaptadas às condições de irradiância prevalentes na câmara de crescimento, após exposição por 10s a um feixe de luz de 270 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecido pela própria fibra óptica do aparelho.

2.4.3-Estimativa da fotorrespiração

A taxa de fotorrespiração (Pr), indicada pela liberação de CO₂, foi estimada a partir das medidas de trocas gasosas (P_N e Rd) e de parâmetros derivados da ETR da fluorescência da clorofila, conforme o método descrito por Bagard et al., (2008). O parâmetro Rd corresponde à respiração na luz. Por essa metodologia, a fotorrespiração é obtida pela relação descrita na equação abaixo (11):

$$Pr = 1/12[ETR - 4 (P_N + Rd)] \quad (11)$$

2.5-INDICADORES DE DANOS OXIDATIVOS

2.5.1-Conteúdo de H₂O₂

O conteúdo de H₂O₂ foi determinado conforme método descrito por Cheeseman (2006). Neste ensaio, o peróxido de hidrogênio reage com Fe⁺² a pH baixo, na presença do corante alaranjado de xilenol (XO) para a formação de Fe⁺³. A concentração de Fe⁺³ gerada foi calculada pelo aumento da absorbância, ocasionado pela formação do complexo Fe-XO. Para isso, 500 mg de tecido fresco de folhas foram macerados na presença de nitrogênio líquido. Após a obtenção de farinha homogênea, 1,5 ml de tampão borato-bórax 50 mM pH 8,4, foram adicionados, seguido de maceração por mais 3 minutos. As amostras então foram centrifugadas a 13.000 x g por 20 minutos, a 4

°C. Ao término, o sobrenadante foi coletado (H₂O₂ total) e o precipitado, descartado. Em seguida, alíquotas de 100 µl das amostras (diluídas, caso necessário) foram transferidas para tubos de ensaio e adicionado 900 µl de reagente contendo 0,25 mM de FeSO₄, 0,25 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,25 mM de H₂SO₄, 124 µM de alaranjado de xilenol e 99 mM de sorbitol. A mistura de reação foi incubada por 30 minutos, a 25 °C, e posteriormente, foram realizadas as leituras de absorbância, no comprimento de onda de 560 nm. As concentrações de H₂O₂ foram obtidas a partir de curva padrão e os dados foram expressos em µmol g⁻¹ MS.

2.5.2-Peroxidação de lipídios (TBARS)

A peroxidação de lipídios foi estimada pelo conteúdo de substancia reativas ao acido tiobarbitúrico (TBARS) conforme Heath e Packer (1968). 0,1 g de folhas frescas foram macerados em almofariz na presença de N₂ liquido seguido da adição de ácido tricloroacético (TCA) 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 12.000 x g durante 15 min em temperatura de 4 °C. Em seguida 0,5 ml do sobrenadante foi adicionado a 2,0 ml da solução TCA 20% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) e aquecida em banho maria a 95 °C em tubos hermeticamente fechados durante 1 hora. Em seguida a reação foi interrompida em banho de gelo, e foram realizadas leituras a 532 e 660 nm. O conteúdo de TBARS foi estimado utilizando o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ após a subtração da absorbância obtida a 660 nm daquela a 532 nm.

2.6-METABÓLITOS FOTORRESPIRATÓRIOS

2.6.1-Conteúdo de glioxilato

O conteúdo do ácido glioxilato baseado em metodologias desenvolvidas por Baker e Tolbert (1966), a partir extrações por macerações de 100 mg MF em 1ml de HCL a 100 mM. Os extratos foram centrifugados a 12000 rpm/10 mim/8°C e o sobrenadante foi recolhido. Alíquotas de 200 µl do extrato foram acrescidas de 300 µl de fenilhidrazina em 1% HCL a 100 mM e colocadas a banho maria em 95°C por 2 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo e as leituras realizadas a 324 nm. O conteúdo de glioxilato foi calculado utilizando o coeficiente de extinção milimolar 17 mM⁻¹ e expresso em µmol. g⁻¹ MF.

2.6.2-Conteúdos de glicina e serina

O conteúdo dos aminoácidos glicina e serina foram determinados com uso de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Para a extração, foi usada uma solução composta por uma mistura de clorofórmio, metanol e água (M/C/W). Para tal, 400 mg de massa fresca de folhas foram pesados com uso de balança analítica e macerados com 1 ml da solução(M/C/W) na presença de nitrogênio líquido (N₂). O extrato foi centrifugado a 4000 g a 4°C por 10 minutos e em seguida foi feita a coleta da fase superior. Na fase inferior da mesma amostra, foi adicionada mais 1 ml da solução (M/C/W) e de igual modo a fase superior, o extrato foi centrifugado 4000 g á 4°C por 10 minutos. Depois da centrifugação, os extratos da fase superior e inferior referente a cada amostra, juntos (cerca de 1500 µl) passaram por uma evaporação (capela) em unidade de aquecimento (banho seco/Unisciense) a 40°C durante 24 h. Em seguida, foram determinados os conteúdos de glicina e serina com uso do HPLC, e expressos em µmol. g⁻¹ MF.

2.7-CONTEÚDOS DE ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS

2.7.1-Conteúdos de glutathiona reduzida (GSH)

Os conteúdos de glutathiona das formas reduzida foram determinados conforme Griffith (1980). Amostras de folhas frescas (0,1g) foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 5% e maceração por mais 3min. O extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 15min em temperatura de 4°C e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para reação. Para determinação da GSH 0,2 ml do sobrenadante foi adicionado em tubos de ensaio seguido da adição de 2,6 ml de tampão fosfato de sódio 150 mM pH 7,4, 1 ml de tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 e 0,2 ml de DTNB 30 mM, em tampão fosfato 100 mM pH 7,0. Em seguida os tubos foram acondicionados em banho maria a 30°C durante 10 min. Após a reação foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 412 nm e os conteúdos de glutathiona foram estimados com base em curva padrão a partir de GSS p. a.

2.7.2-Conteúdos de ascorbato reduzido (ASA)

Os conteúdos de ascorbato reduzido foram determinados conforme Kampfenkel et al., (1995). Amostras de folhas frescas (0,1g) foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 15 min em temperatura de 4 °C e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para reação. Para o conteúdo de ascorbato reduzido, alíquotas de 0,1 ml do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,3 ml de tampão fosfato de potássio 200 mM pH 7,4, 0,1 ml de água destilada, 0,5 ml de TCA 10%, 0,4 ml de H₂PO₄ 45%, 0,4 ml de bipyridil 4% e 0,2 ml de FeCl₃. Após a mistura da reação os tubos foram acondicionados em banho maria a 40 °C durante 30 min. Em seguida, foram realizadas leituras a 525 nm e o conteúdo de ascorbato foram estimados com base em curva padrão utilizando L-ascorbato p. a.

2.8-WESTERN BLOTING PARA RUBISCO

As mudanças no conteúdo da Rubisco foram avaliadas por imunoblot utilizando anticorpo específico contra a subunidade maior da Rubisco. Após a separação das proteínas por eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE) 12,5%, foi realizada uma eletrotransferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose em sistema molhado. Em seguida, foi realizada a detecção das Subunidades maiores da Rubisco (SMR) por western blotting utilizando um anticorpo específico (R4404, Sigma), e na revelação foi empregado um anticorpo secundário IgG (A 9046, Sigma) conjugado com peroxidase alcalina, conforme Lee et al., (2007). As imagens correspondentes as bandas reveladas foram escaneadas utilizando programa específico e apresentadas na forma de gráficos como valores relativos.

2.9-DELINEAMENTO ESTATÍSTICO E ANÁLISE DOS DADOS

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com tratamentos em arranjo fatorial 2 x 2 x 2, dois níveis de umidade (irrigado e seca), dois níveis do inibidor (0 e 25 mM) e duas temperaturas (25 e 42°C), com 4 repetições por tratamento, com cada repetição representada por um vaso com duas plantas. Os

dados das variáveis foram submetidos ao teste F a 0,05 de significância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey em mesmo nível.

3-RESULTADOS

3.1-O ESTRESSE HÍDRICO ASSOCIADO AO CALOR AFETA INTEGRIDADE CELULAR E INDUZ A OXIDAÇÃO DE CLOROFILAS, RESPOSTAS NÃO DEPENDENTE DA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO

No presente estudo, as respostas apresentadas pelas plantas irrigadas expostas por 12 horas a temperatura de 25 °C serão consideradas como referência (controle) de homeostase metabólica para as demais plantas, submetidas aos efeitos isolados e combinados da seca e temperatura elevada na ausência e presença da inibição parcial de atividade da GO (para inibição da GO ver Figura 8A). Os dados mostram que os efeitos dos estresses hídricos e temperatura elevada afetaram diferentemente o teor de umidade e a integridade celular foliar das plantas de arroz (Figura 3). O teor de umidade do tecido foliar não foi afetado pelo estresse hídrico quando as plantas foram mantidas a 25 °C durante 12 h, indicado pelo conteúdo relativo de água, se comparadas às plantas sob as condições referência.

Nas plantas irrigadas também não ocorreu mudanças no CRA em resposta a 42 °C (temperatura elevada) por 12 horas, enquanto naquelas submetidas ao estresse hídrico ocorreu uma redução média de 25% do CRA após 12 h de exposição ao calor, se comparadas às plantas referência (Figura 3A). O padrão de respostas para o CRA observado nas plantas, sob os efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e calor, não foi influenciado pela inibição parcial da atividade da GO (Figura 3A). Esse resultado pode indicar que o efeito inibitório sobre a GO pode ter afetado apenas alguns processos celulares diretamente relacionados ao seu papel fisiológico. Por outro lado, a intensidade dos danos celulares em folhas, indicada pelo aumento do vazamento de eletrólitos, foi maior quando as plantas foram expostas ao estresse hídrico submetidas à inibição parcial da oxidase do glicolato (Figura 3B).

Nas plantas irrigadas mantidas a 25 °C ou 42 °C por 12h não ocorreu aumento do dano de membrana. No entanto, nas plantas expostas a seca mantidas a 25 °C e 42 °C por 12 horas ocorreu aumento de 200% e 100% do DM, respectivamente, enquanto que nas plantas submetidas à inibição da GO esses aumentos foram de cerca de 300% e 100%, na mesma ordem em relação à referência (Figura 3B).

Nas plantas cultivadas sob condições irrigadas não foram observados efeitos da temperatura elevada sobre os conteúdos de clorofilas totais, bem como das frações de clorofilas *a* e *b* (Figura 4). Por outro lado, nas plantas submetidas a seca ocorreu uma redução de 30% no conteúdo de clorofilas totais, independente do efeito da temperatura e que foi mais associada com a redução do teor de clorofilas *b* que de clorofilas *a*. Nas plantas submetidas a seca mantidas a 25 °C ou 42 °C por 12 h, na ausência ou presença do inibidor, a redução nos conteúdos de clorofilas foi cerca de 10% e 50% nas frações de clorofilas *a* e *b*, respectivamente, comparado as plantas referência (Figuras 4B e C). Essa diferença de redução para as clorofilas *a* e *b* resultou em um expressivo aumento da relação de clorofilas *a/b* em repostas ao estresse hídrico (Figura 4D). Assim, esse aumento aparente da relação de clorofilas *a/b* em resposta a seca está mais associado à redução do teor de clorofilas *b* e a relativa estabilidade das clorofilas *a* em arroz.

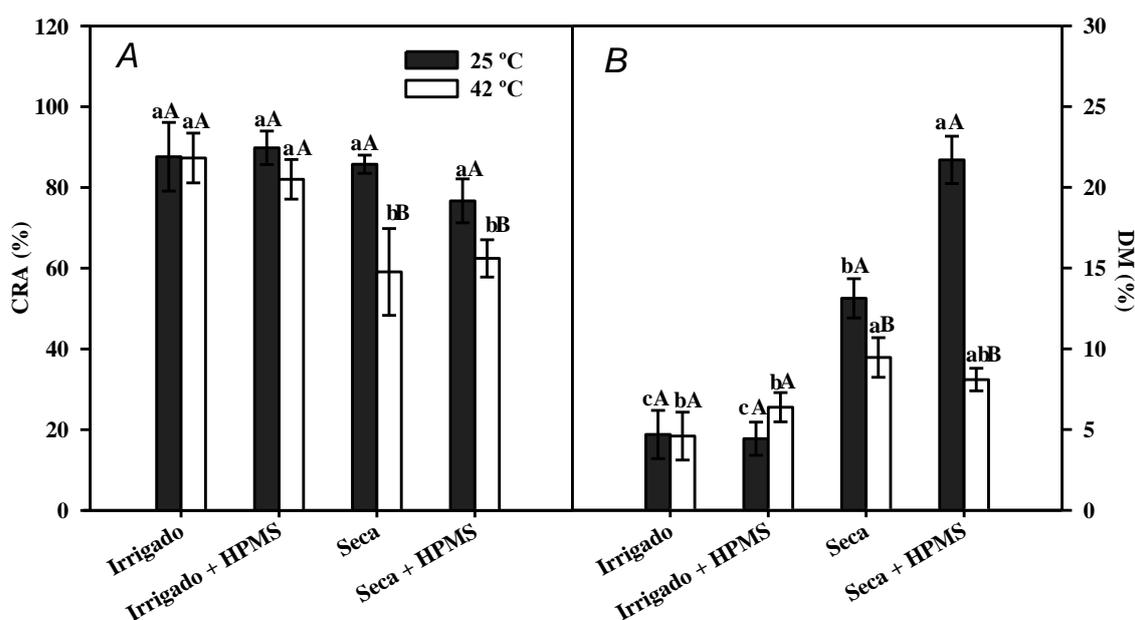


Figura 3. Mudanças no conteúdo relativo de água (A) e dano de membrana (B) em folhas de plantas de arroz expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e excesso de calor, quando submetidas à inibição parcial de atividade da enzima oxidase do glicolato após o tratamento com inibidor específico para essa enzima α -hidroxisulfonato (HPMS). Os valores representam médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

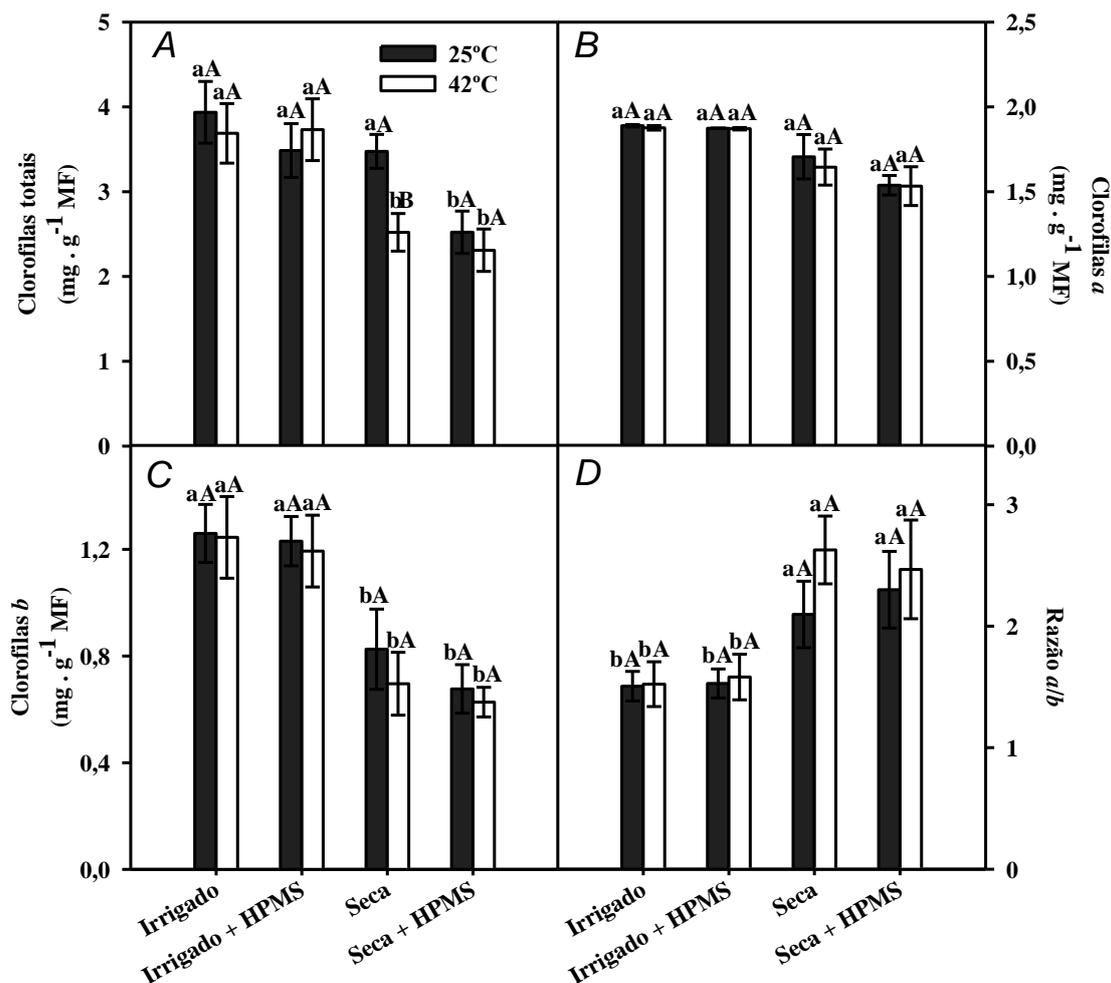


Figura 4. Mudanças nos conteúdos de clorofilas totais (A), clorofilas *a* (B) e clorofilas *b* (C) e relação clorofilas *a/b* (D) em folhas de plantas de arroz submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e excesso de calor, submetidas ao tratamento com inibidor para a enzima oxidase do glicolato (α -hidroxissulfonato-HPMS). Os valores representam médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

3.2-REDUÇÃO DA FOTOSSÍNTESE EM RESPOSTAS AO ESTRESSE HÍDRICO É INTENSIFICADA PELO EXCESSO DE CALOR E ESTÁ ASSOCIADA AO FECHAMENTO ESTOMÁTICO EM PLANTAS DE ARROZ

As plantas expostas ao excesso de calor e estresse hídrico isolados apresentaram redução significativa da fixação de carbono, uma resposta que ocorreu associada com o fechamento estomático. Essa limitação fotossintética foi intensificada nas plantas expostas a combinação desses estresses, indicando claramente a ocorrência de interação negativa

desses fatores (seca e calor) sobre a fotossíntese da espécie (Figura 5). Nas plantas sob irrigação e mantidas a 25 °C a fotossíntese líquida (P_N) e a abertura estomática, indicada pela taxa de transpiração (E) e pela condutância estomática (g_s), não foram afetadas se comparadas às plantas mantidas nas condições de referência. Por outro lado, nas plantas previamente submetidas ao estresse hídrico e expostas a 25 °C por 12 h ocorreu uma redução de 25% da P_N (Figura 5A), associado com restrição de 15% na g_s (Figura 5B) e de cerca de 20% da transpiração (Figura 5D).

Nas plantas irrigadas expostas ao excesso de calor (42 °C) por 12 h ocorreu uma redução de 40% da P_N em relação às plantas de referência, uma restrição que foi levemente recuperada (cerca de 16%) nas plantas submetidas a inibição parcial da atividade da enzima oxidase do glicolato (GO) nas mesmas condições (Figura 5A). Essa redução da P_N nas plantas em resposta a temperatura elevada ocorreu associado com uma restrição média de cerca de 20% para E e g_s , indicando limitação fotossintética associada com o fechamento estomático (Figura 5B e 5D). Essa limitação estomática, causada pelo excesso de calor, não foi parcialmente recuperada pela redução parcial de atividade da GO, mostrando que o sensível aumento da fotossíntese líquida nas plantas tratadas para a inibição parcial da GO ocorreu a despeito da restrição estomático (Figura 5A).

Nas plantas pré-expostas ao estresse hídrico ocorreu uma redução similar da P_N à observada nas plantas submetidas apenas ao calor. Por outro lado, nas plantas sob seca e submetidas a inibição da GO ocorreu uma redução da P_N relativamente maior (cerca de 15%) se comparada com a restrição causada apenas pelo calor ou seca isolados e em média de 30% comparado as plantas irrigadas tratada com o inibidor para a GO (Figura 5A). Essa redução da fotossíntese nas plantas pré-expostas a seca quando submetidas ao excesso de calor ocorreu associada ao fechamento estomático, indicado pela restrição da g_s e E (Figuras 5B e 5D). Vale ressaltar que a redução da P_N nas plantas sob seca e expostas ao calor foi maior nas plantas tratadas para inibição da GO, sugerindo uma maior influência da limitação estomática para redução da P_N nessas condições.

A pressão parcial intercelular de CO₂ (C_i) foi menor nas plantas expostas a 42 °C por 12 h, tanto nas plantas mantidas irrigadas quanto naquelas submetidas a seca, se comparadas com as plantas referência (Figura 5C). Nas plantas irrigadas mantidas a 25°C não foram observadas mudanças significativas na eficiência de carboxilação (P_N/C_i) (Figura 5E). Por outro lado, quando as plantas foram expostas ao estresse hídrico ocorreram reduções médias de 41% independente do inibidor da GO. Em

adição, o excesso de calor ocasionou também reduções neste parâmetro de forma significativa nas plantas em relação ao controle tanto nas irrigadas quanto nas expostas a combinação dos estresses (Figura 5E). A eficiência de uso da água, indicada pela relação P_N/E , não foi afetada quando expostas a 25 °C por 12 h nas plantas irrigadas, enquanto naquelas pré-submetidas ao estresse hídrico ocorreu uma redução de cerca de 25% se comparado com as plantas referência (Figura 5F). As plantas irrigadas expostas ao excesso de calor apresentaram uma redução de 25% da eficiência de uso da água.

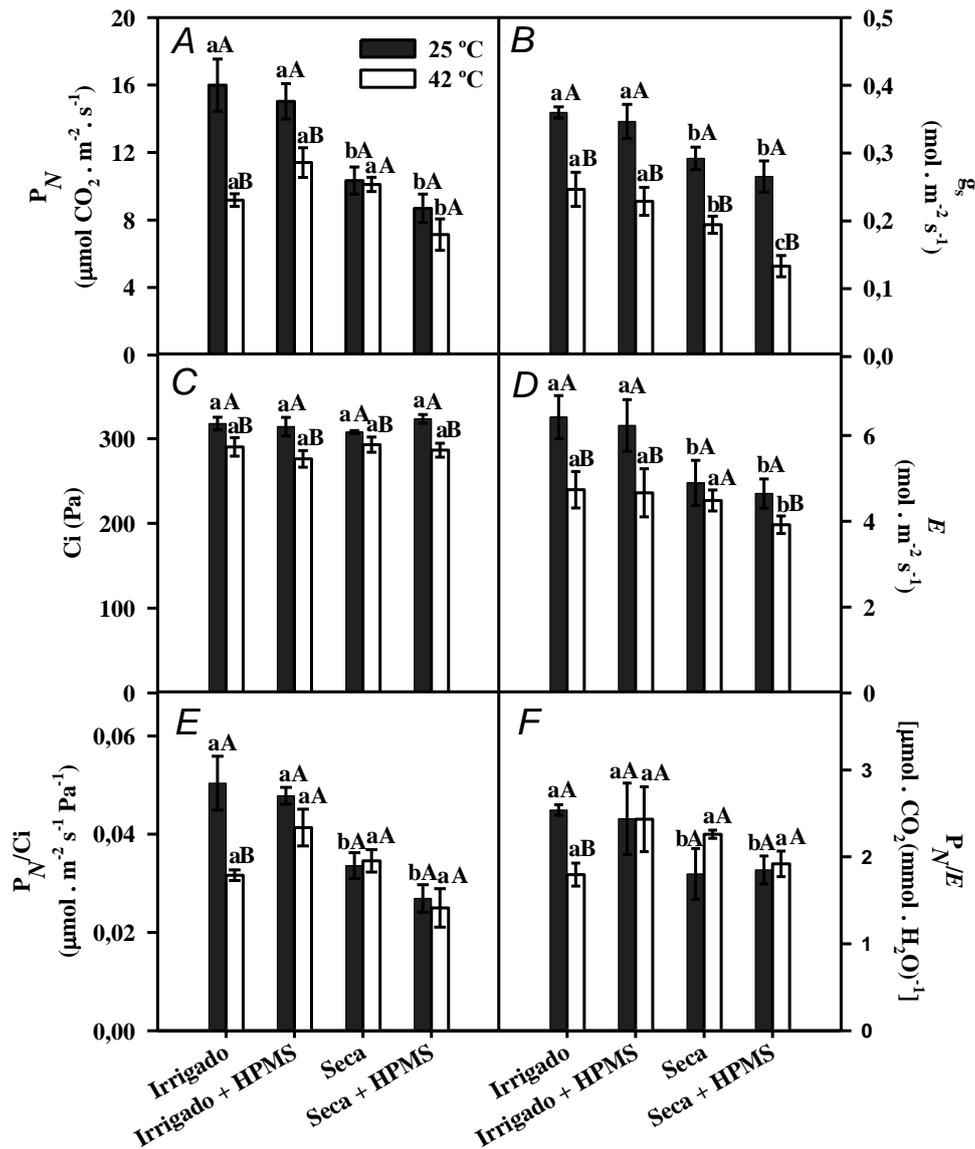


Figura 5. Assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (B), concentração intercelular de CO₂ (C), transpiração (D), eficiência instantânea de carboxilação (E) e eficiência no uso de água (F) em plantas de arroz (*Oryza sativa*) submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey (P<0,05).

A análise das curvas P_N/C_i nas plantas mantidas à 25 °C e 45 °C em respostas aos efeitos dos estresses de seca e calor mostra que a redução da atividade da GO afetou de fato a fotossíntese líquida (Figura 6A). Nas plantas irrigadas mantidas a 25 °C foi observado um aumento da fotossíntese líquida (P_N) proporcional ao incremento da pressão intercelular de CO₂ (C_i), atingindo valores máximos de 30 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nas plantas mantidas nas mesmas condições (irrigadas em 25 °C) tratadas com HPMS foram observados valores máximos para P_N similares, porém em valores de C_i próximo de 400 ppm a fixação de carbono (P_N) foi cerca de 40% menor, tendência similar a observada nas medidas de fotossíntese líquida (Figura 5A). Por outro lado, nas plantas submetidas ao estresse hídrico os valores máximos (saturantes) para a fixação de carbono foram em média de 15 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$, cerca de 50% menor se comparado as plantas bem irrigadas.

A limitação fotossintética causada pelo estresse hídrico nas plantas de arroz foi influenciada pelo inibidor (HPMS) e/ou pela redução parcial da atividade da GO. Em pressões de C_i próximas a pressão do CO₂ ambiente (cerca de 380 ppm), a fotossíntese líquida (P_N) foi cerca de 50% menor nas plantas submetidas a apenas seca, enquanto naquelas sob seca com redução de atividade da GO (tratadas com HPMS) essa redução foi em média de 70%, se comparadas com as plantas referência (Figura 6A). Esses resultados mostram que de fato o processo de inibição da GO afetou severamente a fotossíntese líquida nas plantas de arroz, efeito que ocorre tanto nas condições irrigadas e principalmente nas condições de estresse hídrico.

Nas plantas irrigadas expostas a temperatura elevada (42 °C) por 12 h, a análise das curvas P_N/C_i mostram que a P_N apresentou valores máximos similares ao observado em 25 °C com o aumento do C_i , tanto na ausência quanto na presença do HPMS (Figura 6B). Por outro lado, nas plantas pré-expostas ao estresse hídrico os valores alcançados para a fixação de carbono (P_N) foram similares aos observados nas plantas mantidas sob condições irrigadas sob pressões elevadas de CO₂, acima de 400 ppm. Em valores de pressão de CO₂ próximo ao atmosférico, a P_N foi correspondente ao mensurado por medidas instantâneas (Figura 5A). Esses resultados mostram que sob temperaturas elevadas (42 °C), o processo de fixação de carbono foi aparentemente favorecido pelo aumento da pressão de CO₂ (Figura 6B). A estimativa da fotorrespiração (P_r) mostrou que apesar da redução de atividade da GO, em resposta a inibição e aos tratamentos de seca e calor, ocorreu aumentos desse parâmetro (Tabela 2).

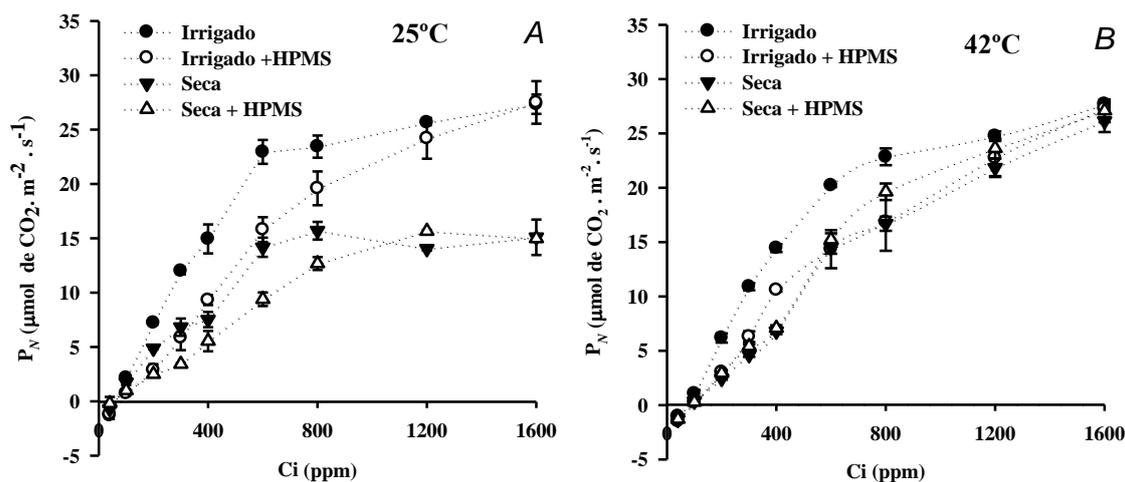


Figura 6. Curvas P_N/C_i em plantas de arroz submetidas ao estresse hídrico associado a temperatura baixa (A) e elevada (B), quando submetidas ao tratamento com inibidor para a atividade da enzima oxidase do glicolato (α -hidroxissulfonato-HPMS). Os valores são médias de três repetições \pm desvio padrão. Durante as leituras a intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) foi mantida em $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

O estresse hídrico e o calor estimularam a fotorrespiração nas plantas de arroz, uma resposta independente da inibição de atividade da GO. Em adição, acompanhados dessas reduções significativas na Pr, a velocidade de carboxilação máxima da Rubisco (V_{cmax}), taxa máxima de transporte de elétrons (J) e respiração de claro também seguiram o mesmo comportamento da fotorrespiração (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros associados com a eficiência fotossintética estimados a partir das curvas P_N-C_i em plantas de arroz sob os efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e excesso de calor, submetidas ao tratamento com inibidor para a oxidase do glicolato (α -hidroxissulfonato-HPMS).

Tratamentos	Parâmetros fotossintéticos				
	V_{cmax}	J	Rd	Pr	
25°C	Irrig.	60 ^a	106a	1,41a	0,000d
	Irrig.+HPMS	34b	100a	1,57a	1,185c
	Seca	30b	60b	0,18b	1,768b
	Seca+HPMS	14c	59b	0,23b	2,330a
42°C	Irrig.	66 ^a	112a	1,41a	0,165d
	Irrig.+HPMS	55bc	98a	1,57a	1,365c
	Seca	42c	72b	0,18b	1,968b
	Seca+HPMS	36c	59c	0,23b	2,830a

Parâmetros fotossintéticos: Velocidade máxima de carboxilação da Rubisco ($V_{\text{cmax}}/\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), taxa de transporte de elétrons ($J/\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), respiração de claro ($Rd/\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e taxa fotorrespiratória ($Pr/\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Os valores representam médias de três repetições \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

3.3-MUDANÇAS DA ATIVIDADE FOTOQUÍMICA EM PLANTAS DE ARROZ EXPOSTAS AOS ESTRESSES DE SECA E CALOR QUANDO SUBMETIDAS À REDUÇÃO PARCIAL DE ATIVIDADE DA GO

Os estresses de seca e temperatura elevada afetaram diferentemente a atividade fotoquímica das plantas de arroz, conforme indicado pela eficiência quântica máxima e efetiva dos fotossistemas II, taxa aparente de transporte de elétrons e quenching fotoquímico e não fotoquímico (Figura 7). A eficiência quântica máxima do PSII (dada pela relação F_v/F_m) não foi afetada em resposta aos diferentes estresses avaliados (Figura 7A). De forma similar, nas plantas de arroz mantidas em 25 °C por 12 horas não foram observadas mudanças da eficiência quântica efetiva do PSII. Por outro lado, nas plantas submetidas à temperatura elevada (42 °C) durante 12 horas a eficiência quântica efetiva ($\Delta F/F_m'$) foi reduzida em cerca de 50% apenas naquelas bem irrigadas, resposta que não foi influenciada pelo tratamento pela inibição parcial da GO (Figura 7B).

Conforme observado para a eficiência quântica efetiva, as plantas mantidas em 25 °C por 12 horas não apresentaram mudanças do quenching fotoquímico (qP) quando cultivada irrigadas ou expostas a seca, se comparadas com as plantas referência (Figura 7C). No entanto, nas plantas submetidas ao excesso de calor por 12 horas ocorreu uma redução média de 50% no qP naquelas bem irrigadas, enquanto nas plantas submetidas ao estresse de seca o excesso de calor não influenciou o quenching fotoquímico (Figura 7C). Com relação às mudanças ao quenching não fotoquímico, as plantas mantidas a 25 °C por 12 h não apresentaram alterações na dissipação do calor por esse mecanismo em repostas aos diferentes estresses (Figura 7D).

Por outro lado, nas plantas sob calor ocorreu um aumento médio do NPQ de 300% e 100% quando mantidas irrigadas e irrigadas + HPMS, respectivamente, comparadas as plantas sob condições de referência. Nas plantas submetidas ao estresse hídrico foi observado um aumento médio de 120% quando expostas ao calor, enquanto nas plantas mantidas na mesma condição não apresentaram mudanças do NPQ quando tratadas com o HPMS, se comparado as plantas referência (Figura 7D). Esse resultado mostra que a inibição parcial de atividade a oxidase do glicolato aparentemente afetou a dissipação de energia por meio do NPQ.

A taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) (Figura 7E) seguiu a tendência da eficiência quântica efetiva ($\Delta F/F_m'$) e quenching fotoquímico (qP). Nas plantas irrigadas por 12 horas a 25°C não foram observadas mudanças na (ETR) diferentemente das mantidas a temperatura elevada. A exposição a 42°C durante 12 horas ocasionou

uma redução de 55% nas plantas irrigadas, reposta que também não foi influenciada pela inibição parcial da GO (Figura 7E). Por outro lado, foi observado um aumento de excesso de elétrons médios para a fotossíntese nas plantas em respostas a seca e a combinação de seca com o excesso de calor em cerca de 90 %, com base na relação ETR/P_N (Figura 7F). Esse aumento do excesso de elétrons para a fotossíntese não ocorreu nas plantas expostas ao calor isoladamente. Por outro lado, foi influenciado pela inibição da atividade da oxidase do glicolato tanto nos estresses isolados de seca e na combinação com o excesso de calor.

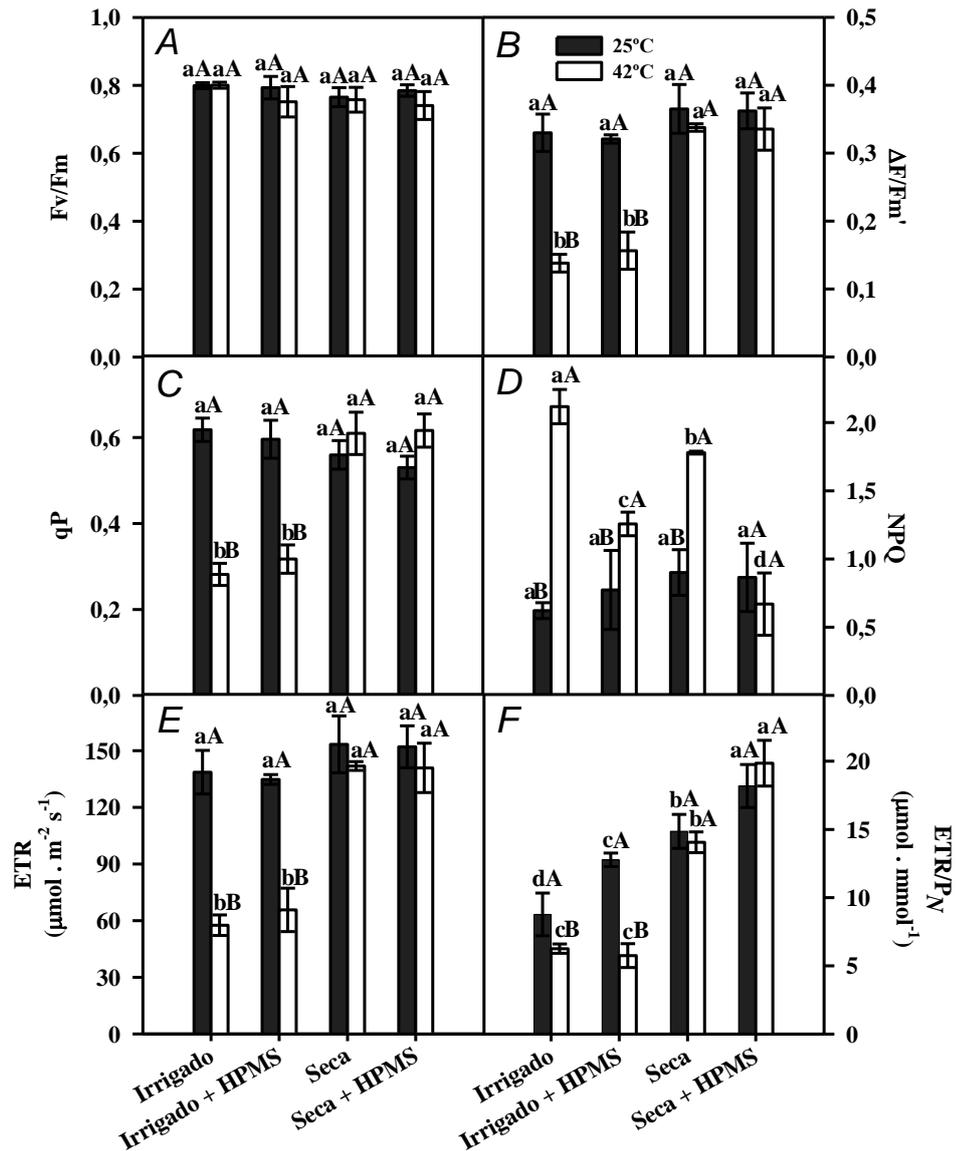


Figura 7. Eficiência quântica máxima (A) e efetiva do PSII (B), quenching fotoquímico (C), quenching não fotoquímico (D), taxa aparente de transporte de elétrons (E) e excesso de elétrons para a fotossíntese dada pela razão ETR/P_N (E) em plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor. Dados representam as médias de 4 repetições ± desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey (P<0,05).

3.4-MODULAÇÃO DA ENZIMA OXIDASE (GO) PELO INIBIDOR A-HIDROXISULFONATO E PELOS ESTRESSES DE SECA E CALOR NÃO ESTÁ ASSOCIADA A MUDANÇAS EM METABOLITOS ASSOCIADOS

As plantas de arroz expostas a temperatura elevada não apresentaram mudanças na atividade da oxidase do glicolato (Figura 8A). No entanto, nas plantas irrigadas submetidas ao tratamento de inibição da GO ocorreram reduções médias de 50% de sua atividade quando expostas a 25°C e 42°C por 12 h, comparado as plantas referência, mostrando o efeito inibitório parcial do HPMS sobre a atividade da GO *in vivo* no arroz. De forma similar, a atividade da GO foi reduzida em mesma intensidade (50%) nas plantas submetidas ao estresse hídrico, independente da temperatura de exposição. Por outro lado, as plantas pré-expostas a seca apresentaram uma maior redução (cerca de 60%) da atividade da GO em respostas ao efeito do inibidor, indicando um efeito sinérgico (aditivo) do estresse hídrico na redução de atividade da GO nessas condições.

A GO catalisa uma reação específica nos peroxissomos em células vegetais, na qual o glicolato é convertido a glioxilato gerando quantidades equimolares de peróxido de hidrogênio. Dessa forma, uma redução de atividade da GO pode estar associada com um menor conteúdo do produto direto (glioxilato) ou indireto (peróxido de hidrogênio) da reação no tecido. No entanto, os dados obtidos no presente estudo mostram que essa aparente relação não ocorreu. Nas plantas irrigadas mantidas a 25 °C e tratadas com o HPMS não ocorreu redução no teor de glioxilato se comparadas às plantas referência, apesar da redução de atividade da GO (Figura 8B). Por outro lado, nas plantas pré-expostas a seca foi observado um aumento de cerca de 20% no conteúdo de glioxilato nas plantas mantidas em 25 °C, resposta independente a inibição parcial da GO.

As plantas irrigadas apresentaram aumento de 25% do conteúdo de glioxilato foliar em resposta ao calor comparadas às plantas referência, tanto na ausência quanto na presença do inibidor. Assim, essa resposta ocorreu a despeito da menor atividade da GO (50%) nas plantas tratadas para inibição, demonstrando a falta de relação direta da atividade dessa enzima com o conteúdo de glioxilato. O estresse hídrico causou uma redução média de 15% no conteúdo de glioxilato nas plantas expostas ao calor, se comparado as plantas nas mesmas condições irrigadas, embora não tenha apresentado redução em relação às plantas referência (Figura 8B). Esses dados mostram que as mudanças no conteúdo de glioxilato na célula vegetal não devem ser atribuídas exclusivamente a alterações de atividade da oxidase do glicolato.

Assim como observado para o conteúdo de glioxilato os dados também mostram falta de relação direta entre atividade da GO e teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nas plantas mantidas a 25 °C não ocorreu mudanças no conteúdo de H_2O_2 nas folhas em repostas aos diferentes tratamentos aplicados, quando comparadas às plantas mantidas sob as condições de referência (Figura 8C). De forma similar, o conteúdo de H_2O_2 apresentou aumento de cerca de 25% apenas nas folhas de plantas submetidas ao estresse hídrico quando tratadas para inibição parcial da GO. Esses dados mostram que essa aparente estabilidade no teor de H_2O_2 nas plantas de arroz expostas às diferentes condições estudadas não possui relação direta com a função fisiológica da GO.

A produção de H_2O_2 associada à reação catalisada pela GO nos peroxissomos representa uma importante fonte de agentes oxidantes, podendo causar danos oxidativos celulares. Os dados mostram que a intensidade da peroxidação lipídica, estimada com base no conteúdo de TBARS, em plantas mantidas em 25 °C e expostas à seca bem como a redução de atividade da GO não foi afetada, se comparadas às plantas referência (Figura 8D). Por outro lado, nas plantas pré-expostas a seca e submetidas à temperatura elevada apresentaram aumento de 25% no conteúdo de TBARS apenas quando tratadas para inibição da GO, indicando aumento expressivo da peroxidação lipídica. Em conjunto, esses resultados mostram falta de relação entre atividade da GO com acúmulo de H_2O_2 e a indução de danos oxidativos, exceto nas plantas submetidas à seca combinada ao calor apresentando redução parcial de atividade da GO. Em adição, com a redução da atividade da GO pelo inibidor, esperava-se também um menor conteúdo dos aminoácidos glicina e serina, metabólitos a jusante da via fotorrespiratória, o que os dados não demonstraram. Os conteúdos dos aminoácidos glicina e serina foram aumentados pelos estresses em estudo e principalmente pelo HPMS (Figura 9).

Os conteúdos de glicina nas plantas irrigadas na presença do HPMS não foram alterados a 25°C em relação à referência (Figura 9A). Por outro lado, nas plantas expostas a seca na ausência e presença do HPMS os aumentos significativos foram na ordem de 244% e 566%. Nas plantas irrigadas expostas 42°C, na presença do HPMS o aumento foi de cerca de 100%. Esses aumentos no conteúdo de glicina foram ainda mais intensos na combinação (seca + excesso de calor) na ausência e presença do HPMS em cerca de 305% e 850% em relação a referência (Figura 9A). Em adição, os conteúdos de serina aumentaram em exposição estresses de seca, calor e a combinação (seca + excesso de calor), e foram significativamente maiores na presença do HPMS. Nas plantas irrigadas a 25°C, na presença do HPMS o aumento foi cerca 316%,

enquanto que nas plantas expostas a seca na ausência e presença do inibidor, foram observado aumentos de 177% e de mais de 1000% em relação à referência (Figura 9B).

Semelhantemente aos conteúdos de glicina, as plantas quando mantidas irrigadas e expostas a 42°C na ausência e presença do HPMS o aumento foi cerca de 483% e 939%. Por outro lado, na combinação dos estresses de (seca + excesso de calor) ocorreram aumentos ainda mais intensos, na ordem de 1289% e 2266% na ausência e presença do HPMS em relação à referência (Figura 9B). Esses dados claramente indicam que mesmo sob redução da atividade da GO, os conteúdos de glicina e serina, metabólitos a jusante da via fotorrespiratória foram claramente aumentados, sugerindo um efeito compensatório por reações anapleróticas.

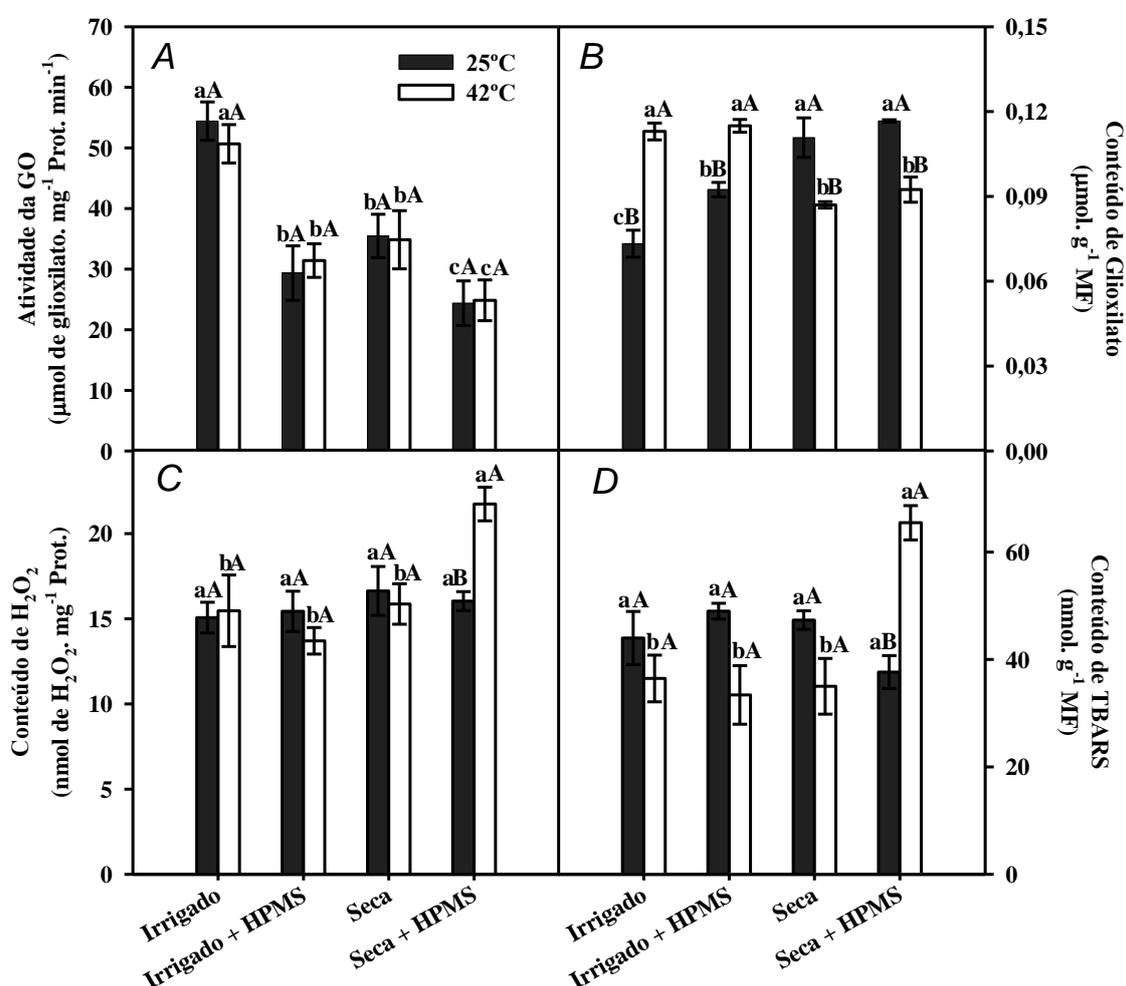


Figura 8. Mudanças da atividade da enzima oxidase do glicolato GO (A) e nos conteúdos de glioxilato (B), peróxido de hidrogênio(C) e na peroxidação de lipídica (D) em plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

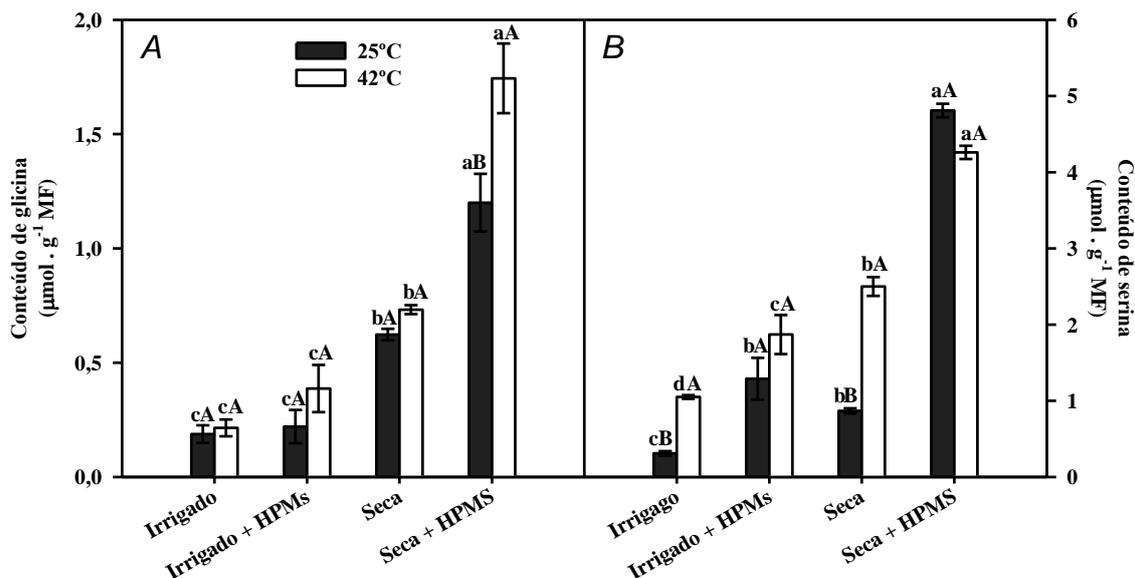


Figura 9. Conteúdo dos aminoácidos glicina (A) e serina (B) em plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

3.5-ATIVIDADE DE ENZIMAS OXIDATIVAS (SOD, CAT E APX) E CONTEÚDO DE ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS (ASA E GSH) EM PLANTAS DE ARROZ COM REDUZIDA DE ATIVIDADE DA GO SOB ESTRESSES DE SECA E CALOR

As atividades das enzimas dismutases do superóxido (SOD), peroxidases do ascorbato (APX) e catalases (CAT) foram diferentemente afetadas pelos estresses isolados e combinados de seca e calor, respostas influenciadas pela redução de atividade da GO (Figura 10). Nas plantas em 25 °C a atividade da SOD foi cerca de 20% quando bem irrigadas e reduzida atividade da GO, não sendo afetada pelo estresse hídrico tanto na ausência quanto na presença da redução da atividade da GO, comparadas as plantas referência (Figura 10A). Nas plantas irrigadas expostas ao calor (45°C por 12h) a atividade da SOD cerca de 20% maior independente da inibição da GO, enquanto que nas plantas submetidas à seca a sua atividade apresentou acréscimos de 100% apenas nas plantas com reduzida atividade de GO (Figura 10 A).

A atividade da APX foi 20% maior nas plantas irrigadas quando expostas a 25 °C, enquanto naquelas pré-expostas ao estresse hídrico esse aumento foi em média de 30% e não dependente da GO, comparado as plantas de referência (Figura 10B). Nas

plantas irrigadas submetidas ao calor foi observado um acréscimo similar de 20% na atividade da APX, independente da atividade da GO, enquanto naquelas pré-expostas a seca esse aumento foi de 30%, comparado a referência. Por outro lado, nas plantas inicialmente submetidas ao estresse hídrico e com atividade da GO reduzida a atividade da APX foi reduzida em cerca de 20% em relação às plantas referência (Figura 10B).

A atividade da CAT não foi afetada pelo estresse hídrico nas plantas mantidas em 25 °C, em relação às plantas referência (Figura 10C). No entanto, nas plantas a 25 °C foi observada uma redução de 20% na atividade da CAT em resposta a redução de atividade da GO, tanto nas condições irrigadas quanto de seca (Figura 10C). Por outro lado, as plantas irrigadas expostas ao excesso de calor apresentaram redução de 25% da atividade da CAT e nas plantas pré-expostas a seca essa redução foi de apenas 15%, em ambos os casos independente da atividade da GO, se comparadas à referência. O padrão de atividade dessa enzima (CAT) aparentemente foi influenciado pela modulação de atividade da GO, tanto em função do efeito do inibidor quanto pelos estresses avaliados.

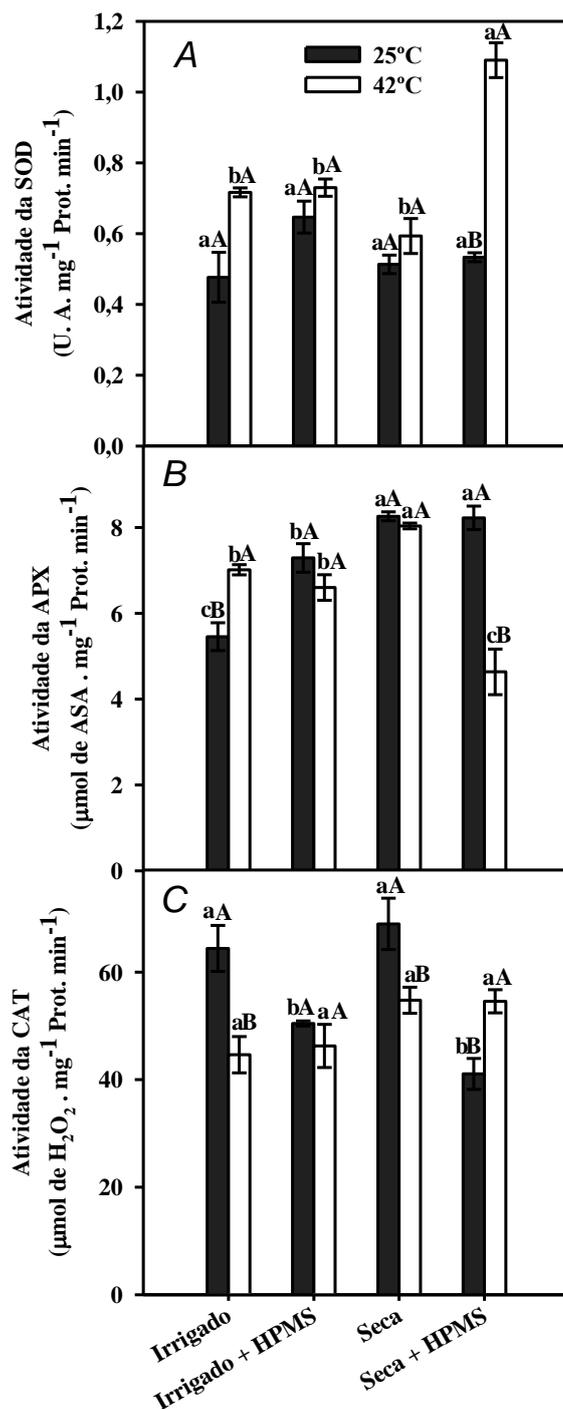


Figura 10. Atividade das enzimas dismutase do superóxido SOD (A), peroxidase do ascorbato APX (B) e catalase CAT(C) em plantas de arroz submetidas aos estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

O conteúdo de ascorbato reduzido (ASA) aumentou 200% nas plantas irrigadas mantidas a 25 °C e com redução na atividade da GO, se comparado às plantas referência (Figura 11A). Nas plantas submetidas ao estresse hídrico ocorreu um acréscimo de 200% no conteúdo de ASA, enquanto naquelas expostas a seca e tratadas para redução da GO esse aumento foi em média de 300%. Nas plantas irrigadas submetidas ao calor foi observado um aumento de 200% no conteúdo do ASA, comparado as plantas referência (Figura 11A). Esse aumento foi ainda maior nas plantas irrigadas com redução da GO ou pré-expostas a seca (cerca de 350%), enquanto naquelas submetidas à seca e tratadas para inibição da GO esse aumento foi de apenas 200%, todas comparadas às plantas referência.

O conteúdo de glutatona reduzida (GSH) nas plantas mantidas a 25°C foi cerca de 20% maior nas plantas irrigadas com redução da GO ou pré-expostas a seca, enquanto naquelas submetidas à seca com menor atividade da GO não foi alterada, comparadas com as plantas referência (Figura 11B). As plantas irrigadas e bem como aquelas submetidas à seca não apresentaram mudanças no teor de GSH em resposta ao calor. Por outro lado, nas plantas irrigadas e naquelas pré-expostas a seca na presença do HPMS, apresentaram aumento de 20% e 250%, respectivamente, quando submetidas à temperatura elevada, em relação às plantas referência (Figura 11B).

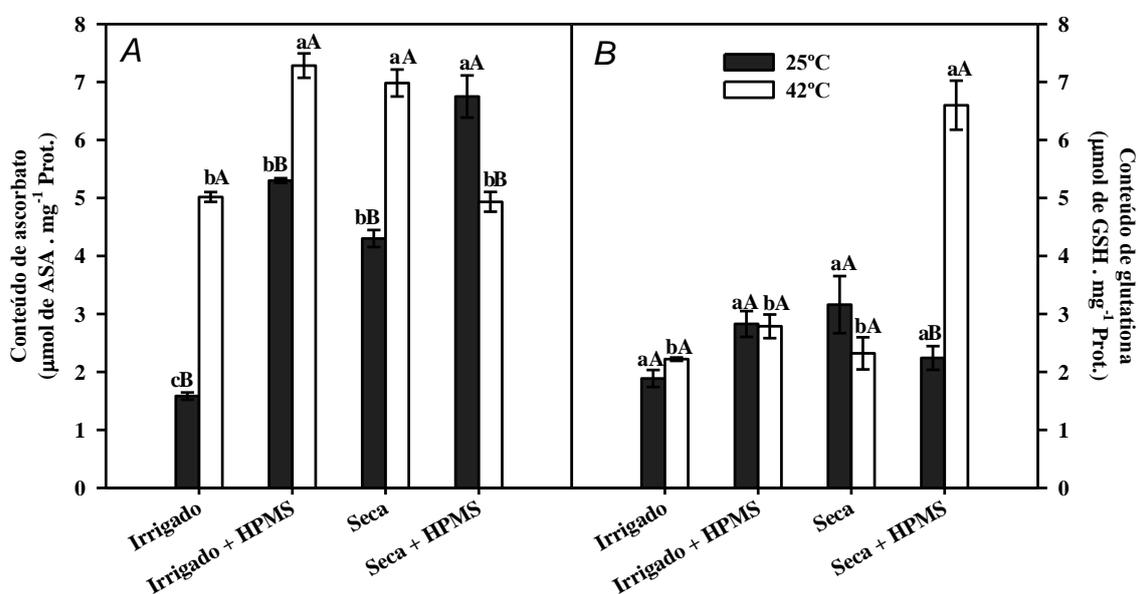


Figura 11. Conteúdo de ascorbato (A), e glutatona reduzidos (B) em plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

3.6-MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA RUBISCO EM RESPOSTAS AOS ESTRESSES DE SECA E CALOR EM PLANTAS DE ARROZ COM REDUZIDA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO

A expressão da Rubisco nas plantas de arroz foi influenciada pelos estresses e pela redução parcial de atividade da GO (Figura 12). O conteúdo dessa enzima foi maior nas plantas de arroz irrigadas mantidas a 25 °C (considerado 100%), o que ocorreu associado à maior fotossíntese líquida (Figura 5A). Nas plantas irrigadas tratadas com HPMS, com menor atividade da GO, ocorreu redução de 20% do teor de Rubisco nas plantas em 25 °C, comparado a referência. O estresse hídrico não afetou o conteúdo da Rubisco, como mostrado pelas plantas pré-expostas a seca e mantidas a 25 °C por 12h. Por outro lado, nas plantas submetidas à seca e tratadas com HPMS ocorreu uma redução de 57% do conteúdo da Rubisco, se comparado a referência. Esses resultados indicam um aparente efeito do inibidor e/ou do processo de inibição da GO na modulação (redução) do conteúdo de Rubisco, tanto na ausência quanto na presença de estresse hídrico, uma resposta não esperada.

Nas plantas expostas ao calor ocorreu uma redução de 50% no teor de Rubisco em relação às plantas referência, quando comparado as plantas irrigadas a 25 °C (Figuras 12A e B). Na presença do calor, plantas mantidas em 42 °C por 12h, essa redução do conteúdo de Rubisco foi cerca de 25% nas plantas irrigadas tratadas com HPMS ou submetidas ao estresse hídrico, enquanto nas plantas sob seca tratadas com HPMS essa redução foi 75%, se comparado as plantas referência. Em conjunto, esses dados mostram que de fato o tratamento de inibição para a enzima oxidase do glicolato afetou o conteúdo da Rubisco no tecido foliar, sugerindo que a resposta celular causada pelo inibidor usado (HPMS) pode afetar a síntese e/ou degradação da Rubisco. Os dados mostram ainda que esse efeito é influenciado pelo calor bem como pelo estresse hídrico.

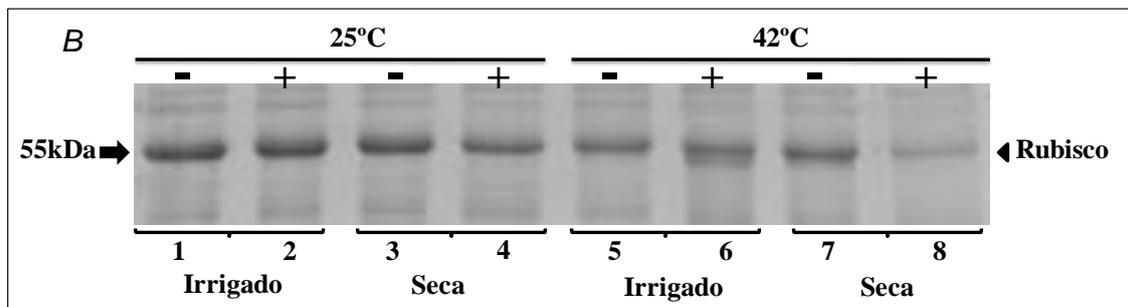
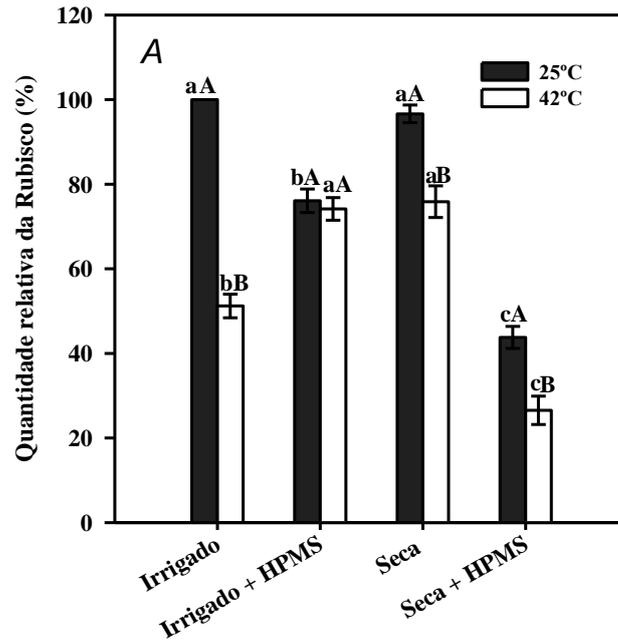


Figura 12. Mudanças na expressão da Rubisco avaliada com base na quantidade relativa da Rubisco (A) e western blotting (B), em folhas de plantas de arroz na ausência ou presença da inibição parcial da enzima glicolato oxidase, em respostas aos estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor. A sequência dos poços: 1 e 5 – Irrigados; 2 e 6 - Irrigados + HPMS; 3 e 7 – Seca; 4 e 8 - Seca +HPMS. Foram aplicados 5 μ g de proteínas em cada poço e a detecção realizadas por meio de anticorpo específico para a subunidade maior da Rubisco (Referência do anticorpo: GW23153/Sigma). Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de temperatura, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada temperatura, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

4-DISCUSSÃO

4.1-MUDANÇAS NA UMIDADE, DANO CELULAR E ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA EM REPOSTAS AOS ESTRESSES ISOLADOS E COMBINADOS DE SECA E CALOR

As plantas de arroz submetidas ao estresse hídrico apresentaram redução do teor de água foliar (CRA), uma restrição que foi intensificada pela exposição ao excesso de calor (Figura 3A). O déficit hídrico também causou danos celulares (Figura 3B), estimulando o vazamento de eletrólitos de forma interativa com a temperatura elevada. A maior redução do CRA nas plantas submetidas à combinação da seca com calor ocorreu associado ao fechamento estomático, indicando que nessas condições a condutância hidráulica da planta foi afetada. O fluxo de água na planta representa um mecanismo fisiológico que contribui para o resfriamento foliar e auxilia no funcionamento estomático (CHAVES et al., 2009). Assim, os dados mostram que os danos causados pela seca no arroz, em relação ao *status* hídrico, podem ser intensificados pelo calor caracterizando uma combinação de fatores abióticos potencialmente negativa (SUZUKI et al., 2014).

O excesso de calor não afetou o conteúdo de clorofilas, enquanto que nas plantas de arroz submetidas à seca foi observada uma intensa redução do teor desses pigmentos. Esse efeito negativo do déficit hídrico sobre o conteúdo de clorofilas não foi influenciado pela combinação com o excesso de calor. A redução do conteúdo de pigmentos fotossintéticos em plantas expostas a estresses abióticos pode afetar a eficiência fotossintética, causando restrição da assimilação de CO₂ por mecanismos não estomáticos (TAKAHASHI e BADGER, 2011). No presente estudo, a diminuição na atividade fotossintética observada (Figura 5A) em resposta ao estresse hídrico isolado estar associado parcialmente ao fechamento estomático (menor g_s e E , Figura 5B-D). A seca é dos mais comuns estresses ambientais que ocasiona reduções em parâmetros estomáticos como a condutância estomática (g_s) e transpiração (E), afetando o desempenho das culturas em todas as fases de desenvolvimento (YUAN et al., 2016). Essa restrição estomática imposta, pelo estresse hídrico, é regulada por hormônios, especialmente ácido abscísico, que pode agir como moléculas sinalizadoras levando ao fechamento estomático (CORNIC, 2000).

Em adição, a manutenção da concentração intercelular de CO₂ (Figura 5C), a análise das curvas P_N/C_i (Figura 6A) e eficiência de carboxilação (Figura 5E) associada

com baixa P_N (Figura 5A) são evidências adicionais que sugerem a ocorrência de limitações não estomáticas nas plantas expostas a seca. A redução na P_N foi intensificada pelo excesso de calor principalmente por fatores estomáticos (baixa g_s e E , Figura 5B-D). Esses dados sugerem uma interação negativa destes fatores na assimilação de carbono (P_N).

Os efeitos da combinação (seca + excesso de calor) resultaram em considerada diminuição na g_s e E indicando que esta condição resulta em um aumento da temperatura foliar que pode ocasionar danos (RIZHSKY et al., 2002). Além das mudanças observadas nas trocas gasosas, a atividade fotoquímica também foi afetada pelos estresses. Foi observado um maior funcionamento na etapa fotoquímica da fotossíntese em condições de seca combinada com o calor, como evidenciados pela eficiência quântica efetiva ($\Delta F/F_m'$), quenching fotoquímico (qP) e taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) (Figura 7B-C-E) enquanto os estômatos estavam parcialmente fechados (Figura 5B-D). Esse desequilíbrio entre as fases fotoquímicas e reações no ciclo de Calvin restringiu a fotossíntese. Todas essas reações ocorrem em regiões diferentes nos cloroplastos e para uma eficiente desempenho fotossintético é necessário ocorrer um equilíbrio entre estas duas etapas o que não aconteceu no presente estudo (ASADA, 2006; RAINES, 2011; EVANS, 2013).

A diminuição da P_N nestas condições é o resultado do desequilíbrio entre a fase fotoquímica e a bioquímica reduzindo a assimilação de CO_2 (Figura 5B-D). Por outro lado, uma menor atividade fotoquímica induzida pelo excesso de calor nas plantas irrigadas e mantidas a 42°C por 12 horas, explica também em parte uma menor assimilação de CO_2 nas plantas expostas ao calor isoladamente. A resposta das plantas a combinação dos estresses (seca + excesso de calor) no presente estudo, favoreceu a atividade fotoquímica, entretanto restringiu a abertura estomática demonstrando o efeito negativo destes fatores no metabolismo vegetal quando combinados (RIZHSKY et al., 2002).

A restrição hídrica causa diminuição no status hídrico foliar indicado pelo conteúdo relativo de água (CATTIVELLI et al., 2008). Entretanto, as plantas de arroz expostas à seca esse parâmetro não foi afetado (Figura 3A). Na literatura, tem sido documentado que as plantas fecham os estômatos para evitar a perda de água e manter o turgor celular, possivelmente devido esse motivo este parâmetro não foi alterado (PEREIRA e IRUJO, 2008). Na combinação dos estresses (seca + excesso de calor), o status hídrico reduziu o conteúdo de água na folha o que ocorreu associado com baixa E

(Figura 5D) indicando incapacidade de dissipação térmica e manutenção do status hídrico foliar na combinação da seca com o calor.

O NPQ representa um importante mecanismo de fotoproteção que dissipa o excesso de energia na forma de calor em vez de ser usado para conduzir a fotossíntese (BAKER et al., 2008; LI et al., 2009). Este importante mecanismo aumentou em resposta ao calor e a combinação (seca + excesso de calor), exceto na presença do HPMS onde esse parâmetro foi reduzido intensamente, o que aumentou a probabilidade de fotodano (ZHOU et al., 2007) (Figura 7D). Além disso, o dreno alternativo de elétrons aumentou em resposta a seca e a combinação (seca + excesso de calor) (Figura 7F). Dessa forma, aumentou o excesso de elétrons para outras via alternativas diferente da assimilação de carbono (P_N). O aumento nestes drenos alternativos de elétrons em respostas ao estresse hídrico e combinação (seca + excesso de calor) provavelmente conferiu uma proteção adicional ao PSII (Figura 7A) que se manteve em torno de 0,8, valor considerado ótimo que sugere ausência de danos (CHAVES et al., 2002).

4.2-OXIDASE GLICOLATO, MUDANÇAS EM METABÓLITOS ASSOCIADOS E MECANISMOS DE PROTEÇÃO OXIDATIVA

A atividade da oxidase do glicolato (GO) representa um passo essencial na via fotorrespiratória, além de sua reação ser considerada a principal fonte de peróxido de hidrogênio nos peroxissomos (FOYER e NOCTOR et al., 2003). Esta enzima oxida o glicolato a glioxilato produzindo grandes quantidades de peróxido de hidrogênio (BAWER et al., 2010). Entretanto, os dados demonstram que estes produtos tanto direto (glioxilato) como indireto (peróxido de hidrogênio) nem sempre podem ser associados com a atividade da GO. A redução da atividade da GO (Figura 8A) pelo α -hidroxissulfonato (HPMS), inibidor específico da enzima, mostrou que tanto o glioxilato como os aminoácidos glicina e serina podem ser compensados por reações anapleróticas em decorrência de uma menor atividade da GO (Figura 8B e 9A-B).

Xu et al., (2009) usando a técnica de silenciamento gênico da GO em plantas de arroz observou também que metabólitos a jusante da reação catalisada pela GO podem ser produzidos e/ou acumulados. Esses resultados indicam que a via da fotorrespiração pode ser regulada de diferentes maneiras, ainda pouco conhecidas (YAMAGUCHI e NISHIMURA, 2000). Por exemplo, a enzima glicolato dehydrogenase pode ter contribuído para produção de glioxilato (BARI et al., 2004).

A redução no conteúdo de glioxilato em resposta a combinação dos estresses de seca e calor (Figura 8B), possivelmente pode ter ocorrido pelo consumo no ciclo do glioxilato em glioxissomos que é possível de acontecer sob estresses abióticos (DEL RIO et al., 2002). Além disso, o acúmulo de H_2O_2 que induziu danos oxidativos na combinação dos estresses (seca + excesso de calor) a sua produção não foi associada à atividade da GO (Figura 8A-C-D). Nas plantas, podem existir outras fontes de produção do H_2O_2 , inclusive nos peroxissomos, como pela atividade da enzima xantina oxidase (DEL RIO et al., 2006; CORPAS et al. 2008) e também a NADPH oxidase, que em altas temperaturas aumentam os níveis de Ca^{2+} no citosol ativando esta proteína e assim produzindo H_2O_2 (JASPERS e KANGASJÄRVI, 2010; MITTLER et al., 2012; DEMIDCKI, 2015).

Neste estudo, os dados demonstram que a produção de H_2O_2 ocorreu principalmente por distúrbios do metabolismo fotossintético nos cloroplastos pela combinação dos estresses (seca + excesso de calor) evidenciados pela alta atividade da dismutase de superóxido (Figura 10A) (ASADA, 2006). Adicionalmente, a baixa atividade da GO induzida pelo inibidor específico (HPMS), com a baixa atividade da catalase claramente demonstram a associação destas enzimas no controle da produção de H_2O_2 durante a fotorrespiração (ZHANG et al., 2016). A combinação dos estresses (seca + excesso de calor) proporcionou um efeito mais prejudicial à eficiência fotossintética indicada pelas trocas gasosa em concordância com o dano de membrana, conteúdo de H_2O_2 e peroxidação de lipídios (Figura 3B e 8C-D).

Esses efeitos na membrana plasmática demonstrados por estes indicadores de danos oxidativos (DM, TBARS e H_2O_2) se deve como consequência dos danos oxidativos gerados pela combinação dos estresses. Para o metabolismo vegetal essa combinação leva a impactos negativos para agricultura como tem sido documentada (MITTLER, 2002). As plantas desenvolveram diversos mecanismos de proteção para manter as espécies reativas de oxigênio em níveis baixos e assim manter a homeostase redox (MITTLER, 2002). Destes mecanismos, fazem parte os enzimáticos, composto pelo sistema SOD-CAT-APX, que trabalham de forma coordenada mantendo os EROs em níveis baixos. Como também os não enzimáticos, dos quais fazem parte o ascorbato e glutathiona (GILL e TUTEJA, 2010; XU et al., 2013; BARBOSA et al., 2014).

No presente estudo, os dados demonstram que sob condição de seca o sistema SOD-CAT-APX juntamente com o ciclo ASA-GSH (Figura 10A-B e Figura 11A) foram responsáveis por manter a homeostase redox independente da inibição da GO.

Por outro lado, na combinação dos estresses (seca + excesso de calor) na presença do HPMS, esses mecanismos não foram suficientes para evitar os danos oxidativos gerado pelo aumento de H_2O_2 (Figura 8C e 10A). O acúmulo de peróxido de hidrogênio pode estar nestas condições associado com baixa atividade da APX-CAT, como tem sido documentado na literatura (RIVERO et al., 2004; SGOBBA et al., 2015). A tolerância das plantas a altas temperaturas tem sido associada com o aumento da capacidade antioxidante (SGOBBA et al., 2015).

Entretanto, na combinação dos estresses (seca + excesso de calor) essa capacidade foi reduzida principalmente pelo sistema SOD-CAT-APX. A catalase mantém a homeostase redox durante a fotorrespiração em arroz como também foi demonstrado por Sousa et al., (2015). Os mecanismos de defesa não enzimático do ciclo ASA-GSH da qual a APX estar diretamente ligada, foram os mais atuantes na proteção oxidativa (Figura 11A-B). Os níveis de ascorbato foram maiores em plantas tratadas como (HPMS) tanto na condição irrigada como também no estresse hídrico a 25°C, e mais ainda na exposição ao calor (42°C), exceto na combinação (seca + excesso de calor) e presença do inibidor da GO.

Esses resultados sugerem que o arroz utiliza fortemente o ascorbato para manter o estado redox celular independente da fotorrespiração. Esse fato explica o aumento da atividade da APX nas mesmas condições. A APX utiliza o ascorbato como doador de elétrons e são sensíveis a baixas concentrações de ascorbato (SHIGEOKA et al., 2002; FOYER e NOCTOR, 2011; GEST et al., 2013). Interessantemente, em relação à glutathiona (GSH), foi observado um significativo aumento no conteúdo de GSH onde justamente o conteúdo de ascorbato diminui (Figura 11B). Esse aumento de GSH faz parte de várias respostas coordenadas que são induzidas em resposta a estresses oxidativos pelo aumento de H_2O_2 , ou de outros oxidantes no meio celular (QUEVAL et al., 2011; NOCTOR et al., 2013). Na literatura, em várias espécies de plantas têm sido registrados esses aumentos em GSH com plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes em catalase (QUEVAL et al., 2007).

4.3-EXPRESSÃO DA RUBISCO EM RESPOSTAS A ESTRESSES ABIÓTICOS E SUA RELAÇÃO COM A FOTORRESPIRAÇÃO

O papel da proteína Rubisco em condições de estresses abióticos como seca e calor, tem sido bastante estudada (GALMÉS et al., 2013). A diminuição na expressão

da Rubisco pelo estresse de seca e calor tem sido documentada na literatura em muitas espécies, por exemplo, em *Citrus* e também *Oriza sativa* L. (VU et al. 2002; WANG et al. 2010; GALMÉS et al., 2013). O conteúdo relativo da Rubisco em resposta aos estresses isolados de seca não foram afetados no presente estudo (Figura 12A). Mesmo assim, a manutenção da concentração desta enzima, não implica necessariamente em funcionalidade desta proteína no que diz respeito à carboxilação. Sob estresse de seca, os sítios catalíticos da Rubisco podem ser bloqueados pelo aumento da concentração de inibidores prejudicando assim a função carboxilase da proteína (PARRY et al., 2002; CARMO-SILVA et al., 2010). Esse fato pode explicar a diminuição da P_N mesmo quando seu conteúdo não foi afetado pelo estresse em estudo (Figura 5A e 12A).

A inibição da oxidase do glicolato claramente reduziu o conteúdo de Rubisco no tecido foliar e aparentemente a fotossíntese (Figura 5A e 12A-B). Importante relatar que a atividade da GO representa um passo essencial na via fotorrespiratória (XU et al., 2009). Sua reação iniciada pela oxigenação da Rubisco leva a produção de uma molécula de 3PGA e uma molécula de 2PG. O custo da reciclagem da molécula de 2PG é alto. São necessários 12.5 ATP por molécula de 2PG, além da perda de carbono na mitocôndria (PETERHANSEL et al., 2010). Esta via há algum tempo tem sido conhecida como processo metabólico que compete com a fotossíntese levando a prejuízos para as plantas (FOYER e NOCTOR, 2011). Dessa forma, muitos cientistas buscaram maneiras de abolir esta via (OGREN, 1984).

Vários estudos foram conduzidos com mutantes deficientes em algumas enzimas (SOMERVILLE e OGREN, 1982; SOMERVILLE, 2001; QUEVAL et al., 2007) e para culturas como arroz (TIMM e BAUWER, 2013). Intrigantemente, todos esses mutantes apresentaram fenótipo fotorrespiratório (necessidade de alto CO_2) com inibição da fotossíntese (XU et al., 2009). Outra abordagem foi proposta por Kebeish et al., (2007), desviando (bypass) o glicolato no cloroplasto e aumentando a pressão de CO_2 próximo a Rubisco em *Arabidopsis thaliana*. Como resultado, as plantas tiveram um rendimento satisfatório e tentador, motivo que levou a introdução deste “bypass” em batata, *Solanum tuberosum* (NOLKE et al., 2014) e também em oleaginosas, *Camelina sativa* (DALAL et al., 2015).

Entretanto, esses benefícios foram obtidos em condições ótimas de água e nitrogênio o que pode não acontecer no campo (BETTI et al., 2016). No presente estudo, resultados semelhantes foram obtidos ao de Xu et al., (2009). Apesar da inibição da GO foram observados aumento na fotorrespiração (Pr) e seguidos de diminuição na

velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e respiração (R_d) como indicado na Tabela 2. Das hipóteses que foram propostas a de que a ruptura na via pode levar ao acúmulo de metabólicos que podem conferir um efeito negativo no ciclo de Calvin tem sido mais aceito (WINGLER et al., 2000; XU et al., 2009).

O glicolato foi à molécula candidata tendo em vista seu expressivo acúmulo em plantas silenciadas para o gene da GO (XU et al., 2009). Entretanto, recente pesquisa com supressão também da GO em arroz, tem identificado que o acúmulo de glioxilato é na verdade responsável pela inibição da Rubisco (LU et al., 2014). Neste estudo, não mensuramos o estado de ativação da Rubisco, entretanto o conteúdo de glioxilato foi de fato aumentado em plantas de arroz com a inibição da GO expostas ao estresse hídrico, fornecendo evidências que possivelmente esse tenha sido o motivo da redução P_N decorrentes de limitações metabólicas no presente estudo. O aumento de glioxilato ocorreu nas plantas a 25°C irrigadas e expostas à seca (Figura 8A) o que pode explicar à menor P_N atribuídos em parte a limitações metabólicas.

Por outro lado, a exposição ao estresse combinado (seca + excesso de calor) com inibição da GO teve um efeito mais prejudicial ao conteúdo da Rubisco e da fotossíntese, que não pode ser relacionado ao conteúdo de glioxilato, por ter diminuído nestas condições. A redução do conteúdo da Rubisco e da P_N pode ser explicada pelo aumento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) aumentando a taxa de degradação da Rubisco (MOLLER, 2007; KHAMA-CHOPRA, 2011). Além disso, o peróxido pode atuar como um forte inibidor da fotossíntese reduzindo em até 50 % a assimilação de carbono pela oxidação de enzimas no ciclo de Calvin (FOYER et al., 2011).

5-CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados mostram que a combinação de seca e calor afeta severamente o metabolismo fotossintético por ocasionar restrições estomáticas e não estomática, envolvendo limitações fotoquímicas e metabólicas. Mostram ainda que a redução de atividade da GO não reduziu a fotorrespiração e não estimulou a fotossíntese líquida, como também não apresentou relação direta com os teores de metabolitos da via fotorrespiratória. Além dessas informações, os dados indicam que sob as condições dos estresses estudados a via fotorrespiratória parece não ser a principal geradora de danos oxidativos na espécie.

6-REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol-oxydase in *Beta vulgaris*, **Plant Physiology**, v.24, p.1-15, 1949.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v. 141, p. 391-396, 2006.

BAGARD, M.; THIEC, D. L.; DELACOTE, E.; HASENFRATZ-SAUDER, M-P.; BANVOY, J.; GÉRARD, J.; DIZENGREMEL, P.; JOLIVET, Y. Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. **Physiol. Plant.**, v.134, p. 559-74, 2008.

BARI, R.; KEBEISH, R.; KALAMAJKA, R.; RADEMACHER, T.; PETERHANSEL, C. A glycolate dehydrogenase in the mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 623-630, 2004.

BARBOSA, M. R.; M. M. A., SILVA; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.44, p. 453-460, 2014.

BAUWE, H., HAGEMANN, M., FERNIE, A. R. Photorespiration: players, partners and origin. **Trends in Plant Science**, v. 15, p. 330-336, 2010.

BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 89-113, 2008.

BAKER, A. L. TOLBERT, N. E. Glycolate oxidase (ferredoxin-containing form). **Methods in Enzymology**, v.9, 339-340, 1966.

BETTI, M.; BAUWE, H.; BUSCH, F. A.; FERNIE, A. R.; KEECH, O.; LEVEY, M.; ORT, D. R.; PARRY, M. A. J.; SAGE, R.; TIMM, S.; WALKER, B.; WEBER, A. P. M. Manipulating photorespiration to increase plant productivity: recent advances and perspectives for crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, p. 2-12, 2016.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem.**, v. 44, p. 276-287, 1971.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARMO-SILVA, A. E.; KEYS, A. J.; ANDRALOJC, P. J.; POWERS, S. J.; ARRABACA, M. C.; PARRY, M. A. J. Rubisco activities, properties, and regulation in three different C4 grasses under drought. **Jornal of Experimental Botany**, v. 61:2355-2366, 2010.

CATTIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECK, F.W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A. M.; FRANCIA, E.; MARÉ, C.; TONDELLI, A.; STANCA, A. M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v. 105, p. 1-14. 2008.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, p. 551-560, 2009.

CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M. L.; RICARDO, C. P. P.; OSÓRIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How Plants Cope with Water Stress in the Field. Photosynthesis and Growth. **Annals of Botany**, v. 89, p. 907-916, 2002.

CHAGAS, R. M.; SILVEIRA, J. A. G.; RIBEIRO, R. V.; VITORELLO, V. A.; CARRER, H. Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 181-188, 2008.

CHEESEMAN, J. M. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 2435-2444, 2006.

CIAIS, PH.; REICHSTEIN, M.; VIOVY, N.; GRANIER, A.; OGEE, J.; ALLARD, V.; AUBINET, M.; BUCHMANN, N.; BERNHOFER, CHR.; CARRARA, A.; CHEVALLIER, F.; NOBLET, N.; FRIEND, A. D.; FRIEDLINGSTEIN, P.; GRUNWALD, T.; HEINESCH, B.; KERONEN, P.; KNOHL, A.; KRINNER, G.; LOUSTAU, D.; MANCA, G.; MATTEUCCI, G.; MIGLIETTA, F.; OURCIVAL, J. M.; PAPAIE, D.; PILEGAARD, K.; RAMBAL, S.; SEUFERT, G.; SOUSSANA, J. F.; SANZ, M. J.; SCHULZE, E. D.; VESALA, T.; VALENTINI, R. Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. **Nature**, v. 437, p. 529-533, 2005.

CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; VALDERRAMA, R.; BARROSO, J. B.; DEL RIO, L. A. Peroxisomal xanthine oxidoreductase: Characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1319-1330, 2008.

CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture not by affecting ATP synthesis. **Trends Plant Sci.**, v. 5, p. 187-188, 2000.

DALAL, J.; LOPEZ, H.; VASANI, N. B.; HU, Z.; SWIFT, J. E.; YALAMANCHILI, R.; DVORA, M.; LIN, X.; XIE, D.; QU, R.; SEDEROFF, H. W. A photorespiratory bypass increases plant growth and seed yield in biofuel crop *Camelina sativa*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 2-22, 2015.

DELUC, L. G.; QUILICI, D. R.; DECENDIT, A.; GRIMPLET, J.; WHEATLEY, M. D.; SCHLAUCH, K. A.; MÉRILLON, J. M.; CUSHMAN, J. C.; CRAMER, G. R. Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. **BMC Genomics**, v. 10, p. 1-33, 2009.

DEL RÍO, L. A.; CORPAS F. J.; SANDALIO, L. M.; PALMA, J. M.; GÓMEZ, M.; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1255-1272, 2002.

DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; BARROSO, J. B. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. **Plant Physiology**, v. 141, p. 330-335, 2006.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212-228, 2015.

EVANS, J. R. Improving Photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 162, p. 1780-1793, 2013.

FOYER, C., NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytol.**, v. 146, p. 359-388, 2000.

FOYER, C. H., NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355-364, 2003.

FOYER, C., NOCTOR, G. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. **Plant Physiology**, v. 155, p. 2-18, 2011.

FIDALGO, F., SANTOS, A., SANTOS, I. e SALEMA, R. Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. **Ann. Appl. Biol.**, v. 145, p. 185-192, 2004.

GALMÉS, J.; ARANJUELO, I.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. **Photosynth Res**, v. 117, p. 73-90, 2013.

GEST, N.; GAUTIER, H.; STEVENS, R. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 695–709, 2013.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GIANNOPOLITIS, O.; RIES, S. K. Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal Biochem.**, v. 106, p. 207-211, 1980.

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

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

HOAGLAND, D. R.; D. I. ARNON. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular**, v. 347, p.1-32, 1950.

IPCC. 2007. SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K. B.; TIGNOR, M.; MILLER, H. L., eds. **Climate change 2007: the physical science basis**. Contribution of Working Group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, UK & New York, NY, USA: Cambridge University Press.

ISHIBASHI, Y.; YAMAGUCHI, H.; YUASA, T.; IWAYA-INOUE, M.; ARIMA, S.; ZHENG, S. H. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1562-1567, 2011.

JASPERS, P.; KANGASJÄRVI, J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. **Physiol Plant**, v. 138, p. 405-413, 2010.

KAMPFENKEL, K.; MONTAGU, M. V.; INZÉ, R. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical biochemistry**. v. 225, p. 165-167, 1995.

KHANNA-CHOPRA, R. Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. **Protoplasma**, v. 249, p. 469-481, 2011.

KEBEISH, R.; NIESSEN, M.; THIRUVEEDHI, K.; BARI, R.; HIRSCH, H.J.; ROSENKRANZ, R.; STABLER, N.; SCHONFELD, B.; KREUZALER, F.; PETERHANSEL, C. Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 25, p. 593-599, 2007.

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

LI, Z.; WAKAO, S.; FISCHER, B. B.; NIYOGI, K. K. Sensing and Responding to Excess Light. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 60, p. 239-60, 2009.

LIU, X.; HUANG, B. Photosynthetic acclimation to high temperatures associated with heat tolerance in creeping bentgrass. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1947-1953, 2008.

LU, Y.; LI, Y.; YANG, Q.; ZHANG, Z.; CHEN, Y.; ZHANG, S.; PENG, X. X. Suppression of glycolate oxidase causes glyoxylate accumulation that inhibits photosynthesis through deactivating Rubisco in rice. **Physiologia Plantarum**, v. 150, p. 463-476, 2014.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environmental and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15-19, 2006.

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

MITTLER, R.; BLUMWALD, E. Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 61, p. 443-62, 2010.

MITTLER, R.; FINKA, A.; GOLOUBINOFF, P. How do plants feel the heat? **Trends Biochem Sci**, v. 37, p. 118-125, 2012.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A.; Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 58, p. 459-81, 2007.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 1068-1072, 1981.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; FOYER, C. H. Regulating the Redox Gatekeeper: Vacuolar Sequestration Puts Glutathione Disulfide in Its Place. **Plant Physiology**, v. 163, p. 665-671, 2013.

NÖLKE, G.; HOUDELET, M.; KREUZALER, F.; PETERHÄNSEL, C.; SCHILLBERG, S. The expression of a recombinant glycolate dehydrogenase polyprotein in potato (*Solanum tuberosum*) plastids strongly enhances photosynthesis and tuber yield. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 734-742, 2014.

OGREN, W. L. Photorespiration: pathways, regulation, and modification. **Annu Rev Plant Physiol**, v. 35, p. 415-422, 1984.

PARRY, M. A. J.; ANDRALOJC, P. J.; KHAN, S.; LEA, P. J.; KEYS, A. J. Rubisco Activity: Effects of Drought Stress. **Annals of Botany**, v. 89, p. 833-839, 2002.

PETERHANSEL, C.; MAURINO, V. G. Photorespiration Redesigned. **Plant Physiology**, v. 55, p. 49-55, 2011.

PETERHÄNSEL, C.; HORST, I.; NIESSEN, M.; BLUME, C.; KEBEISH, R.; KÜRKCÜOĞLU, S.; KREUZALER, F. 2010. Photorespiration. **The Arabidopsis Book 8, e 0130**.

QUEVAL, G.; JAILLARD, D.; ZECHMANN, B.; NOCTOR, G. Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, p. 21-32, 2011.

QUEVAL, G.; ISSAKIDIS-BOURGUET, E.; HOEBERICHTS, F. A.; VANDORPE, M.; GAKIERE, B.; VANACKER, H.; MIGINIAC-MASLOW, M.; BREUSEGEM, F. V.; NOCTOR, G. Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. **The Plant Journal**, v. 52, p. 640-657, 2007.

RAINES, C. A. Increasing Photosynthetic Carbon Assimilation in C₃ Plants to Improve Crop Yield: Current and Future Strategies. **Plant Physiology**, v. 155, p. 36-42, 2011.

RIVERO, R. M.; RUIZ, J. M.; ROMERO, L. Oxidative metabolism in tomato plants subjected to heat stress. **Hortic Sci Biotechnol**, v. 79, p. 560-564, 2004.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; MITTLER, R. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1143-115, 2002.

SALES, C. R. G.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, R. S.; FONTENELE, A. V.; MACHADO, E. C.; SILVEIRA, J. A. G.; RIBEIRO, R. V. Photosynthetic and antioxidant responses to drought during sugarcane ripening. **Photosynthetica**, v. 53, p. 547-554, 2015.

SGOBBA, A.; PARADISO, A.; DIPIERRO, S.; GARA, L.; PINTO, M. C. Changes in antioxidants are critical in determining cell responses to short- and long-term heat stress. **Physiologia Plantarum**, v. 153, p. 68-78, 2015.

SHARKEY, T. D.; BERNACCHI, C. J.; FARQUHAR, G. D.; SINGSAAS, E. L. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ leaves. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, p. 1035-1040, 2007.

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

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation e function of ascorbato peroxidase isoenzymes, **Jornal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1305-1319, 2002.

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

SOMERVILLE, C. R. An early Arabidopsis demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration. **Plant Physiol**, v. 125, p. 20-24, 2001.

SOMERVILLE, C. R.; OGREN, W. L. Genetic modification of photorespiration. **Trends Biochem Sci**, v. 7, p. 171-174, 1982.

SOUSA, R. H. V.; CARVALHO, F. E. L.; RIBEIRO, C. W.; PASSAIA, G.; CUNHA, J. R.; LIMA-MELO, Y.; MARGIS-PINHEIRO, M.; SILVEIRA, J. A. G. Peroxisomal APX knockdown triggers antioxidant mechanisms favourable for coping with high photorespiratory H₂O₂ induced by CAT deficiency in rice. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, p. 499-513, 2015.

STOTT, P. A.; STONE, D. A.; ALLEN, M. R. Human contribution to the European heatwave of 2003. **Nature**, v. 432, p. 610-614, 2004.

SUZUKI, N.; RIVERO, R. M.; SHULAEV, V.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, v. 203, p. 32-43, 2014.

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

TIAN, X.; LUO, H.; ZHOU, H.; WU, C. Research on heat stress of rice in China: progress and prospect. **Chin. Agric. Sci. Bull.**, v. 25, p. 166-168, 2009.

TIMM, S.; BAUWE, H. The variety of photorespiratory phenotypes-employing the current status for future research directions on photorespiration. **Plant Biology**, v. 15, p. 737-747, 2013.

TIMM, S.; FLORIAN, A.; FERNIE, A. R.; BAUWE, H. The regulatory interplay between photorespiration and photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 2923-2929, 2016.

UENO, O.; YOSHIMURA, Y.; SENTOKU, N. Variation in the Activity of Some Enzymes of Photorespiratory Metabolism in C4 Grasses. **Annals of Botany**, v. 96, p. 863-869, 2005.

VOSS; SUNIL, B.; SCHEIBE, R.; RAGHAVENDRA, A. S. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. **Plant Biology**, v. 15, p. 713-722, 2013.

VU, J. C. V.; NEWMAN, Y. C.; ALLEN, L. H. JR.; GALLO-MEAGHER, M.; ZHANG, M-Q. Photosynthetic acclimation of young sweet orange trees to elevated growth CO₂ and temperature. **J. Plant Physiol**, v. 159, p.147-157, 2002.

WAY, D. A.; OREN, R. Differential responses to changes in growth temperature between trees from different functional groups and biomes: a review and synthesis of data. **Tree Physiology**, v. 30, p. 669-688, 2010.

WANG, D.; LI, X. F.; ZHOU, Z. J.; FENG, X. P.; YANG, W. J.; JIANG, D. A. Two Rubisco activase isoforms may play different roles in photosynthetic heat acclimation in the rice plant. **Physiol Plantarum**, v. 139, p. 55-67, 2010.

WINGLER, A.; LEA, P. J.; QUICK, W. P.; LEEGOOD, R. C. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Phil.Trans. R. Soc. Lond.**,v. 355, p. 1517-1529, 2000.

XU, H.; ZHANG, J.; ZENG, J.; JIANG, L.; LIU, E.; PENG, C.; HE, Z.; PENG, X. Inducible antisense suppression of glycolate oxidase reveals its strong regulation over photosynthesis in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 1799-1809, 2009.

XU, J.; DUAN, X.; YANG, J.; BEECHING, J. R.; ZHANG, P. Enhanced Reactive Oxygen Species Scavenging by Overproduction of Superoxide Dismutase and Catalase Delays Postharvest Physiological Deterioration of Cassava Storage Roots. **Plant Physiology**, v. 161, p. 1517-1528, 2013.

YUAN, X. K.; YANG, Z. Q.; LI, Y. X.; LIU, Q.; HAN, W. Effects of different levels of water stress on leaf photosynthetic characteristics and antioxidant enzyme activities of greenhouse tomato. **Photosynthetica**, v. 54, p. 28-39, 2016.

YAMAGUCHI, K.; NISHIMURA, M. Reduction to below threshold levels of glycolate oxidase activities in transgenic tobacco enhances photoinhibition during irradiation. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, p. 1397-1406, 2000.

ZELITCH, I. Alternate pathways of glycolate synthesis in tobacco and maize leaves in relation to rates of photorespiration. **Plant Physiol.** v. 51, p. 299-305, 1973.

ZELITCH, I.; SCHULTES, N. P.; PETERSON, R. B.; BROWN, P.; BRUTNELL, T. P. High Glycolate Oxidase Activity Is Required for Survival of Maize in Normal Air. **Plant Physiology**, v. 149, p. 195-204, 2009.

ZHANG, Z.; XU, Y.; XIE, Z.; LI, X.; HE, Z. H.; PENG, X. Association-dissociation of glycolate oxidase with catalase in rice: a potential switch to modulate intracellular H₂O₂ levels. **Molecular Plant**, v. 9, p. 1-47, 2016.

ZHOU, Y.; LAM, H. M.; ZHANG, J. Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1207-1217, 2007.

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

CAPITULO-III

**FOTOSSÍNTESE E MUDANÇAS OXIDATIVAS EM PLANTAS DE ARROZ
COM REDUZIDA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO EXPOSTAS
AOS ESTRESSES ISOLADOS E COMBINADOS DE SECA E EXCESSO DE
LUZ**

1-INTRODUÇÃO

Os estresses abióticos são considerados fatores ambientais adversos que induzem distúrbios no metabolismo vegetal, causando redução no crescimento e no rendimento das culturas e espécies em geral (CRAMER et al., 2011). Fatores abióticos como o déficit hídrico e o excesso de luminosidade são de ocorrência natural nas regiões semiáridas e áridas do globo, onde atuam de formas isolada e/ou simultânea causando significativa restrição ao desempenho vegetal (SUZUKI et al., 2014). O estresse hídrico, causado pelo déficit de água nos solos e na atmosfera, representa a principal limitação ambiental para os cultivos com efeitos que podem ocorrer de forma temporal e/ou espacial, porém sempre resultando em severas perdas para a agricultura (CHAVES et al., 2009).

Uma das primeiras respostas de vegetais quando expostos ao estresse hídrico é o fechamento estomático devido ao declínio do turgor celular, causado pela diminuição de água no solo bem como pelo maior déficit de pressão de vapor na atmosfera, associados a sinais químicos gerados pela raiz (SALES et al., 2015; YUAN et al., 2016). Nessas condições, ocorre redução do suprimento de CO₂ para a carboxilação da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), afetando a eficiência de atividade de carboxilase da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e estimulando a atividade de oxigenase (VOSS et al., 2013). Essa restrição estomática que resulta da limitação para a condutância do CO₂ no mesófilo foliar afeta a fotossíntese, pelo menos em parte, por estimular a fotorrespiração (HODGES et al., 2016).

Associado à seca, as plantas estão constantemente expostas a elevada incidência de luminosidade sob condições de campo. A luz é um fator necessário para impulsionar a atividade fotoquímica, que tem como função gerar energia química (ATP e NADPH) para a redução de carbono (CO₂) no Ciclo de Calvin (NISHIYAMA e MURATA, 2014). Por outro lado, o excesso de luz além da capacidade normal de absorção pelas plantas pode resultar no processo de fotoinibição, causando diminuição fotossintética de forma dinâmica e/ou crônica (TAKASHI E MURATA, 2008; MURCHIE e NIYOGLI, 2011). Assim, esses estresses de seca e luz isolados afetam diferentemente a fotossíntese, além de apresentar interações antagônicas potencializando esses efeitos quando presentes simultaneamente (SUZUKI et al., 2014), podendo estimular a fotorrespiração (SOUSA et al., 2015).

A atividade de oxigenase da Rubisco devido à redução da relação CO_2/O_2 no mesófilo foliar estimula a produção de 2 fosfoglicolato (2-PGA), moléculas que não são metabolizadas no Ciclo de Calvin para a produção de trioses fosfato e consequente regeneração da RuBP (BAUWE et al., 2010; 2012). Assim, moléculas de 2-PGA produzidas pela Rubisco devem ser utilizadas na regeneração do 3-fosfoglicerato (3-PGA) no ciclo fotorrespiratório, uma via metabólica complexa que envolve cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias (BAUWE et al., 2010; TIMM et al., 2016). Nesse ciclo, duas moléculas de 2-PGA (4 carbonos) são transformadas em uma molécula de 3-PGA (3 carbonos) com custo energético elevado (12,5 ATPs por molécula de 2-PGA), enquanto um dos átomos de carbono (25%) é perdido na forma de CO_2 (PETERHÄNSEL et al., 2010).

A fotorrespiração tem início com a produção do 2-PGA pela Rubisco, seguido da desfosforilação desse composto por uma fosfatase que produz o glicolato ainda nos cloroplastos. O glicolato migra para os peroxissomos onde é oxidado pela ação da oxidase do glicolato (GO) à glioxilato e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em quantidades equimolares, o glioxilato segue o processo de reciclagem do 3-PGA enquanto o H_2O_2 pode acumular ou extravasar (BIENERT e CHAUMONT, 2014; ZHANG et al., 2016). Devido à perda de carbono (25%) e consumo de energia na reciclagem do 2-PGA, a via fotorrespiratória é considerada uma via metabólica que compromete a eficiência fotossintética (TIMM et al., 2016). Por esse motivo, tem sido amplamente estudada visando com sua manipulação melhorar a assimilação de carbono em plantas (BETTI et al., 2016).

Como modelo teórico, a redução da atividade da GO poderia reduzir o fluxo fotorrespiratório devido ao seu papel na catalise da terceira reação desse processo celular. Na literatura estudos relatam relação da menor atividade da GO com reduções nos conteúdos de glioxilato e H_2O_2 , produtos diretos da sua atividade, indicando claramente que a GO pode exercer papel regulatório da via fotorrespiratória (SOUSA et al., 2015). No entanto, estudos por nocaute gênico já revelaram resultados controversos, indicando que a menor expressão e atividade GO podem restringir a fotossíntese em espécie C3, como o arroz (XU et al., 2009) e espécies C4, como o milho (ZELITCH et al., 2009). Apesar de controversos, esses estudos vêm mostrando a existência de mecanismos regulatórios exercidos pela fotorrespiração na fotossíntese, que estão além do seu efeito sobre a restrição fotossintética quando aumenta de atividade.

Além de restringir a eficiência da fotossíntese a fotorrespiração é considerada a principal via produtora de H_2O_2 na célula vegetal, representando uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequente danos oxidativos em tecidos fotossintéticos (FOYER e NOCTOR, 2003; ZHANG et al., 2016). A fonte dessas EROs na fotorrespiração está associada com a elevada atividade da GO durante a conversão do glicolato a glioxilato, quando produz elevadas quantidades de H_2O_2 (BAUWE et al., 2010). O H_2O_2 produzido pela fotorrespiração pode extravasar do peroxissomos para outros sítios celulares, onde poderá atuar como molécula sinalizadora (baixas concentrações) bem como gerar danos oxidativos quando em concentrações elevadas (MITTLER, 2002). Por outro lado, a fotorrespiração pode atuar como um dreno para o excesso de energia (ATP e NADPH) gerado sob condições limitantes para a fixação de carbono com continuada captação de energia luminosa pelos fotossistemas, causando desequilíbrio entre as fases fotoquímica e redução do carbono (FOYER et al., 2009; VOSS et al., 2013).

A limitação da assimilação de carbono associada ao excesso de luminosidade intensifica a produção excessiva de EROs em cloroplastos e peroxissomos, causando danos oxidativos em membranas, proteínas e ácidos nucléicos (MOLLER et al., 2007). Nessas condições, a ação de mecanismos antioxidantes é necessária para manter a homeostase celular. A célula vegetal possui um eficiente sistema de proteção composto por antioxidante enzimáticos e não enzimáticos, capaz de remover o excesso de EROs gerado sob determinados distúrbios metabólicos (DEMIDCHIK, 2015). O ascorbato (ASC) e a glutatona (GSH) são antioxidantes não enzimáticos, compostos hidrofílicos que atuam como poder redutor no ciclo ascorbato-glutatona, a principal via responsável pela eliminação do excesso de EROs na célula (FOYER e SHIGEOKA, 2011; GEST et al., 2013).

O sistema enzimático é composto por enzimas oxidativas presentes em diversos compartimentos celulares, tais como as dismutases do superóxido (SOD) e as catalases (CAT), além daquelas do ciclo ascorbato-glutatona, peroxidases de ascorbato (APX), redutases da glutatona (GR), redutases do monodeidroascorbato (MDHAR) e redutases do deidroascorbato (DHAR) (FOYER et al., 2009). A catalase é uma enzima que possui elevada capacidade de remoção de H_2O_2 gerado pela ação da GO nos peroxissomos, por possuir um valor de K_m relativamente elevado para o H_2O_2 se comparada às demais peroxidases (ZHANG et al., 2016). Em conjunto, essas enzimas atuam em sincronia com os antioxidantes não enzimáticos na modulação da concentração das EROs geradas

na célula, evitando o acúmulo e consequente danos oxidativos (FOYER e SHIGEOKA, 2011).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o papel da enzima oxidase do glicolato (GO), na geração de danos oxidativos bem como na modulação da fotossíntese em plantas de arroz expostas a estresses isolados e combinados de seca e luminosidade elevada. As plantas foram submetidas à inibição parcial da atividade da GO pela aplicação do α -hidroxissulfonato (HPMS), um inibidor para essa enzima, e em seguida expostas as diferentes condições de estresses de seca e luz. Essa estratégia permitiu identificar distúrbios associados com a fotorrespiração, a fotossíntese e danos oxidativos que podem ser ativados pelo papel da GO naquelas condições ambientais.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-MATERIAL VEGETAL E APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS

As sementes de arroz (*Oryza sativa*), cv Nippombare, foram desinfetadas em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por 5 min, lavadas com água destilada e germinadas em mistura de areia com vermiculita (v/v) em vasos de 2 litros, sob condições naturais de casa de vegetação localizada na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada (Figura 1). Durante a germinação o substrato foi mantido úmido com água destilada e após a germinação (8 dias) as plântulas foram irrigadas diariamente com solução nutritiva (HOAGLAND e ARNON, 1950) diluída $\frac{1}{4}$ durante 30 dias. Em seguida, passaram a receber a mesma solução nutritiva diluída $\frac{1}{2}$ a cada três dias (sendo irrigadas com água destiladas no intervalo dos três dias) por mais um mês.



Figura 1. Plantas de arroz crescendo em condições naturais de casa de vegetação aos 60 dias após o plantio das sementes.

Para aplicar os tratamentos isolados e combinados de seca e luz elevada, as plantas (60 dias após plantio) foram acondicionadas em câmara de crescimento (Câmara Climática SGC 120, Modelo FT-612000, Marca FITOTRON) em condições controladas de luminosidade ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), umidade relativa (60%), temperatura ($27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas (12h/12h). Nessas condições, as plantas foram divididas em dois grupos, onde um permaneceu sendo irrigado e o outro foi submetido a suspensão da rega. Dois dias após a transferência para a câmara, as plantas foram submetidas aos tratamentos isolados e combinados de seca e excesso de luz na ausência e presença de inibição da enzima GO, como descrito a seguir: controle (irrigado+ $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); luz elevada (irrigado+ $1000 \mu\text{mol. m}^{-2}\text{s}^{-1}$); redução de atividade da GO (irrigado + HPMS + $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); luz elevada + redução atividade da GO (irrigado + HPMS + $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); seca (suspensão da rega + $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); seca + luz elevada (suspensão da rega + $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); seca + redução da GO (suspensão + HPMS + $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); seca + luz elevada + redução de GO (suspensão + HPMS + $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), durante três dias consecutivos. Para o tratamento de inibição da GO, o inibidor α -hidroxissulfonato (25 mM) diluído em tampão HEPES 10 mM pH 6,0, contendo Triton (0,10%), foi aplicado via aspersão nas folhas das plantas todos os dias às 07:00 horas, durante os três últimos dias. Essa concentração do HPMS foi utilizada com base no ensaio de inibição para a GO em segmentos de folhas, como descrito e apresentado no capítulo II.

2.2-AVALIAÇÕES REALIZADAS

2.2.1-Conteúdo relativo de água (CRA)

O conteúdo relativo de água foi determinado conforme Fidalgo et al., (2004). Ao final do experimento foram coletados 30 segmentos foliares (10 mm) e a massa fresca (MF) determinada imediatamente. Em seguida, os segmentos foram imersos em 30 ml de água deionizada por 8 horas em placas de *petri* e após breve secagem dos segmentos em papel toalha, para remover o excesso de umidade, foi determinada a massa túrgida (MT). A massa seca (MS) foi determinada após secagem dos discos a 70°C , durante 48 h em estufa, e o CRA foi estimado pela seguinte relação descrita na equação abaixo (1):

$$\text{CRA} = \frac{(\text{MF} - \text{MS})}{(\text{MT} - \text{MS})} \times 100 \quad (1)$$

2.2.2-Dano de membrana pelo extravasamento de eletrólito

O dano de membrana foi determinado com base no vazamento de eletrólitos, como descrito por Shanahan et al., (1990). Ao final do ensaio foram coletados vinte discos foliares (10 mm de diâmetro) que foram imersos em 10 ml de água deionizada em tubos fechados e incubados a 40 °C durante 30 min e determinada a condutividade elétrica da solução (C1). Em seguida, os tubos foram incubados a 100 °C por 1 h e, após atingir a temperatura ambiente, foi determinada a condutividade elétrica da solução (C2). O dano de membrana (DM) foi estimado pela relação descritas na equação (2) abaixo:

$$DM = (C1/C2) \times 100 \quad (2)$$

Essa medida foi utilizada como um indicador do extravasamento o conteúdo citoplasmático através da membrana plasmática, marcador diretamente relacionado com a viabilidade celular.

2.2.3-Conteúdo de clorofilas

Uma folha de cada planta foi coletada e imediatamente colocada em sacos plásticos devidamente identificados, refrigerados em recipiente com gelo e em seguida armazenadas em um Freezer a -80 °C no Laboratório de Produção Vegetal da Unidade Acadêmica de Serra Talhada. Para determinar o teor de clorofila foi utilizado a metodologia de Chagas, et al. (2008), com modificações. Para isto, foi obtido 100 mg de cada folha e a clorofila foi extraída através da maceração em almofariz, adicionando-se 5 ml de acetona (80% v/v). O sobrenadante foi colocado em tubos de ensaios de 15 ml, filtrado e realizadas leituras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 645, 652 e 663 nm (ARNON, 1949). As concentrações de clorofilas foram estimadas pelas seguintes equações (3, 4 e 5):

$$\text{Clorofila } a = [(12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}) / (1000 \times W)] \times V \quad (3)$$

$$\text{Clorofila } b = [(22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}) / (1000 \times W)] \times V \quad (4)$$

$$\text{Clorofilas totais} = [(A_{652} \times 1000) / (34,5)] \times (V / 1000 \times W) \quad (5)$$

Onde: A = absorvância; V = volume final do extrato (5 ml); W = peso em gramas. Os conteúdos de clorofilas foram expressos em mg. g⁻¹MF.

2.3-DETERMINAÇÕES PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

2.3.1-Extração de proteínas

A extração de proteína foi realizada conforme Zimmermam et al., (2006), com modificações. Amostra de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido seguido da extração em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 contendo EDTA 1 mM. Para a extração das enzimas peroxidase de ascorbato foi adicionado ascorbato 1 mM ao tampão. Após a extração, o extrato foi centrifugado a 14.000 x g em temperatura de 4 °C durante 30 min. O conteúdo de proteínas solúveis foi determinado conforme Bradford (1976) e estimado com base em curva padrão, utilizando BSA.

2.3.2- Atividades das enzimas

A atividade da Oxidase do glicolato (GO: EC; 1.1.3.15) foi determinada conforme o princípio de reação do método descrito por Baker e Tolbert (1966). Esse método se baseia na produção do complexo glioxilato-fenilhidrazona, produzido a partir da conversão do glicolato para glioxilato pela GO no meio. Alíquotas de 100 µL do extrato foram adicionadas a 2,9 mL de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 8,3, adicionado de cisteína 4 mM, Glicolato 7 mM, Fenilhidrazina-HCl 4 mM e FMN 0,033 mM. O incremento da produção do complexo (glioxilato-fenilhidrazona), referente à atividade da enzima, será medido a 324 nm em espectrofotômetro após 5 min de reação. A atividade da GO foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 17 mM⁻¹ e expressa em µmol de glicolato g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da catalase (CAT; EC: 1.11.1.6) foi determinada conforme Havir e McHale, (1987). Alíquotas de 0,05 ml de extrato protéico foram adicionados a 2,95 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 30 °C e acompanhado o decaimento da absorbância a 204 nm em espectrofotômetro durante 300 segundos, com leituras sucessivas a cada 30 seg. A atividade da enzima foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de 36M⁻¹ cm⁻¹, a 240 nm, para o H₂O₂ e expressa em µmol H₂O₂ g⁻¹ MF min⁻¹ ou de forma específica, µmol H₂O₂ mg⁻¹ prot. min⁻¹.

A atividade da dismutase de superóxido (SOD; EC: 1.15.1.1) foi determinada conforme metodologia descrita por Gianopolitis e Ries (1977). Alíquotas de 0,1 ml serão transferidas para tubos ensaio protegidos da luz, contendo tampão fosfato de

potássio 50 mM, pH 7,8, contendo 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 75 μM de NBT. A reação foi iniciada pela adição de 2 mM de riboflavina e rápida transferência dos tubos, sem a proteção da luz, para câmara iluminada por lâmpada fluorescentes de 30 wats ($30 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), durante 6 minutos. A reação foi interrompida pelo desligamento da luz, os tubos foram revestidos por filme escuro para proteção da luz e realizadas leituras a 540 nm. A atividade da enzima foi estimada com base na inibição da redução do NBT e uma unidade de atividade foi considerada como a quantidade da enzima necessária para inibir 50% da sua redução (Beauchamp e Fridovich, 1971) e expressa em U. A. $\text{g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$ ou de forma específica, U. A. $\text{mg}^{-1} \text{prot. min}^{-1}$.

A atividade da peroxidase de ascorbato (APX; EC: 1.11.1.1) foi determinada conforme método descrito por Nakano e Asada (1981). Alíquotas de 0,1 ml de extrato protéico foram adicionadas ao meio de reação composto de 2,7 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0), contendo 0,5 mM de ácido ascórbico P.A. A reação foi iniciada pela adição de H_2O_2 30 mM ao meio de reação e acompanhada pelo decaimento da absorbância em 290 nm em espectrofotômetro durante 300 segundos, com leituras sucessivas em intervalos de 30 segundos. A atividade da APX foi estimada utilizando o coeficiente e de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o ascorbato, em 290 nm, e expressa como $\mu\text{mol ASA g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$ ou de forma específica, $\mu\text{mol ASA g}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot. min}^{-1}$.

2.4-MEDIDAS DE FOTOSSÍNTESE

2.4.1-Trocas gasosas e curvas de resposta ao CO_2

As medidas de trocas gasosas e as curvas de respostas ao CO_2 foram realizadas com um analisador portátil de fotossíntese (IRGA, modelo L1-6400XT, Fabricante LICOR, EUA). As medidas da assimilação líquida de CO_2 (P_N), taxa de transpiração (E), condutância estomática (g_s) e pressão parcial de CO_2 intercelular (C_i) foram realizadas em folhas saudáveis completamente expandidas sob luz de $1000 \mu\text{mol. m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 28°C , mantidas na câmara de leitura do IRGA. Com as medidas de trocas gasosas, foi estimada a eficiência de carboxilação instantânea, pela razão da fotossíntese com a concentração intercelular de CO_2 (P_N/C_i) e também a eficiência no uso de água pela razão da fotossíntese com a transpiração (P_N/E).

Para realização das curvas de resposta da fotossíntese líquida (P_N) ao aumento do CO_2 , as medidas de P_N foram acompanhadas na câmara de medida em reposta ao

incremento da pressão do CO₂ no interior da câmara (400, 300, 200, 100, 50, 400, 600, 800, 1000, 1200 e 1600 ppm). A partir das curvas, foram calculados a eficiência de carboxilação máxima da Rubisco (V_{cmax}), a taxa de regeneração da RuBP (J_{max}) e a respiração na presença da luz (R_d). Durante as curvas de respostas ao Ci a intensidade da luz da medida no IRGA foi de 1000 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (SHARKEY et al., 2007).

2.4.2-Fluorescência da clorofila

As medidas da fluorescência da clorofila *a* foram feitas em folhas sadias completamente expandidas através do método do pulso de saturação utilizando um fluorômetro modulado (Modelo MINI-PAM-II, fabricante Heinz Walz GmbH). A partir das leituras, foram calculados a eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) (6), e os seguintes parâmetros: eficiência quântica efetiva do fotossistema II ($\Phi_{efetiva}FSII$) (7), taxa de transporte de elétrons (ETR)(8) e os coeficientes de quenching fotoquímico (qP) (9) e não fotoquímico (NPQ) (10).

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m \quad (6)$$

$$\Phi_{efetiva}FSII = [(F_m' - F_s)/F_m'] \quad (7)$$

$$ETR = \Phi_{efetiva}FSII * DFFF * 0.5 * 0.84 \quad (8)$$

$$qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o') \quad (9)$$

$$NPQ = [(F_m - F_m')/F_m'] \quad (10)$$

As variáveis F_m , F_o e F_v representam, respectivamente, a fluorescência máxima, mínima e variável após adaptação das folhas a 30min de escuro; F_m' , F_o' e F_s representam, respectivamente, a fluorescência máxima, mínima e no estado de equilíbrio dinâmico na presença de luz e DFFF equivale à densidade de fluxo de fótons fotossintéticos. As medidas realizadas na presença de luz foram feitas em folhas adaptadas às condições de irradiância prevalentes na câmara de crescimento, após exposição por 10s a um feixe de luz de 270 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecido pela própria fibra óptica do aparelho.

2.4.3-Estimativa da fotorrespiração

A taxa de fotorrespiração (Pr), indicada pela liberação de CO₂, foi estimada a partir das medidas de trocas gasosas (P_N e Rd) e de parâmetros derivados da ETR da fluorescência da clorofila, conforme o método descrito por Bagard et al., (2008). O parâmetro Rd corresponde à respiração na luz. Por essa metodologia, a fotorrespiração é obtida pela relação abaixo descritas na equação (11):

$$Pr = 1/12[ETR-4 (P_N + Rd)] \quad (11)$$

2.5-INDICADORES DE DANOS OXIDATIVOS

2.5.1-Conteúdo de H₂O₂

O conteúdo de H₂O₂ foi determinado conforme método descrito por Cheeseman (2006). Neste ensaio, o peróxido de hidrogênio reage com Fe⁺² a pH baixo, na presença do corante alaranjado de xilenol (XO) para a formação de Fe⁺³. A concentração de Fe⁺³ gerada foi calculada pelo aumento da absorbância, ocasionado pela formação do complexo Fe-XO. Para isso, 500 mg de tecido fresco de folhas foram macerados na presença de nitrogênio líquido. Após a obtenção de farinha homogênea, 1,5 ml de tampão borato-bórax 50 mM pH 8,4, foram adicionados, seguido de maceração por mais 3 minutos. As amostras então foram centrifugadas a 13.000 x g por 20 minutos, a 4 °C. Ao término, o sobrenadante foi coletado (H₂O₂ total) e o precipitado, descartado. Em seguida, alíquotas de 100 µl das amostras (diluídas, caso necessário) foram transferidas para tubos de ensaio e adicionado 900 µl de reagente contendo 0,25 mM de FeSO₄, 0,25 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,25 mM de H₂SO₄, 124 µM de alaranjado de xilenol e 99 mM de sorbitol. A mistura de reação foi incubada por 30 minutos, a 25 °C, e posteriormente, foram realizadas as leituras de absorbância, no comprimento de onda de 560 nm. As concentrações de H₂O₂ foram obtidas a partir de curva padrão e os dados foram expressos em µmol g⁻¹ MS.

2.5.2-Peroxidação de lipídios (TBARS)

A peroxidação de lipídios foi estimada pelo conteúdo de substancia reativas ao acido tiobarbitúrico (TBARS) conforme Heath e Packer (1968). 0,1 g de folhas frescas foram macerados em almofariz na presença de N₂ liquido seguido da adição de ácido tricloroacético (TCA) 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a

12.000 x g durante 15 min em temperatura de 4 °C. Em seguida 0,5 ml do sobrenadante foi adicionado a 2,0 ml da solução TCA 20% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) e aquecida em banho maria a 95 °C em tubos hermeticamente fechados durante 1 hora. Em seguida a reação foi interrompida em banho de gelo, e foram realizadas leituras a 532 e 660 nm. O conteúdo de TBARS foi estimado utilizando o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ após a subtração da absorbância obtida a 660 nm daquela a 532 nm.

2.6-METABÓLITOS FOTORRESPIRATÓRIOS

2.6.1-Conteúdo de glioxilato

O conteúdo do ácido glioxilato baseado em metodologias desenvolvidas por Baker e Tolbert, 1966, a partir extrações por macerações de 100 mg MF em 1ml de HCL a 100 mM. Os extratos foram centrifugados a 12000 rpm/10 mim/8°C e o sobrenadante foi recolhido. Alíquotas de 200 µl do extrato foram acrescidas de 300 µl de fenilhidrazina em 1% HCL a 100 mM e colocadas a banho maria em 95°C por 2 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo e as leituras realizadas a 324 nm. O conteúdo de glioxilato foi calculado utilizando o coeficiente de extinção milimolar 17 mM⁻¹ e expresso em µmol. g⁻¹ MF.

2.6.2-Conteúdos de glicina e serina

O conteúdo dos aminoácidos glicina e serina foram determinados com uso de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Para a extração, foi usado uma solução composta por uma mistura de clorofórmio, metanol e água (M/C/W). Para tal, 400 mg de massa fresca de folhas foram pesados com uso de balança analítica e macerados com 1 ml da solução(M/C/W) na presença de nitrogênio líquido (N₂). O extrato foi centrifugado a 4000 g á 4°C por 10 minutos e em seguida foi feita a coleta da fase superior. Na fase inferior da mesma amostra, foi adicionada mais 1 ml da solução (M/C/W) e de igual modo a fase superior, o extrato foi centrifugado 4000 g a 4°C por 10 minutos. Depois da centrifugação, os extratos da fase superior e inferior referente a cada amostra juntos (cerca de 1500 µl) passaram por uma evaporação (capela) em unidade de aquecimento (banho seco/Unisciense) a 40°C durante 24 h.

2.7-CONTEÚDOS DE ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS

2.7.1-Conteúdos de glutatona reduzida (GSH)

Os conteúdos de glutatona das formas reduzida foram determinados conforme Griffith (1980). Amostras de folhas frescas (0,1g) foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 5% e maceração por mais 3min. O extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 15 min em temperatura de 4°C e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para reação. Para determinação da GSH 0,2ml do sobrenadante foi adicionado em tubos de ensaio seguido da adição de 2,6 ml de tampão fosfato de sódio 150 mM pH 7,4, 1 ml de tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 e 0,2ml de DTNB 30mM, em tampão fosfato 100mM pH 7,0. Em seguida os tubos foram acondicionados em banho maria a 30°C durante 10 min. Após a reação foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 412 nm e os conteúdos de glutatona foram estimados com base em curva padrão a partir de GSS p. a.

2.7.2-Conteúdos de ascorbato reduzido (ASA)

Os conteúdos de ascorbato reduzido foram determinados conforme Kampfenkel et al., (1995). Amostras de folhas frescas (0,1g) foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 15 min em temperatura de 4 °C e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para reação. Para o conteúdo de ascorbato reduzido, alíquotas de 0,1 ml do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,3 ml de tampão fosfato de potássio 200 mM pH 7,4, 0,1 ml de água destilada, 0,5 ml de TCA 10%, 0,4 ml de H₂PO₄45%, 0,4 ml de biperidil 4% e 0,2 ml de FeCl₃. Após a mistura da reação os tubos foram acondicionados em banho maria a 40 °C durante 30 min. Em seguida, foram realizadas leituras a 525 nm e o conteúdo de ascorbato foram estimados com base em curva padrão utilizando L-ascorbato p. a.

2.8-WESTERN BLOTING PARA RUBISCO

As mudanças no conteúdo da Rubisco foram avaliadas por imunoblot utilizando anticorpo específico contra a subunidade maior da Rubisco. Após a separação das proteínas por eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE) 12,5%, foi realizada uma

eletrotransferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose em sistema molhado. Em seguida, foi realizada a detecção das Subunidades maiores da Rubisco (SMR) por western blotting utilizando um anticorpo específico (R4404, Sigma), e na revelação foi empregado um anticorpo secundário IgG (A 9046, Sigma) conjugado com peroxidase alcalina, conforme LEE et al., (2007). As imagens correspondentes as bandas reveladas foram escaneadas utilizando programa específico e apresentadas na forma de gráficos como valores relativos.

2.9-DELINEAMENTO ESTATÍSTICO E ANÁLISE DOS DADOS

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com tratamentos em arranjo fatorial 2 x 2 x 2, dois níveis de umidade (irrigado e seca), dois níveis do inibidor (0 e 25 mM) e duas intensidade de luz (300 e 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com 4 repetições por tratamento, com cada repetição representada por um vaso com duas plantas. Os dados das variáveis foram submetidos ao teste F a 0,05 de significância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey em mesmo nível.

3-RESULTADOS

3.1-STATUS HÍDRICO E DANO CELULAR EM PLANTAS DE ARROZ SOB ESTRESSE HÍDRICO ASSOCIADO À EXCESSO DE LUZ COM REDUZIDA DA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO

No presente estudo, as respostas fisiológicas e bioquímicas expressas nas plantas de arroz irrigadas e expostas por três dias à baixa luminosidade (300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) serão consideradas como referência (plantas controle) da homeostase metabólica em relação às demais plantas, expostas aos efeitos isolados e combinados da seca e luz alta (1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na ausência e presença da inibição parcial de atividade da GO. As plantas irrigadas não apresentaram mudanças no conteúdo relativo de água (CRA) quando mantidas em baixa luminosidade, na ausência e presença da inibição da GO (Figura 2A; para inibição da GO ver Figura 7A). Por outro lado, nas plantas pré-expostas a seca e mantidas em baixa luz ocorreu redução de 30% e 15% do CRA na ausência e presença do HPMS, respectivamente, em relação à referência.

Resultados similares foram observados para as mudanças do CRA nas plantas submetidas ao tratamento com luminosidade elevada, com o estresse hídrico causando redução do teor de água da folha e o tratamento com HPMS atenuando esse efeito da

seca. Assim, os dados mostram que a presença do HPMS resultou numa melhor manutenção do teor de água nas folhas. As plantas irrigadas não apresentaram aumento no dano de membrana (DM) em baixa luminosidade, com base no vazamento de eletrólitos, se comparadas as plantas referência (Figura 2B). Nas plantas pré-exposta a seca mantidas em baixa luminosidade foi observado um aumento de 10% no DM na ausência do HPMS, enquanto na presença do inibidor não foi afetado em relação às plantas referência.

Sob condições de alta luminosidade as plantas irrigadas apresentaram aumento médio de 15% do vazamento de eletrólitos celulares (DM), na ausência e presença do inibidor da GO, se comparadas às plantas referência (Figura 2B). Nas plantas pré-expostas a seca ocorreu um aumento de 30% do DM em alta luminosidade na ausência do inibidor da GO, indicando efeito interativo da seca com alta luminosidade para o aumento de danos celulares. Por outro lado, na presença do inibidor foi observada uma redução de 18% do DM nas plantas expostas as mesmas condições.

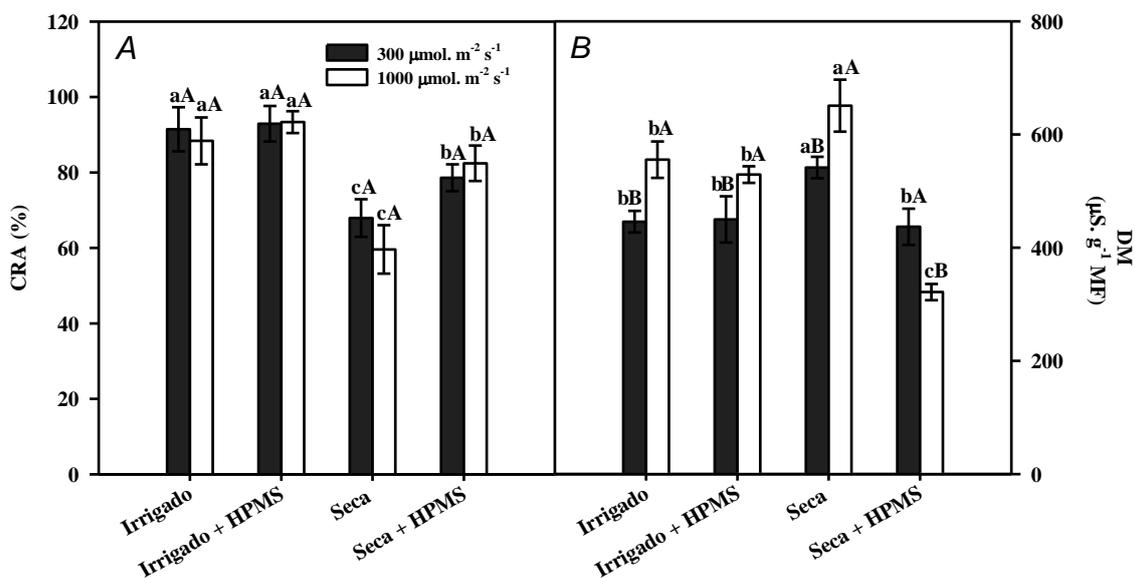


Figura 2. Mudanças no conteúdo relativo de água (A) e dano de membrana (B) em folhas de plantas de arroz expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e excesso de luz, quando submetidas à inibição parcial de atividade da enzima oxidase do glicolato após o tratamento com inibidor específico para essa enzima α -hidroxissulfonato (HPMS). Os valores representam médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

Os conteúdos de clorofilas foram alterados em resposta aos estresses isolados de seca e excesso de luz e foram intensificados na combinação dos estresses (Figura 3). Essa resposta ocorreu independente da redução da atividade da glicolato oxidase. Não foram observadas mudanças nos conteúdos de clorofilas totais nas plantas irrigadas sob baixa luz ($300 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Por outro lado, nas plantas submetidas ao estresse hídrico ocorreu uma redução no conteúdo de clorofilas totais de 16% em relação à referência. Adicionalmente, nas plantas irrigadas e expostas a alta luminosidade ($1000 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram observados uma redução de 19% nos conteúdos de clorofilas totais e essa redução foi intensificada na combinação com a seca em cerca de 35% em relação a referência (Figura 3A).

Os conteúdos de clorofila *a* tiveram uma maior instabilidade no presente estudo. Reduziu 10% em resposta ao estresse hídrico e cerca de 18% sob alta luminosidade ($1000 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$), não sendo alterada na combinação dos estresses (Figura 3B). Por outro lado, os conteúdos de clorofila *b* foram fortemente alterados quando as plantas foram expostas aos estresses isolados de seca e luz elevada em cerca de 28% e 25%. Essas reduções nos conteúdos de clorofilas *b* foram claramente intensificadas na combinação dos estresses (seca + excesso de luz) chegando à percentual de reduções médios de 56 % em relação à referência. Esses resultados, semelhante ao estudo de seca associado com calor, indica uma estabilidade da clorofila *a* em arroz em detrimento a clorofila *b*, motivo levou a um expressivo aumento na relação *a/b* (Figura 3D). Além disso, a redução no conteúdo de clorofilas totais foi também associada a reduções do teor de clorofila *b*.

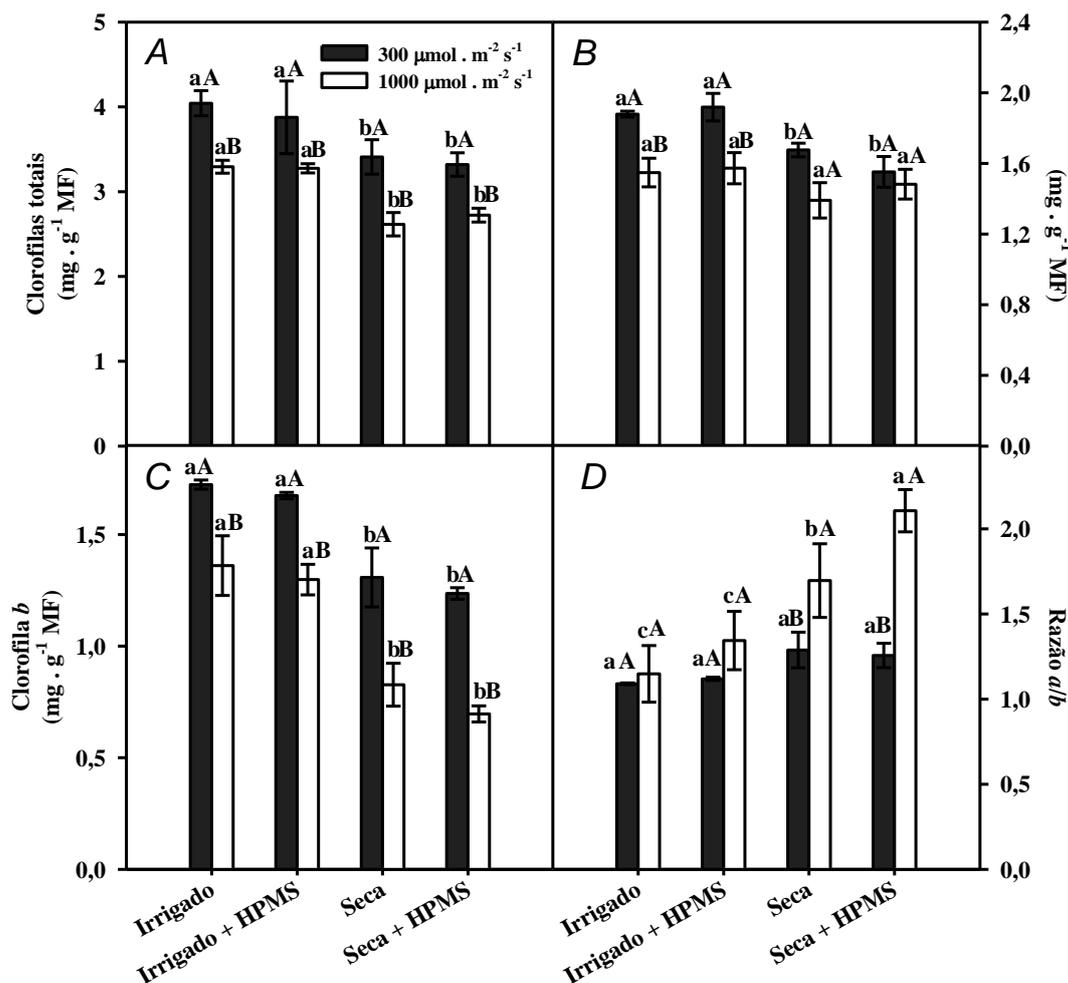


Figura 3. Mudanças nos conteúdos de clorofilas totais (A), clorofilas *a* (B) e clorofilas *b* (C) e relação clorofilas *a/b* (D) em folhas de plantas de arroz submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e excesso de luz, submetidas ao tratamento com inibidor para a enzima oxidase do glicolato (α -hidroxissulfonato-HPMS). Os valores representam médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

3.2-REDUÇÃO DE ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO ESTÁ ASSOCIADA À MAIOR FOTOSÍNTESE EM RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO ASSOCIADO À EXCESSO DE LUZ EM PLANTAS DE ARROZ

Nas plantas irrigadas e mantidas em baixa luz a inibição da GO não afetou a fotossíntese líquida (Figura 4A). As plantas submetidas ao estresse hídrico apresentaram reduções médias de 60% da P_N , tanto na ausência quanto na presença de inibição da GO, comparado com as plantas referência. A luminosidade elevada ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) não afetou a P_N nas plantas irrigadas na ausência de inibição da GO, enquanto nas

plantas com inibição parcial dessa enzima causou redução de 25% na P_N , comparado às plantas referência.

Nas plantas pré-expostas ao estresse hídrico ocorreu uma redução de 63% na P_N em repostas a luz elevada, enquanto nas plantas apresentando inibição parcial da GO essa redução foi de apenas 45%, se comparadas às plantas referência. Esse resultado mostra que sob condições irrigadas a redução da P_N deve estar associada a uma aparente fotoinibição, enquanto naquelas submetidas à seca a menor P_N observada pode estar também atribuída a restrições estomáticas. Os dados mostram ainda, que a redução da atividade da GO resultou em uma maior P_N (cerca de 80%) nas plantas sob seca apenas quando submetidas à luz elevada, sugerindo que a menor atividade da GO estimulou a fixação de carbono nessas condições quando comparadas ao mesmo tratamento na ausência do HPMS (Figura 4A).

Um padrão de respostas similar ao observado para a P_N , nas plantas submetidas aos diferentes estresses avaliados, foi também observado para a condutância estomática (g_s) e para a taxa de transpiração (E), se comparado às plantas referência (Figuras 4B e 4D). Por outro lado, nas plantas bem irrigadas quando submetidas à luz elevada não ocorreu fechamento estomático, com base nas medidas de condutância e transpiração, a despeito da menor fotossíntese líquida (redução de 25%) nessas condições (Figura 4A). Esses dados demonstram que a redução da P_N nas plantas de arroz nessas condições (irrigadas + luz elevada) deve ser atribuída principalmente a limitação fotoquímica, considerando que aparentemente não ocorreu restrição de natureza estomática.

A pressão intercelular de CO_2 (C_i) nas plantas irrigadas mantidas na luz baixa não foi afetada pela inibição da GO, porém foi reduzida em cerca de 17% nas plantas pré-expostas a seca, comparado as plantas referência, uma resposta independente da atividade da GO (Figura 4C). De forma similar, nas plantas irrigadas a alta luz não influenciou na C_i , porém foi levemente menor nas plantas submetidas seca, se comparadas às referências.

A eficiência de carboxilação instantânea nas plantas de arroz, com base na relação P_N/C_i , não foi afetada pela menor atividade da GO nas plantas irrigadas a baixa luz (Figura 4E). Por outro lado, essa relação foi cerca de 55 % menor nas plantas pré-expostas a seca, independente da atividade da GO. A exposição das plantas a luz elevada não afetou a eficiência de carboxilação quando irrigadas na ausência do inibidor da GO, enquanto que naquelas com reduzida atividade da GO foi observada uma redução de 25%, em relação às plantas referência. Essa redução da P_N nas plantas

expostas a luz elevada foi ainda maior quando submetidas ao estresse hídrico, cerca de 50% se comparado as plantas mantidas sob as condições de referência (Figura 4E).

As mudanças induzidas pelos estresses de seca e luminosidade elevada na P_N e E resultaram em alterações significativas da eficiência de uso da água (EUA), estimada pela relação P_N/E (Figura 4F). Nas plantas irrigadas a $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a redução de atividade da GO não influenciou essa relação, enquanto que naquelas plantas sob seca a eficiência de uso de água foi ligeiramente maior (cerca de 15%), independente da atividade da GO, se comparado as plantas referência. Esse melhor uso da água em relação à fixação de carbono, nas plantas sob seca, deve ser atribuído a um eficiente controle estomático, o que permitiu uma manutenção relativa da P_N sob restrição da disponibilidade de água.

Nas plantas irrigadas expostas a luz elevada ocorreu uma redução de 25% da EUA, comparado as plantas referência, uma resposta atribuída principalmente a menor P_N nessas condições, uma vez que não ocorreu fechamento estomático. Nas plantas pré-submetidas a seca a luz elevada não afetou a EUA na ausência de inibição da GO, enquanto naquelas expostas a luz alta tratadas com HPMS ocorreu um sensível aumento (20%) em relação as plantas referência. Esse resultado mostra que a menor atividade da GO está relacionada ao melhor uso da água para a assimilação de carbono nas plantas sob seca.

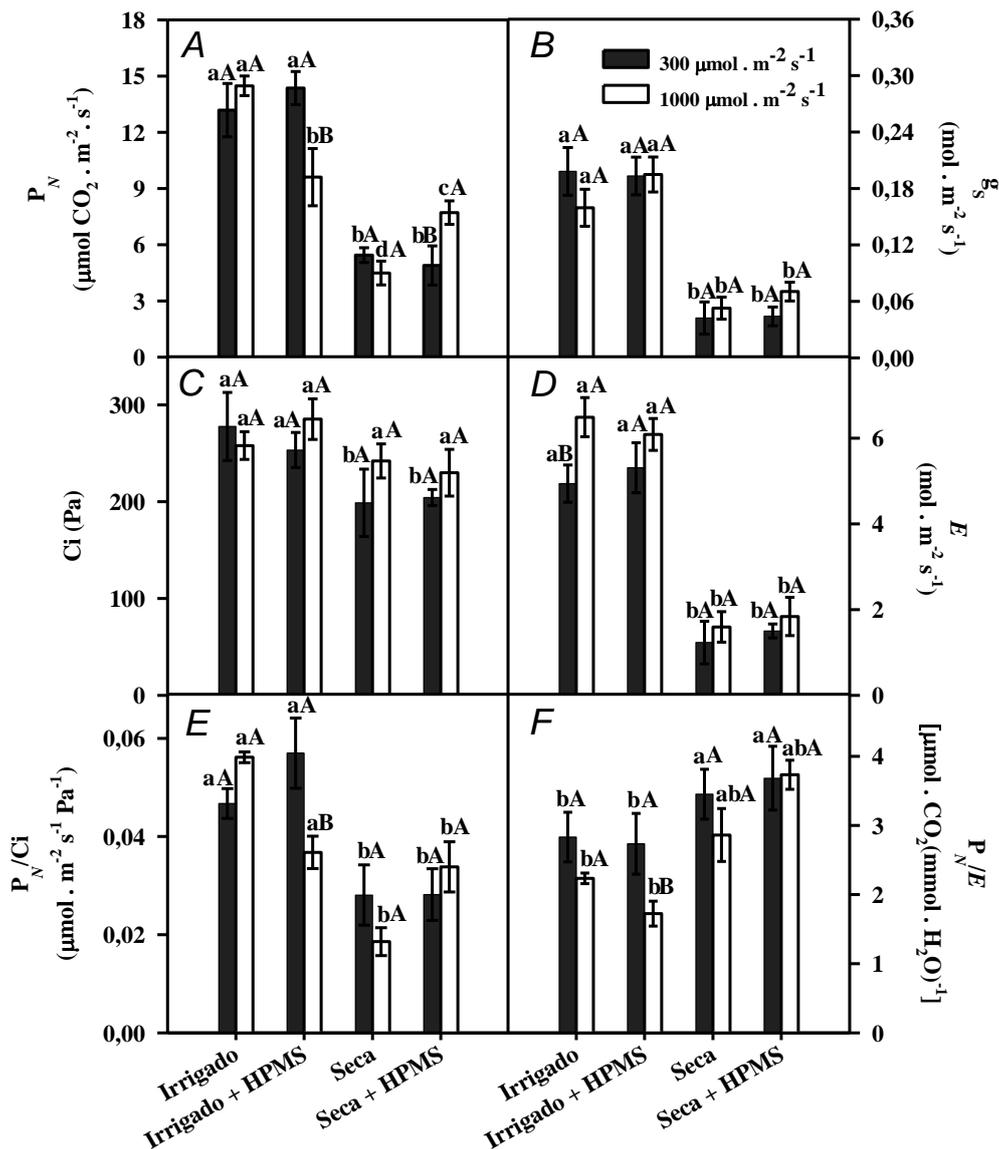


Figura 4. Assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (B), concentração intercelular de CO_2 (C), transpiração (D), eficiência instantânea de carboxilação (E) e eficiência no uso de água (F) em plantas de arroz submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e excesso de luz, submetidas ao tratamento com inibidor específico para a enzima oxidase do glicolato (α -hidroxissulfonato-HPMS). Os valores representam médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

A análise das curvas P_N/C_i mostrou que o estresse hídrico afetou severamente a fixação de carbono tanto na baixa quanto na alta luminosidade (Figura 5). Na menor intensidade de luz a redução da atividade fotossintética não foi atenuada pela redução de atividade da GO causada pela seca bem como pelo HPMS. Em condições de

luminosidade elevada, foi observada uma redução da assimilação de carbono em resposta ao incremento do Ci, tanto nas plantas irrigadas quanto naquelas submetidas ao estresse hídrico. Essa menor P_N nas plantas sob alta luz poder está associada em para redução da eficiência fotoquímica, como indicada pelas medias de fluorescência da clorofila (Figura 6).

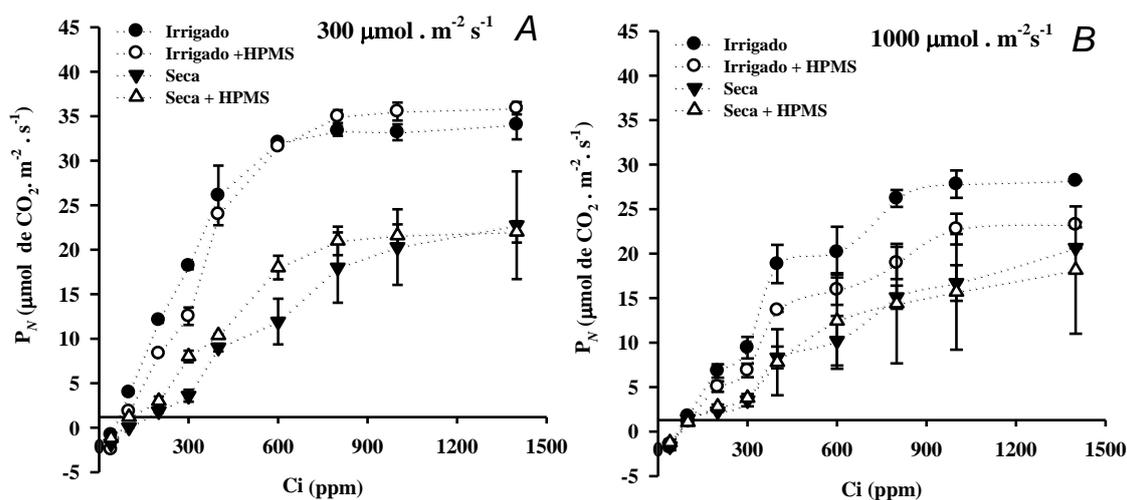


Figura 5. Curvas P_N/C_i em plantas de arroz expostas ao estresse de seca associado a baixa (A) e elevada (B) luminosidade por três dias, quando submetidas ao tratamento com inibidor para a atividade da enzima oxidase do glicolato (α -hidroxissulfonato-HPMS). Os valores são médias de 3 repetições \pm desvio padrão. Baixa luminosidade ($300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e elevada ($1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Durante as leituras a intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) foi mantida em $1.500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3.3-MUDANÇAS DA ATIVIDADE FOTOQUÍMICA EM PLANTAS DE ARROZ EXPOSTAS AOS ESTRESSES DE SECA E EXCESSO DE LUZ QUANDO SUBMETIDAS À REDUÇÃO DA ATIVIDADE DA GO

Os estresses de seca e luminosidade elevada afetaram diferentemente a atividade fotoquímica das plantas de arroz, como indicado pelas medidas da eficiência quântica máxima e efetiva dos fotossistemas II, da taxa aparente de transporte de elétrons e quenching fotoquímico e não fotoquímico (Figura 6). As plantas expostas aos estresses avaliados não apresentaram danos estruturais aparente nos PSII, conforme demonstrado pela eficiência quântica potencial (F_v/F_m), a qual não foi alterada em relação as plantas referência (Figura 6A). A eficiência quântica efetiva ($\Delta F/F_m'$) não foi afetada nas plantas irrigadas, enquanto naquelas sob estresse hídrico em baixa luz foi reduzida em 15%, comparado as plantas referência (Figura 6B). Por outro lado, nas plantas expostas

a luz elevada a $\Delta F/F_m'$ foi reduzida em 50% e 70% nas condições irrigadas e expostas a seca, respectivamente, em relação as referências.

As mudanças induzidas na $\Delta F/F_m'$ pela luz elevada foi similar ao observado para o quenching fotoquímico (qP) e transporta de elétrons (ETR). Nas plantas em baixa luz o estresse hídrico, bem como a redução de atividade da GO, não afetou o qP com relação ao tratamento de referência (Figura 6C). Entretanto, nas plantas irrigadas ocorreu uma redução de 20% do qP em respostas a luz elevada, enquanto nas plantas sob seca essa redução foi de 50%, comparado às plantas de referência. De maneira similar, as plantas sob baixa luz apresentaram redução de apenas 15% da ETR em resposta a seca, enquanto naquelas irrigadas e expostas a luz alta ocorreu redução de 50% e alcançou redução 70% nas plantas sob seca (Figura 6D). Os resultados mostram que apesar da luz elevada e do estresse hídrico não ter danificado estruturas do PSII (F_v/F_m), a atividade fotoquímica foi modulada pela luminosidade, respostas que foi intensificada nas plantas sob seca.

A forte restrição a atividade fotoquímica, indicada pela redução da $\Delta F/F_m'$, qP e ETR, nas plantas submetidas ao excesso de luz e a seca ocorreu associado a dissipação de energia. Nas plantas irrigadas e mantidas em baixa luminosidade foi observado um aumento de 100% no quenching não fotoquímico (NPQ) apenas nas plantas submetidas ao estresse hídrico, se comparadas às plantas referência (Figura 6E). Por outro lado, nas plantas irrigadas ou submetidas ao estresse hídrico apresentaram um intenso aumento do da dissipação de energia por meio do NPQ (cerca de 250%) quando submetidas à luminosidade elevada. Esse aumento da dissipação de energia por NPQ aparentemente evitou a ocorrência de excesso de elétrons para a fotossíntese, como indicado pela relação ETR/P_N (Figura 6F).

Nas plantas irrigadas e mantidas em baixa luminosidade a redução da atividade da GO não afetou a relação ETR/P_N , enquanto nas plantas expostas a seca ocorreu um aumento de 100% da relação ETR/P_N , se comparadas com as plantas referência (Figura 6F). Por outro lado, nas plantas irrigadas submetidas à luminosidade elevada foi observada uma redução de 50% da relação ETR/P_N , indicando menor excesso de elétrons para a fotossíntese, se comparadas com as plantas referência. Em adição, nas plantas submetidas à seca e excesso de luz, foi observado um leve aumento nesta relação. Esses resultados indicam que as plantas de arroz apresentaram uma relativa capacidade de dissipar o excesso de energia por NPQ sob condições de luminosidade, porém restritivas para a fotossíntese o que poderia causar danos celulares.

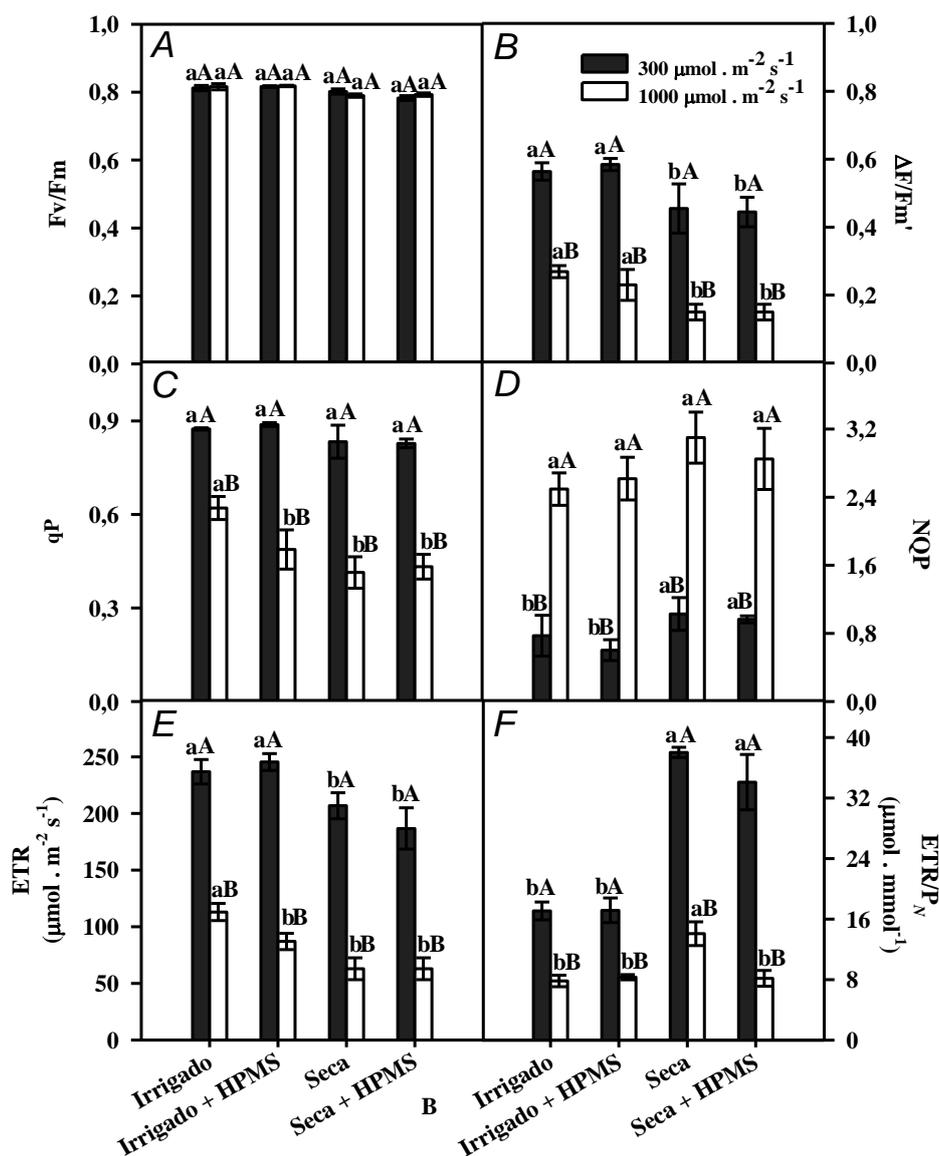


Figura 6. Eficiência quântica máxima (A) e efetiva do PSII (B), quenching fotoquímico (C), quenching não fotoquímico (D), taxa aparente de transporte de elétrons (E) e excesso de elétrons para a fotossíntese, dada pela razão ETR/ P_N (F) em plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de luz. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

3.4-MODULAÇÃO DA ENZIMA OXIDASE DO GLICOLATO (GO) PELO INIBIDOR A-HIDROXISULFONATO E PELOS ESTRESSES DE SECA E EXCESSO DE LUZ E MUDANÇAS EM METABOLITOS ASSOCIADOS

As plantas bem irrigadas e mantidas em excesso de luz, durante três dias, não apresentaram mudanças na atividade da GO (Figura 7A). Nas plantas irrigadas tratadas com HPMS ocorreu uma inibição parcial da atividade da GO (redução de 50%) tanto em baixa quanto em alta luminosidade, comparado as plantas referência. Esse resultado confirmou o efeito inibitório do HPMS na atividade da GO *in vivo* no arroz. Nas plantas sob estresse hídrico a redução de atividade da GO foi em média de 50% e 20% quando mantidas em baixa e em alta luminosidade, respectivamente, se comparado as plantas referência. Nas plantas pré-expostas a seca e submetidas ao tratamento com HPMS ocorreu uma redução de 60% na atividade da GO, tanto em baixa quanto em alta luz. Esses resultados mostram que a redução de atividade da GO pelo estresse hídrico é dependente da luminosidade, além de confirmar o efeito do tratamento com HPMS para a inibição parcial da GO.

A oxidase do glicolato é uma enzima que catalisa uma reação específica nos peroxissomos em células vegetais, na qual o glicolato é oxidado a glioxilato gerando quantidades equimolares de peróxido de hidrogênio. Dessa forma, uma redução de atividade da GO pode estar associada com um menor conteúdo do produto direto (glioxilato) ou indireto (peróxido de hidrogênio) da reação no tecido. No entanto, assim como foi observado para o estudo de seca associado ao calor, os dados obtidos aqui mostram que essa aparente relação para o glioxilato não ocorreu. Por outro lado, o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas condições de estresse hídrico isolado e combinados com alta luminosidade na ausência e presença do HPMS foi diretamente associado à atividade da GO.

Nas plantas irrigadas sob luminosidade baixa ocorreu uma redução de 15% do teor de glioxilato quando tratadas com HPMS, comparado a referência, enquanto que naquelas expostas a seca não foi alterado (Figura 7B). O conteúdo de glioxilato não foi afetado em resposta a luminosidade elevada nas plantas irrigadas, independente da redução de atividade da GO, enquanto nas plantas submetidas à seca foi observado um aumento médio de 25% em respostas a alta luz. O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não foi alterado nas plantas mantidas em baixa luminosidade, independente do estresse hídrico e/ou redução de atividade da GO (Figura 7C). Por outro lado, nas plantas expostas a seca e luminosidade elevada o conteúdo de H_2O_2 foi cerca de 200%

maior no tecido foliar na ausência do HPMS em relação à referência. Além disso, a presença do HPMS nas mesmas condições (seca + excesso de luz) promoveu uma redução de 100% no conteúdo de peróxido de hidrogênio se comparado a ausência do HPMS, mesmo apresentando um leve aumento em relação à referência (Figura 6C).

Semelhantemente ao dano de membrana (Figura 2B), o conteúdo de TBARS, também como um indicador de danos oxidativos foi modulado pela redução da atividade da oxidase do glicolato (Figura 7D). Nas plantas irrigadas sob baixa e alta luminosidade não houve alterações neste parâmetro independentemente da inibição da oxidase do glicolato. Por outro lado, nas plantas expostas a seca na ausência do HPMS ocorreu aumentos na peroxidação de lipídios de cerca 50% e 100% em baixa e alta luminosidade em relação a plantas de referência. Interessantemente, nas plantas expostas a combinação dos estresses (seca + excesso de luz) na presença do HPMS a peroxidação de lipídios reduziu em cerca de 50% em relação à referência e 300% em relação ao tratamento de seca sem o inibidor da oxidase do glicolato (Figura 7D).

Em conjunto, esses dados mostram que a redução de atividade da oxidase do glicolato nas plantas de arroz, pela inibição da GO causada pelo HPMS, pelo estresse hídrico e luminosidade elevada, não apresenta relação direta com o conteúdo de glioxilato. Entretanto, no presente estudo o conteúdo de peróxido de hidrogênio e TBARS (H_2O_2) foi modulado pela redução parcial da atividade da oxidase do glicolato.

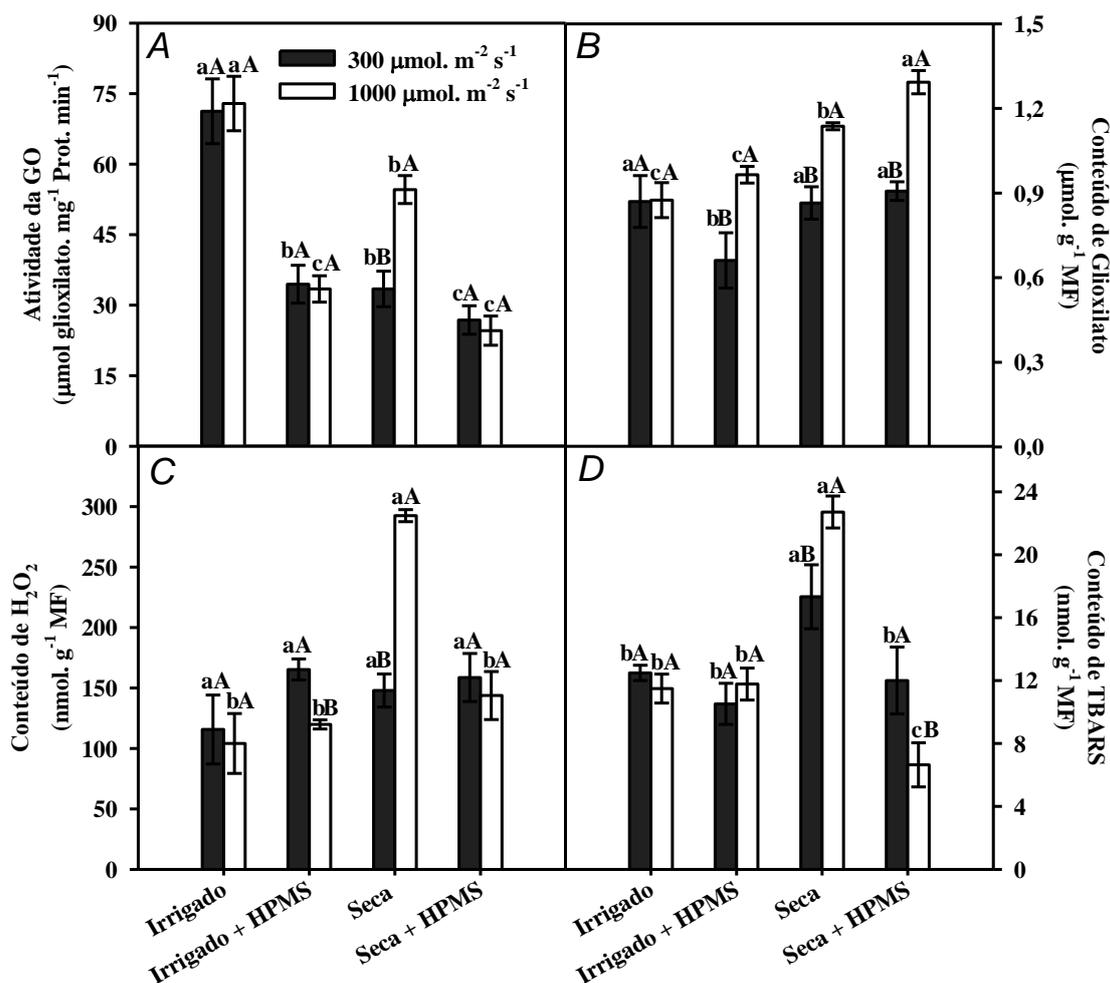


Figura 7. Mudanças da atividade da enzima oxidase do glicolato GO (A) e dos conteúdos de glioxilato (B) e peróxido de hidrogênio(C) e peroxidação de lipídios (D) em plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de luz. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

Os conteúdos de glicina e serina, aminoácidos da via fotorrespiratória, foram diferentemente modulados pelos estresses de seca e luminosidade elevada e pela ação do inibidor da GO (Figura 8). As plantas expostas a baixa luz apresentaram aumento médio de 80% do conteúdo de glicina na condição irrigada e na seca, enquanto que o estresse hídrico isolado não afetou o teor desse aminoácido, se comparado a referência (Figura 8A). Por outro lado, as plantas irrigadas submetidas a luz elevada apresentaram acréscimos médios de 200% e 300% em resposta a luz elevada na ausência e presença

do HPMS, respectivamente, em relação a referência. Esse aumento (cerca de 300%) foi mantido naquelas plantas pré-expostas a seca quando submetidas a luminosidade elevada, independente da inibição da GO.

Por outro lado, nas plantas submetidas ao estresse hídrico na ausência do HPMS não foram observadas mudanças no conteúdo deste aminoácido, enquanto que, naquelas plantas submetidas ao estresse hídrico na presença do inibidor da GO o aumento foi de cerca de 90% em relação à referência (Figura 8A). Nas plantas irrigadas e expostas à alta luz ($1000 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram observados aumentos de 224% e 438% na ausência e presença do HPMS em relação à referência (Figura 8A). Adicionalmente, naquelas plantas submetidas aos estresses combinados de seca e luminosidade elevada o conteúdo de glicina na ausência e presença do HPMS aumentou em cerca de 505% e 348% em relação a referência (Figura 8A).

Os conteúdos de serina nas plantas irrigadas e mantidas sob baixa luz ($300 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$) não foram observadas mudanças neste metabólito (Figura 8B). Por outro lado, nas plantas submetidas ao estresse hídrico ocorreram reduções de 19% na ausência e presença do HPMS (Figura 8B). Semelhante aos conteúdos de glicina nas plantas irrigadas expostas a alta luz ($1000 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$), o conteúdo de serina mostrou um padrão de resposta semelhante nesta condição. O aumento foi de cerca de 29 e 88% na ausência e presença do HPMS (Figura 8B). Em adição, nas plantas submetidas aos estresses combinados de seca e luz elevada ocorreram aumentos médios de 78% (Figura 8B). Esses resultados indicam que tanto a luminosidade elevada como o HPMS induziram aumentos em metabólitos associados à fotorrespiração. Neste estudo, tanto o produto direto, glioxilato (Figura 7B) como metabólitos a jusante da atividade da GO nos peroxissomos, como glicina e serina foram acumulados. Esses dados indicam a existência de vias alternativas para regulação da fotorrespiração.

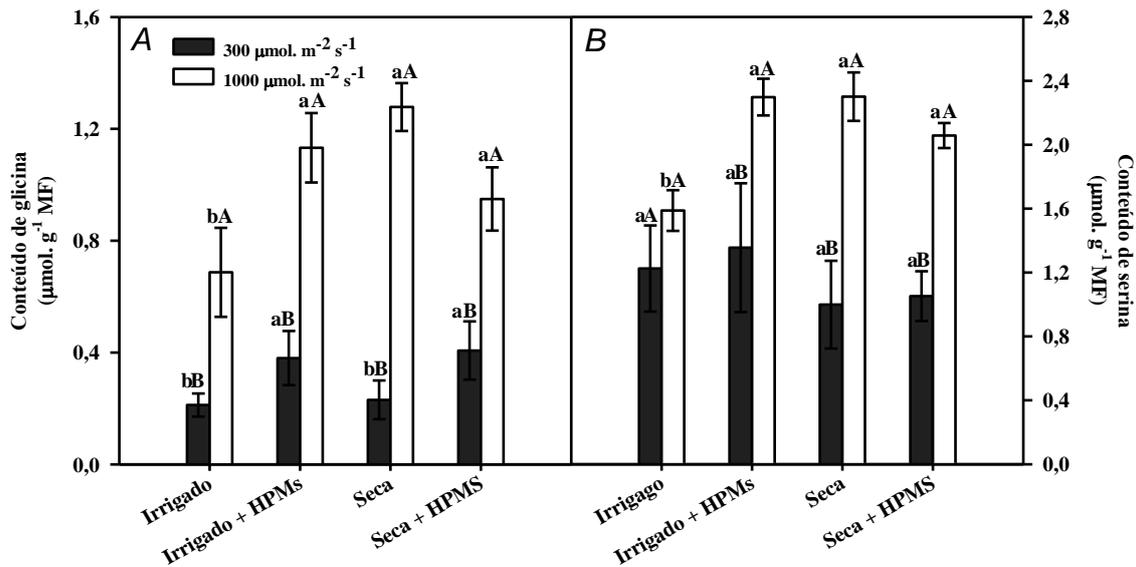


Figura 8. Conteúdo dos aminoácidos glicina (A) e serina (B) em plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de luz. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

3.5-ATIVIDADE DE ENZIMAS OXIDATIVAS (SOD, CAT E APX) E CONTEÚDO DE ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS (ASA E GSH) EM PLANTAS DE ARROZ COM REDUZIDA DE ATIVIDADE DA GO SOB ESTRESSES DE SECA E LUMINOSIDADE ELEVADA

As atividades das enzimas dismutases do superóxido (SOD), peroxidases do ascorbato (APX) e catalases (CAT) foram diferentemente afetadas pelos estresses isolados e combinados de seca e luminosidade elevada, as quais foram influenciadas pela redução de atividade da GO (Figura 9). A atividade da SOD não foi afetada nas plantas irrigadas mantidas em baixa luminosidade, enquanto nas plantas pré-expostas a seca ocorreu aumentos de 20% apenas na presença de inibição da GO, comparado as plantas referência (Figura 9A). As plantas submetidas à luz elevada não apresentaram mudanças de atividade da SOD quando bem irrigadas. No entanto, nas plantas submetidas seca, a atividade da SOD foi cerca de 100% e 20% maior em respostas a alta luz e alta luz mais HPMS, respectivamente, em relação ao tratamento de referência.

Nas plantas de arroz mantidas em baixa luminosidade a atividade da CAT foi cerca de 20% maior apenas nas plantas pré-expostas ao estresse hídrico e tratadas para inibição da GO, em relação a referência (Figura 9B). Por outro lado, as plantas de arroz irrigadas apresentaram aumento de 20% da atividade da CAT em repostas a luz alta

quando irrigadas, resposta não observada nas plantas com reduzida atividade da GO. Nas plantas submetidas a seca a atividade da CAT foi cerca de 120% maior em resposta a luminosidade elevada, enquanto nas plantas tratadas com HPMS esse aumento não ocorreu, comparado as plantas referência (Figura 9B). Os dados mostram que sob condições de luminosidade elevada a redução de atividade da GO ocorreu associada a menor atividade da CAT tanto nas plantas irrigadas quanto submetidas a seca.

Com relação à atividade de APX, os dados mostram que nas plantas irrigadas e expostas seca, a atividade dessa enzima foi cerca de 15% maior, comparado a referência, enquanto naquelas expostas seca e tratadas com HPMS esse aumento foi de 30% (Figura 9C). Nas plantas de arroz submetidas à luminosidade elevada o aumento da atividade da APX foi em média de 30% nas plantas irrigadas ou pré-expostas à seca, na ausência do inibidor, enquanto na presença de inibição da GO esse aumento foi de apenas 15% (Figura 9C). Os resultados obtidos para a atividade das duas peroxidases aqui avaliadas (CAT e APX) mostram uma aparente redução de atividade nas plantas tratadas para inibição da GO, sugerindo uma possível relação com a menor produção de peróxidos pela GO nessas condições.

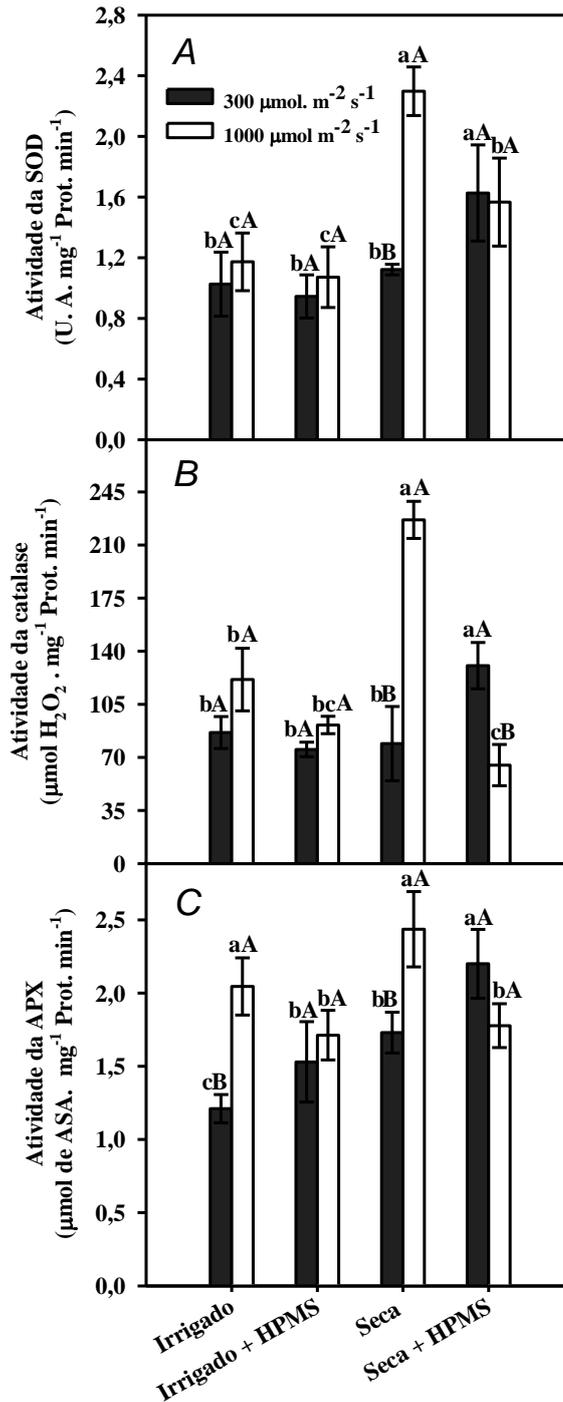


Figura 9. Atividade das enzimas dismutase do superóxido SOD (A), catalase (B) e peroxidase do ascorbato (D) em plantas de arroz submetidas aos estresses isolados e combinados de seca e excesso de luz, na ausência e presença de inibição da enzima oxidase do glicolato. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

O conteúdo de ascorbato reduzido (ASA) aumentou 200% nas plantas irrigadas mantidas ou pré-expostas a suspensão da rega em baixa luminosidade por três dias, na ausência e na presença da redução parcial da GO pelo HPMS, se comparado às plantas referência (Figura 10A). Esse resultado mostra uma relativa contribuição do ASA como antioxidante não enzimático nessas condições de estresse, o que ocorreu associado com o aumento de atividade da APX (Figura 9C). Assim, esse aumento do teor de ASA pode estar associado ao seu papel como doador de elétrons para a redução do H_2O_2 em O_2 e H_2O , na reação catalisada pela APX. Nas plantas de arroz irrigadas e submetidas a alta luminosidade foi observado um aumento de 30% do conteúdo de ASA, comparado as plantas referência (Figura 10A). Em condições de restrição hídrica, o aumento no conteúdo de ascorbato nas plantas expostas a alta luminosidade foi cerca de 200%, na ausência e presença do HPMS, comparadas as plantas referência (Figura 10A).

As plantas irrigadas mantidas em baixa luminosidade, apresentaram aumento de cerca de 105 % do conteúdo de GSH quando tratadas para inibição da GO, comparadas as plantas referência (Figura 10B). Nas plantas pré-expostas a suspensão da rega o aumento do conteúdo de GSH foi em média 65% nas plantas sob baixa luz, na ausência e presença do HPMS, em relação às plantas mantidas em condições referência (Figura 10B). Nas plantas irrigadas e expostas a alta luminosidade ocorreu um aumento de 20% e 85% do teor de GSH na ausência e presença do inibidor, respectivamente, comparado a referência. Nas plantas pré-expostas a seca foi observado um aumento de cerca de 120% no conteúdo de GSH na presença de alta luminosidade, resposta não observada nas plantas tratadas para inibição da GO (Figura 10B).

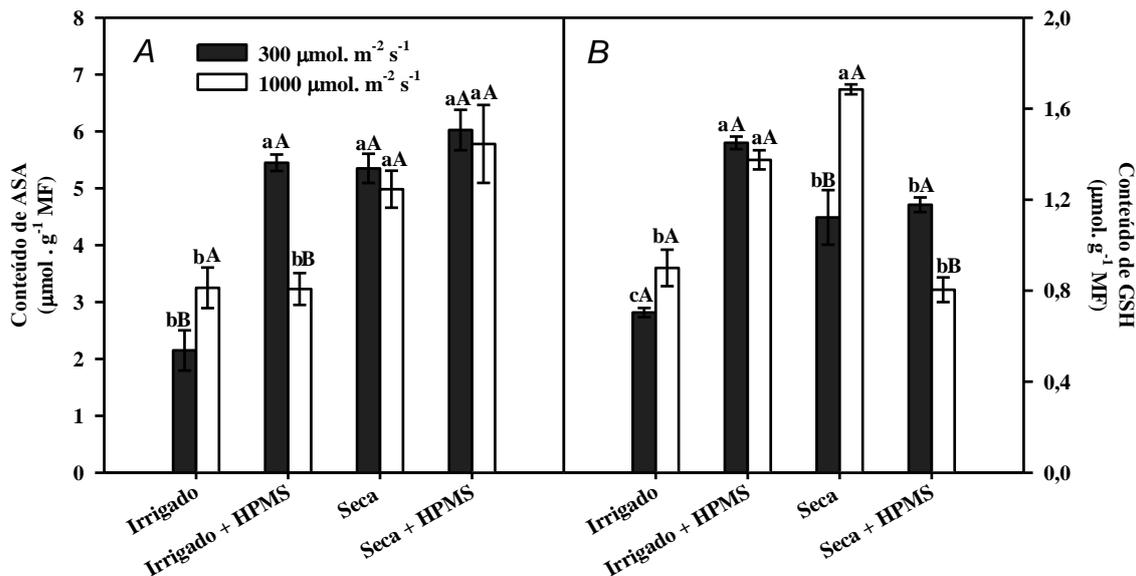


Figura 10. Mudanças nos conteúdos de ascorbato (A) e glutatona reduzidos (B) em folhas de plantas de arroz submetidas a estresses isolados e combinados de seca e excesso de luz, na ausência e presença de inibição da enzima oxidase do glicolato. Dados representam as médias de 4 repetições \pm desvio padrão. Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

3.6-MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA RUBISCO EM RESPOSTAS AOS ESTRESSES DE SECA E EXCESSO DE LUZ EM PLANTAS DE ARROZ COM REDUZIDA ATIVIDADE DA OXIDASE DO GLICOLATO

A expressão da Rubisco nas plantas de arroz foi significativamente influenciada pelos estresses de seca e luminosidade, uma resposta que apresentou uma clara relação com a redução de atividade da GO (Figuras 11A-B). As plantas irrigadas mantidas em baixa luz não apresentaram mudanças no conteúdo da Rubisco em resposta a menor atividade da GO, comparado as plantas referência (Figuras 11A-B). Por outro lado, nas plantas pré-expostas a seca sob baixa luminosidade o teor de Rubisco foi cerca de 50% menor se comparado com as plantas referência, enquanto naquelas tratadas com HPMS o conteúdo da Rubisco não foi alterado. Esses resultados mostram que o efeito da seca na redução do teor da Rubisco foi aparentemente neutralizado pelo tratamento com o inibidor da GO, um reposta não esperado de outras proteínas além da GO.

Nas plantas irrigadas submetidas à alta luminosidade por três dias o conteúdo da Rubisco não foi alterado, em relação às plantas referência, enquanto naquelas tratadas com HPMS em mesmas condições foi observada uma redução de 30% (Figura 11). As

plantas pré-expostas ao estresse hídrico apresentaram uma redução de 15% no conteúdo da Rubisco na ausência do inibidor da GO, enquanto na presença do HPMS não foi alterado, se comparados as plantas referência. Os dados mostram que as plantas de arroz tratadas para inibição da oxidase do glicolato apresentaram uma melhor estabilidade da Rubisco, com base no conteúdo dessa proteína. Essa resposta foi observada tanto na ausência quanto na presença do estresse hídrico, associada com baixa e luminosidade elevada.

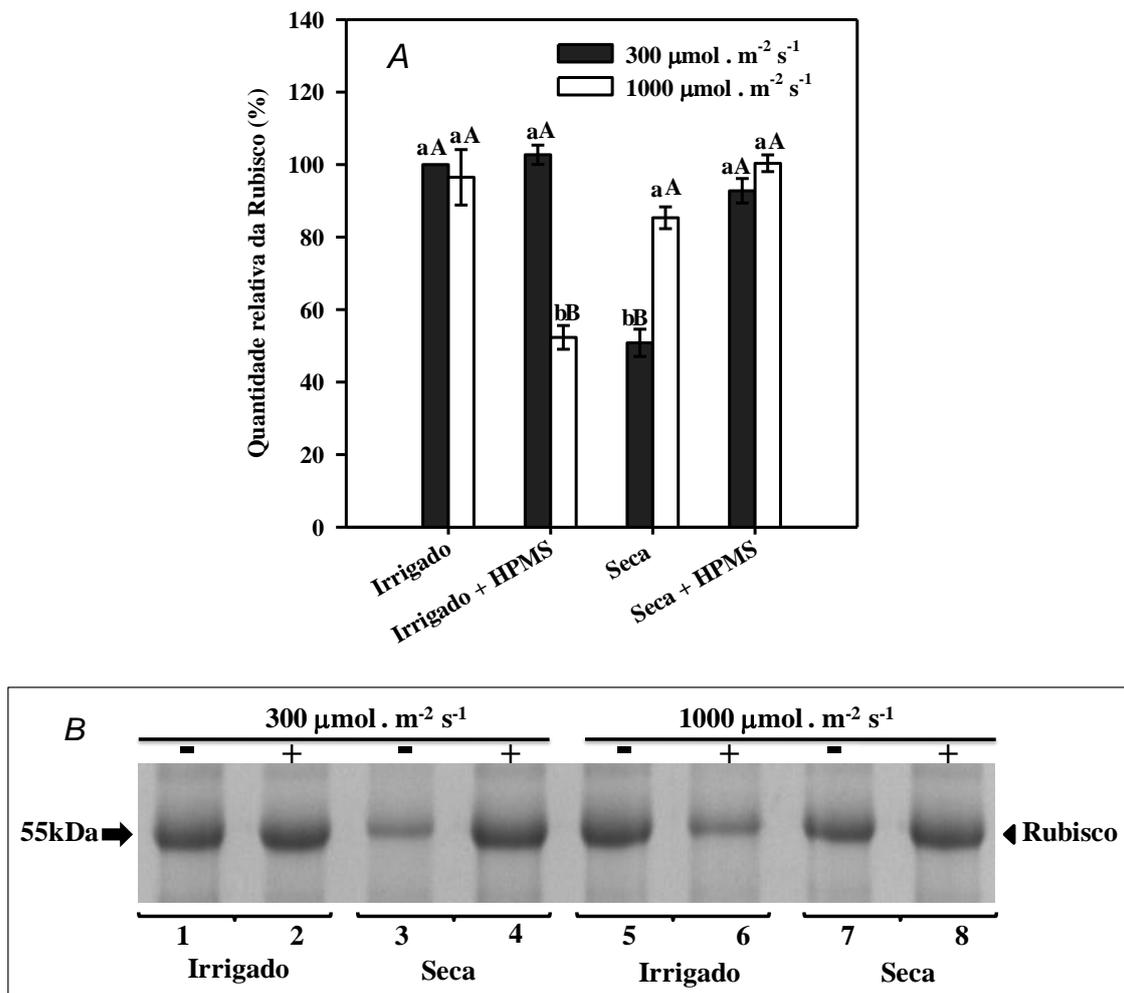


Figura 11. Mudanças na expressão da Rubisco avaliada com base na quantidade relativa da Rubisco (A) e western blotting (B), em folhas de plantas de arroz na ausência ou presença da inibição parcial da enzima glicolato oxidase, em respostas aos estresses isolados e combinados de seca e de excesso de luz. A sequência dos poços: 1 e 5 - Irrigados; 2 e 6 - Irrigados + HPMS; 3 e 7 - Seca; 4 e 8 - Seca +HPMS. Foram aplicados 5 μg de proteínas em cada poço e a detecção realizadas por meio de anticorpo específico para a subunidade maior da Rubisco (Ref. do anticorpo: GW23153/Sigma). Média seguida da mesma letra maiúscula não difere entre os tratamentos de luz, enquanto aquelas seguidas das letras minúsculas não diferem dentro de cada luminosidade, pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

4-DISCUSSÃO

4.1-MUDANÇAS DO STATUS HÍDRICO E DANOS CELULARES EM REPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO ASSOCIADO À LUMINOSIDADE ELEVADA

No presente estudo, as plantas de arroz quando submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses seca e excesso de luz revelaram diferentes mudanças metabólicas relacionadas com a aclimação a esses fatores abióticos. O estresse hídrico causou redução do CRA foliar independente da intensidade de luz baixa ou elevada, sugerindo ausência de interação desses fatores na modulação do *status* hídrico da planta (Figura 2A). O estresse hídrico isolado causou aumento do dano de membrana e a combinação com a luz elevada estimulou ainda mais esse efeito. Por outro lado, a exposição a seca e combinação de seca com luz alta nas plantas tratadas para redução de atividade da GO esse efeito foi anulado, indicando o envolvimento do H₂O₂ gerado na fotorrespiração com a indução desses danos durante os estresses hídrico e seca (Figura 2B).

A redução do teor de umidade (CRA e Ψ_{H_2O}) bem como a indução de danos celulares (DM) em diferentes espécies vegetais expostas ao estresse hídrico é bastante relatado na literatura (JIANG e HUANG, 2001; DEMIREVSKA et al., 2010; SILVA et al., 2010). Esses distúrbios são atribuídos a reduções da condutância hidráulica na planta, o que resulta em perdas de turgor celular e ativação de respostas metabólicas associadas à danos secundários como o estresse oxidativo (JIANG e HUANG, 2001). Os resultados mostram que os estresses de seca e excesso de luz causaram redução do teor de clorofilas, distúrbio que foi intensificado pela combinação desses fatores indicando efeito interativo na indução de danos oxidativos sobre componentes os fotossistemas (Figura 3). Esses danos não foram atenuados pela menor atividade da GO nas diferentes condições, sugerindo que foram danos em componentes cloroplásticos não dependentes da geração de H₂O₂ nos peroxissomos.

Os estresses abióticos são responsáveis por limitar o crescimento e rendimento das culturas por afetar muitos processos fisiológicos chave nas plantas (MITTLER, 2006; LIU e HUANG, 2008; CRAMER et al., 2011). Neste estudo, a imposição do estresse hídrico e luminosidade elevada (isolado e combinados) afetaram negativamente a eficiência fotossintética nas plantas de arroz, indicado pelas trocas gasosas e atividade fotoquímica (Figura 4, 5 e 6). Por outro lado, a redução da atividade da GO, pelo HPMS favoreceu a fotossíntese nos estresses combinados de seca com excesso de luz (1000

$\mu\text{mol. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). As diminuições na assimilação de carbono sob estresse de seca (isolado) ocorreu em parte ao fechamento estomático evidenciado por decréscimos na condutância estomática (g_s) e transpiração (E) (Figura 4B-D) que induziu uma menor concentração intercelular de CO_2 (Figura 3C). Essa diminuição da condutância é considerada uma defesa das plantas para evitar excesso de perda de água em condições de seca, uma resposta típica de diferentes espécies vegetais (VALLIYODAN e NGUYEN, 2006; CHAVES et al., 2009).

A redução da fotossíntese nas plantas de arroz expostas a seca foi pouco influenciada pelo excesso de luz, porém nas plantas submetidas à inibição parcial da GO ocorreu um leve estímulo da P_N na combinação da seca com excesso de luz (Figura 4A). Essa diminuição da P_N estar relacionada com uma aparente fotoinibição que limitou a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) nesta condição (Figura 6E). A fotoinibição é um processo que ocorre quando o excesso de luz incidente impede a síntese do reparo da proteína D1 do centro de reação do PSII prejudicando seu perfeito funcionamento (TAKAHASHI e MURATA, 2008; TAKAHASHI e BADGER, 2011).

Na combinação dos estresses, apesar de não ter alterado a eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), que se manteve em 0,8, valor reconhecido como ótimo e que sugere a ausência de danos no PSII (CHAVES et al., 2002). A diminuição da atividade fotossintética foi acompanhada por alterações em outros parâmetros da fluorescência da clorofila a relacionados à maior eficiência fotossintética. Além disso, ocorreram também diminuições no conteúdo de clorofilas, pigmentos responsáveis pela captação de energia luminosa para etapa fotoquímica (STREIT, 2005; TAKAHASHI e MURATA; 2008).

Essas diminuições foram observadas tanto nos estresses de seca como de luz elevada, e foi intensificada pela combinação dos estresses (seca + excesso de luz) (Figura 3). Dessa forma, essa redução do conteúdo de clorofilas pode representar um mecanismo que restringe a captação de energia para minimizar fotodanos. Em adição, dos parâmetros relacionados à fluorescência da clorofila a , também ocorreram alterações na eficiência quântica efetiva do PSII ($\Delta F/F_m'$), quenching fotoquímico (qP) e taxa de transporte de elétrons (ETR) (Figura 6B-C-E) o que explica em parte uma menor assimilação de carbono. Além disso, essas alterações foram intensificadas pela seca, sugerindo uma interação negativa destes fatores.

Adicionalmente, diminuições nestes parâmetros ($\Delta F/F_m'$, qP e ETR) foram seguidos por altos valores de NPQ sob luz elevada, que evitou a ocorrência de excesso

de elétrons para fotossíntese evidenciado pela relação (ETR/P_N), indicando que plantas de arroz são capazes de se proteger da alta incidência de luminosidade através da dissipação de energia que podem gerar danos oxidativos em estruturas celulares.

Sob condições de excesso de luz, na qual a quantidade de fótons absorvida acaba excedendo a capacidade de absorção de carbono (CO_2), levam inevitavelmente ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem danificar moléculas biológicas importantes para o funcionamento do Ciclo de Calvin (ASADA, 2006). A dissipação do excesso de energia por meio do NPQ representa um importante mecanismo de fotoproteção que ajuda a regular e proteger a fotossíntese em condição de estresses como os aplicados no presente estudo (ZHOU et al., 2007).

Interessantemente, na combinação dos estresses (seca + excesso de luz) a redução da atividade da oxidase do glicolato resultou em uma maior assimilação de carbono (Figura 4A). Esse aumento na fotossíntese não foi acompanhado por um maior funcionamento na etapa fotoquímica nesta condição como indicado pela eficiência quântica máxima (F_v/F_m) e efetiva do PSII ($\Delta F/F_m'$), quenching fotoquímico (qP) e taxa de transporte de elétrons (ETR) (Figura 6A-B-C-E). Esse resultado sugere que a redução da atividade da GO pelo HPMS *in vivo* provavelmente influenciou as reações no ciclo de Calvin o que favoreceu uma maior assimilação de carbono na combinação dos estresses (seca + excesso de luz).

4.2-OXIDASE DO GLICOLATO, MUDANÇAS EM METABÓLITOS ASSOCIADOS E MECANISMOS DE PROTEÇÃO OXIDATIVA

As enzimas são responsáveis pela catálise de reações do metabolismo dos seres vivos. Sua atuação ocorre em moléculas específicas chamadas de substrato, que são modificadas e dão origem aos produtos da reação. Em plantas, a oxidase do glicolato é considerada a enzima chave da via fotorrespiratória, porque realiza um passo essencial nesta via metabólica (XU et al., 2009). Sua ação promove a oxidação do glicolato (substrato), produto da reação de oxigenação da Rubisco, em glioxilato nos peroxissomos (ZELITCH e OCHOA, 1953; DEL RIO et al., 2006; BAUWER et al., 2010).

Como produto indireto dessa reação é gerado peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie reativa de oxigênio que é produzida durante a fotorrespiração (FOYER e NOCTOR, 2003). Apesar de ser uma importante molécula sinalizadora em processos fisiológicos de crescimento (ISHIBASHI et al., 2011), o excesso de H_2O_2 pode danificar

moléculas biológicas importantes e gerar estresse oxidativos na célula (MOLLER, 2007; DEMIDCHK et al., 2015). Assim, a fotorrespiração é um dos fatores que mais limitam a produtividade em plantas C3, tendo em vista que compete com a fotossíntese e representa um alto custo energético, além de gerar espécies reativas de oxigênio (FOYER et al., 2009).

Dessa forma, a oxidase do glicolato tem sido alvo de muitas investigações, tendo em vista sua estreita relação com a Rubisco no ciclo de Calvin e também com a produtividade das culturas (KEBEISH et al., 2007; XU et al., 2009; ZELITCH et al., 2009; LU et al., 2014; NOLQUE et al., 2014; DALAL et al., 2015; ZHANG et al., 2016). Neste estudo, observamos que o α -hidroxissulfonato (HPMS) possui um efeito inibitório *in vivo* na oxidase do glicolato (Figura 7A) em arroz (*Oriza sativa* L.), além de plantas de milho (*Zeamays*) e Tabaco (*Nicotianatabacum*) (ZELITCH, 1973; KHAVARI-NEJAD, 1977). Porém, como ocorre o mecanismo de inibição enzimática, se é do tipo competitivo ou não pelo substrato, ou até mesmo irreversível não é conhecido até hoje.

Mas é sabido apenas que o modo de ação inibitório do HPMS em folhas acontece nos peroxissomos, organela do metabolismo do glicolato (KHAVARI-NEJAD, 1977). O arroz é uma planta C3 em que a atividade da GO é cerca de 12 vezes maior que uma planta C4 como o milho (UENO et al., 2005). Entretanto, a inibição da oxidase do glicolato nesta espécie não reduziu o conteúdo de metabólitos diretos como o glioxilato (Figura 7B), ou mesmo aqueles a jusante da atividade da GO como os aminoácidos glicina e serina em condições dos estresses isolados e combinados de seca e excesso de luz, onde a via fotorrespiratória é intensificada (Figura 8A-B).

Estes resultados estão de acordo com os encontrados também por pesquisa com plantas de arroz transgênicas, em que o gene que codifica para a GO foi silenciado (XU et al., 2009). Neste estudo, foi sugerido que o acúmulo destes metabólitos (glioxilato, glicina e serina) e especialmente o glicolato promovem um efeito inibitório no ciclo de Calvin reduzindo a fotossíntese (WINGLER et al., 2000). Na combinação dos estresses (seca + excesso de luz) os indicadores de danos oxidativos como o conteúdo de H₂O₂ foi reduzido na presença do HPMS (Figura 7C) resposta que foi correlacionada com o dano de membrana (Figura 2B) e peroxidação de lipídios de membranas (Figura 7D). Em adição, os mecanismos enzimáticos de proteção oxidativa responsáveis pela remoção do H₂O₂ e manutenção da homeostase redox celular, compreendido pelas peroxidases CAT e APX mostraram uma redução na presença do inibidor da oxidase do glicolato (Figura

9B-C). Na literatura, tem sido documentada que a atividade destas peroxidases é estritamente relacionada com a produção de H_2O_2 (SHIGEOKA et al., 2002; ZHANG et al., 2016).

Esses dados sugerem que a redução da atividade da GO pode atenuar os danos oxidativos nas células sob condições ambientais favoráveis ao aumento da fotorrespiração, já que os peroxissomos é a principal fonte de H_2O_2 e é onde o HPMS atua (KHAVARI-NEJAD, 1977; FOYER e NOCTOR, 2003). Por outro lado, a dismutase do superóxido (SOD), primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (EROs), em especial o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) foi influenciada pelo inibidor (HPMS) nos estresses de seca isolada e combinada com excesso de luz (Figura 9A). Esse aumento da atividade da SOD nesta condição indica a capacidade de eliminação do radical $O_2^{\cdot-}$ para formação de H_2O_2 que não foi relacionado com os indicadores de danos oxidativos (Figura 7C-D).

Entretanto, através do transporte por aquaporinas (BIENERT e CHAUMONT, 2014) esse H_2O_2 pode cumprir outras funções, como por exemplo, de uma importante molécula sinalizadora em resposta a seca (ISHIBASHI et al., 2011) ou mesmo induzir ao fechamento estomático (FOYER e NOCTOR, 2009) como foi observado no presente estudo (Figura 4B-D). Além dos mecanismos enzimáticos de proteção oxidativa, as plantas também dispõem dos mecanismos não enzimáticos dos quais fazem parte o ascorbato e a glutathiona (FOYER e NOCTOR, 2011; GEST et al., 2013). Esses antioxidantes podem eliminar diretamente o H_2O_2 e o $O_2^{\cdot-}$ e com isso passam da forma reduzida para a forma oxidada. Através de enzimas como monodehidroascorbato redutase (MDAsa) e glutathiona redutase (GSH) esses antioxidantes são regenerados para as formas reduzidas que são as mais importantes na proteção oxidativa (SHIGEOKA et al., 2002).

No presente estudo, tanto na ausência quanto na presença do HPMS, as plantas expostas a baixa luminosidade aumentaram expressivamente o conteúdo de AsA, acompanhado também por um aumento na atividade da APX (Figura 10A-9C). Esses dados sugerem a importância deste antioxidante em arroz em condição de seca, porque o ASA pode tanto eliminar diretamente os EROs como pode doar elétrons para a APX no ciclo água-água (SHIGEOKA et al., 2002; GEST et al., 2013). Por outro lado, nas plantas expostas a alta luminosidade não foram observados efeitos do HPMS no conteúdo do ASA. Entretanto, o aumento observado aconteceu em resposta à combinação dos estresses (seca + excesso de luz).

Na literatura, tem sido documentado que aumentos nos níveis de ascorbato fazem parte da resposta celular a estresses abióticos em muitas espécies de plantas. Usando plantas transgênicas de tomate (*Solanum tuberosum* L. cv. Taedong Valley) Hemavathi et al., (2009) com super expressão do gene, ácido galacturone redutase (GaIUR) aumentou os níveis de ascorbato e assim aumentou a tolerância a salinidade e ao metil violagem. Em plantas de cajueiro (*Anacardium occidentale*) expostas a salinidade elevada (200 mM de NaCl), foi observado que o ascorbato e glutathione fazem parte de um importante mecanismo de proteção em folhas de caju evitando os danos oxidativos (FERREIRA-SILVA et al., 2012).

Neste estudo, a redução dos danos oxidativos (Figura 7D) observados pela redução da atividade da GO (Figura 7A) na combinação dos estresses (seca + excesso de luz) foi também acompanhado por baixos níveis de glutathione (Figura 10B). Esses dados sugerem que o mecanismo de inibição da GO pelo HPMS diminui de fato a produção de H₂O₂, tendo em vista que aumentos nos níveis de GSH ocorrem em resposta a estresses oxidativos gerados pelo acúmulo de H₂O₂ (NOCTOR et al., 2013).

4.3-EXPRESSÃO DA RUBISCO EM RESPOSTAS A ESTRESSES ABIÓTICOS E SUA RELAÇÃO COM A FOTORRESPIRAÇÃO

Nas plantas, a síntese da Rubisco representa um alto custo em nutrientes. Devido a sua baixa especificidade pelo CO₂ as plantas necessitam produzi-la em grandes quantidades para manter a fotossíntese (ZHU et al., 2007). Entretanto, esta intensa produção nos tecidos fotossintéticos é inibida sob certos estresses abióticos como a seca, além de ser prejudicada sua atividade carboxilase (KHANNA-CHOPRA, 2012; GALMÉS et al., 2013). No presente estudo, os dados de expressão da Rubisco mostram que o efeito da seca na redução do teor desta proteína foi aparentemente neutralizado pelo tratamento com o inibidor da GO, um reposta não esperada de outras proteínas além da GO. Esses dados sugerem que a redução da atividade da GO pelo HPMS (Figura 7A) promove uma melhor estabilidade desta proteína, diminuindo a taxa de degradação nos estresses isolados e combinados do presente estudo (Figura 11A-B).

A atividade da GO nos peroxissomos durante a fotorrespiração é considerada a maior fonte de H₂O₂ em plantas (FOYER e NOCTOR, 2003; ZHANG et al., 2016) e tem sido documentado que o H₂O₂ pode atuar como um forte agente oxidativo em enzimas do ciclo de Calvin como a Rubisco (FOYER et al., 2011). Dessa forma, esses resultados encontrados suportam a idéia que a manutenção de baixos níveis de H₂O₂

pela redução da atividade da GO promove essa estabilidade da Rubisco. Em adição, o conteúdo da Rubisco foi diretamente correlacionado com a assimilação de carbono nas plantas expostas aos estresses combinados de seca com excesso de luz (Figura 4A). Além disso, a redução da GO favoreceu a maior assimilação de carbono que pode ser explicada pela maior instabilidade da Rubisco conferida pelo HPMS nestas condições. Entretanto, nem sempre a fotossíntese pode estar diretamente relacionada com o conteúdo da Rubisco tendo em vista que a fotossíntese faz parte de um conjunto de processos que se iniciam desde a captação de luz pelas clorofilas até a assimilação do CO₂ (RAINES, 2011; EVANS, 2013).

Outro aspecto importante estar diretamente relacionado com suas características. Apesar de ser a proteína mais abundante nos tecidos fotossintéticos, a Rubisco possui uma característica bifuncional, catalisa tanto a carboxilação como a oxigenação (ZHU et al., 2007). Sua atividade oxigenase dar início a fotorrespiração, processo metabólico que compete com a fotossíntese, consome energia e gera espécies reativas de oxigênio (EROs) (FOYER et al., 2009). O alto custo desta via metabólica para reciclagem do carbono no glicolato é cerca de 12.5 ATP por molécula de fosfoglicolato (2PG) produzido (PETERHANSEL et al., 2010).

A estimativa da fotorrespiração é um importante parâmetro para compreensão da biologia e produtividade das culturas em ambientes sujeitos a mudanças climáticas (SHARKEY et al., 2007; IPCC, 2007). Neste estudo, a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}), taxa máxima de transporte de elétrons (J), respiração no escuro (Rd) e fotorrespiração (Pr) não foi estimado pela dificuldade de elaborar a curva da fotossíntese em resposta ao CO₂ com o uso do IRGA (Figura 5). Entretanto, metabólitos diretamente relacionados com a fotorrespiração como o glioxilato e os aminoácidos glicina e serina foram acumulados em resposta a tentativa de reduzir esta via (Figura 7B e Figura 8A-B). Esses resultados suportam a idéia de que a fotorrespiração pode ser regulada por outras vias distintas e que sua relação com a fotossíntese é de fato bem complexa (BETTI et al., 2016; TIMM et al., 2016).

5-CONCLUSÃO

Os dados mostram que o dano celular (extravasamento) causado pelo excesso de luz é intensificado pela seca, dano aparentemente induzido pelo H₂O₂ gerado pela GO na fotorrespiração visto que foi reduzido pelo HPMS. A menor atividade da GO nas plantas sob seca e exposta a luz elevada resulta numa melhor P_N em parte devido ao maior conteúdo da Rubisco, apesar do excesso de luz causar uma aparente limitação fotoquímica. Os danos oxidativos nas plantas submetidas à seca expostas ao excesso de luz está associado à maior atividade da GO, indicando efeito da fotorrespiração nessas condições.

6-REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol-oxidase in *Beta vulgaris*, **Plant Physiology**, v.24, p.1-15, 1949.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v. 141, p. 391-396, 2006.

BAGARD, M.; LE THIEC, D.; DELACOTE, E.; HASENFRATZ-SAUDER, M.-P.; BANVOY, J.; GÉRARD, J.; DIZENGREMEL, P.; JOLIVET, Y. Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. **Physiol. Plant.**, v.134, n.4, p.559-74, 2008.

BAKER, A. L.; TOLBERT, N. E. Glycolate oxidase (ferredoxin-containing form). **Methods in Enzymology**, v.9, 339-340, 1966.

BAUWE, H.; HAGEMANN, M.; FERNIE, A. R. Photorespiration: players, partners and origin. **Trends in Plant Science**, v.15, p. 330-336, 2010.

BAUWE, H.; Hagemann, M.; KERN, R.; TIMM, S. Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v.15, p. 269-275, 2012.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem.** v. 44, p. 276-287, 1971.

BETTI, M.; BAUWE, H.; BUSCH, F.A.; FERNIE, A. R.; KEECH, O.; LEVEY, M.; ORT, D.R.; PARRY, M. A. J.; SAGE, R.; TIMM, S.; WALKER, B.; WEBER, A. P.M. Manipulating photorespiration to increase plant productivity: recent advances and perspectives for crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 2977-2988, 2016.

BIENERT, G. P.; CHAUMONT, F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, p. 1596-1604, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, p. 551-560, 2009.

CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M. L.; RICARDO, C. P. P.; OSÓRIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How Plants Cope with Water Stress in the Field. Photosynthesis and Growth. **Annals of Botany**, v. 89, p. 907-916, 2002.

CHAGAS, R. M.; SILVEIRA, J. A. G; RIBEIRO, R. V; VITORELLO, V. A; CARRER, H. Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.90, p.181-188, 2008.

CHEESEMAN, J. M. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 10, 2435-2444, 2006.

CRAMER, G. R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, v. 11, p. 2-14, 2011.

DALAL, J.; LOPEZ, H.; VASANI, N. B.; HU, Z.; SWIFT, J. E.; YALAMANCHILLI, R.; DVORA, M.; LIN, X.; XIE, D.; QU, R.; SEDEROFF, H. W. A photorespiratory bypass increases plant growth and seed yield in biofuel crop *Camelina sativa*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 2-22, 2015.

DEL RÍO, L. A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; BARROSO, J. B. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. **Plant Physiology**, v. 141, p. 330-335, 2006.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**. v. 109, p. 212-228, 2015.

DEMIREVSKA, K.; SIMOVA-STOILOVA, L.; FEDINA, L.; GEORGIEVA, K.; KUNERT, K. Response of *Oryza cystatin I* Transformed Tobacco Plants to Drought, Heat and Light Stress. **J. Agronomy & Crop Science**, v. 196, p. 99-99, 2010.

EVANS, J. R. Improving Photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 162, p. 1780-1793, 2013.

FERREIRA-SILVA, S. L.; VOIGT, E. L.; SILVA, E. N.; MAIA, J. M.; ARAGÃO, T. C. R., SILVEIRA, J. A. G. Partial oxidative protection by enzymatic and non-enzymatic components in cashew leaves under high salinity. **Biologia Plantarum**, v. 56, p. 172-176, 2012.

FIDALGO, F.; SANTOS, A.; SANTOS, I. e SALEMA. R. Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. **Ann. Appl. Biol.**, v. 145, p. 185-192. 2004.

FOYER, C.H., NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355-364, 2003.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications, **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, p. 862-868, 2009.

FOYER, C. H.; BLOOM, A. J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 455-484, 2009.

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, p. 93-100, 2011.

GALMÉS, J.; ARANJUELO, I.; MEDRANO, H., FLEXAS, J. Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. **Photosynth Res**, v. 117, p. 73-90, 2013.

GEST, N.; GAUTIER, H.; STEVENS, R. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 695-709, 2013.

GIANNOPOLITIS, O.; RIES, S. K. Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal Biochem**, v. 106, p. 207-211, 1980.

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

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

HEMAVATHI, UPADHYAYA, C. P.; YOUNG, K. E.; AKULA, N.; KIM, H. S.; HEUNG, J. J.; OH, O. M.; ASWATH, C. R.; CHUN, S. C.; KIM, D. H.; PARK, S. W. Over-expression of strawberry D-galacturonic acid reductase in potato leads to accumulation of vitamin C with enhanced abiotic stress tolerance. **Plant Science**, v. 177, p. 659-667, 2009.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. - Calif. Agr. **Exp. Sta. Circular**, v. 347: p. 1-39, 1950.

HODGES, M.; DELLERO, Y.; KEECH, O.; BETTI, M.; RAGHAVENDRA, A. S.; SAGE, R.; ZHU, X-G.; ALLEN, D. K.; WEBER, A. P. M. Perspectives for a better understanding of the metabolic integration of photorespiration within a complex plant primary metabolism network. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 3015-3026, 2016.

IPCC. 2007. SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K. B.; TIGNOR, M.; MILLER, H. L, eds. **Climate change 2007: the physical science basis**. Contribution of Working Group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, UK & New York, NY, USA: Cambridge University Press.

ISHIBASHI, Y.; YAMAGUCHI, H.; YUASAB, T.; IWAYA-INOUE, M.; ARIMA, S.; C, ZHENG, S-H. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1562-1567, 2011.

JIANG, Y.; HUANG, B. Drought and Heat Stress Injury to Two Cool-Season Turfgrasses in Relation to Antioxidant Metabolism and Lipid Peroxidation. **Crop Sci.**, v. 41, p. 436-442, 2001.

KAMPFENKEL, K.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, R. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical biochemistry**. v. 225, p. 165-167, 1995.

KEBEISH, R.; NIESSEN, M.; THIRUVEEDHI, K.; BARI, R.; HIRSCH, H.J.; ROSENKRANZ, R.; STABLER, N.; SCHONFELD, B.; KREUZALER, F.; PETERHANSEL, C. Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 593-599, 2007.

KHANNA-CHOPRA, R. Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. **Protoplasma**, v. 249, p. 469-481, 2012.

KHAVARI-NEJAD, R. Effects of α -Hydroxy-2-Pyridinemethanesulfonic Acid on Photosynthetic Carbon Dioxide Uptake and Stomatal Movements in Excised Tomato Leaves. **Plant Physiol.**, v. 60, p. 44-46, 1977.

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

LIU, X.; HUANG, B. Photosynthetic acclimation to high temperatures associated with heat tolerance in creeping bentgrass. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1947-1953, 2008.

LU, Y.; LI, Y.; YANG, Q.; ZHANG, Z.; CHEN, Y.; ZHANG, S.; PENG, X. X. Suppression of glycolate oxidase causes glyoxylate accumulation that inhibits photosynthesis through deactivating Rubisco in rice. **Physiologia Plantarum**, v. 150, p. 463-476, 2014.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **TRENDS in Plant Science**, v. 11, p. 15-19, 2006.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A.; Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 58, p. 459-81, 2007.

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

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**. v. 22, p. 1068-1072, 1981.

NISHIYAMA, Y.; MURATA, N. Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, p. 8777-8796, 2014.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; FOYER, C. H. Regulating the Redox Gatekeeper: Vacuolar Sequestration Puts Glutathione Disulfide in Its Place. **Plant Physiology**, v. 163, p. 665-671, 2013.

NÖLKE, G.; HOUDELET, M.; KREUZALER, F.; PETERHÄNSEL, C.; SCHILLBERG, S. The expression of a recombinant glycolate dehydrogenase polyprotein in potato (*Solanum tuberosum*) plastids strongly enhances photosynthesis and tuber yield. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 734-742, 2014.

PETERHÄNSEL, C.; HORST, I.; NIESSEN, M.; BLUME, C.; KEBEISH, R.; KÜRKCÜOĞLU, S.; KREUZALER, F. 2010. Photorespiration. **The Arabidopsis Book 8, e 0130**.

RAINES, C. A. Increasing Photosynthetic Carbon Assimilation in C₃ Plants to Improve Crop Yield: Current and Future Strategies. **Plant Physiology**, v. 155, p. 36-42, 2011.

SALES, C. R. G.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, R. S.; FONTENELE, A. V.; MACHADO, E. C.; SILVEIRA, J. A. G.; RIBEIRO, R. V. Photosynthetic and antioxidant responses to drought during sugarcane ripening. **Photosynthetica**, v. 53, p. 547-554, 2015.

SHANAHAN, J. F.; EDWARDS, I. B.; QUICK, J. S.; FENWICK, J. R. Membrane Thermostability and Heat Tolerance of Spring Wheat. **Crop Science**, v. 30, p. 247-251, 1990.

SHARKEY, T. D.; BERNACCHI, C. J.; FARQUHAR, G. D.; SINGSAAS, E. L. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, p. 1035-1040, 2007.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, T. Regulation e function of ascorbato peroxidase isoenzymes. **Jornal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1305-1319, 2002.

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

SOUSA, R. H. V.; CARVALHO, F. E. L.; RIBEIRO, C.W.; PASSAIA, G.; CUNHA, J. R.; LIMA-MELO, Y.; MARGIS-PINHEIRO, M.; SILVEIRA, J. A. G. Peroxisomal APX knockdown triggers antioxidant mechanisms favourable for coping with high photorespiratory H₂O₂ induced by CAT deficiency in Rice. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, p. 499-513, 2015.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.35, p.748-755, 2005.

SUZUKI, N.; RIVERO, R. M.; SHULAEV, V.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, v. 203, p. 32-43, 2014.

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

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

TIMM, S.; FLORIAN, A.; FERNIE, A. R.; BAUWE, H. The regulatory interplay between photorespiration and photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 2923-2929, 2016.

UENO, O.; YASHIMURA, Y.; SENTOKU, N. Variation in the activity of some enzymes of photorespiratory metabolism in C4 grasses. **Annals of Botany**, v. 96, p. 863-869, 2005.

VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H. T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p.1-7, 2006.

VOSS; SUNIL, B.; SCHEIBE, R.; RAGHAVENDRA, A. S. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. **Plant Biology**, v. 15, p.713-722, 2013.

WINGLER, A.; LEA, P.J.; QUICK, W. P.; LEEGOOD, R. C. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Philos Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 355, p. 1517-1529, 2000.

XU, H.; ZHANG, J.; ZENG, J.; JIANG, L.; LIU, E.; PENG, C.; HE, Z.; PENG, X. Inducible antisense suppression of glycolate oxidase reveals its strong regulation over photosynthesis in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 1799-1809, 2009.

YUAN, X. K.; YANG, Z. Q.; LI, Y. X.; LIU, Q.; HAN, W. Effects of different levels of water stress on leaf photosynthetic characteristics and antioxidant enzyme activities of greenhouse tomato. **Photosynthetica**, v. 54, p. 28-39, 2016.

ZELITCH, I.; OCHOA, S. Oxidation and reduction of glycolic and glyoxylic acid in plants. I. Glycolic acid oxidase. **J. Biol Chem**, v. 201, p. 707-718, 1953.

ZELITCH, I. Alternate pathways of glycolate synthesis in tobacco and maize leaves in relation to rates of photorespiration. **Plant Physiol.**, v. 51, p. 299-305, 1973.

ZELITCH, I.; SCHULTES, N.P.; PETERSON, R.B.; BROWN, P.; BRUTNELL, T. P. High Glycolate Oxidase Activity Is Required for Survival of Maize in Normal Air. **Plant Physiology**, v. 149, p. 195-204, 2009.

ZHANG, Z.; XU, Y.; XIE, Z.; LI, X.; HE, Z-H.; PENG, X-X. Association-Dissociation of Glycolate Oxidase with Catalase in Rice: A Potential Switch to Modulate Intracellular H₂O₂ Levels. **Molecular Plant**, v. 9, p. 737-748, 2016.

ZHOU, Y.; LAM, H. M.; ZHANG, J. Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1207-1217, 2007.

ZHU, X-G.; STURLER, E.; LONG, S. P. Optimizing the Distribution of Resources between Enzymes of Carbon Metabolism Can Dramatically Increase Photosynthetic Rate: A Numerical Simulation Using an Evolutionary Algorithm. **Plant Physiology**, v. 145, p. 513-526, 2007.

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

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os nossos dados sugerem que a oxidase do glicolato (GO) exerce uma regulação sobre a fotossíntese, e a redução na sua atividade sobre os estresses de seca e excesso de luz pode atenuar os danos oxidativos decorrentes do aumento da via fotorrespiratória nestas condições. No entanto, esses resultados não foram encontrados no estudo dos estresses isolados e combinados de seca e excesso de calor, como mostra o Capítulo II. Além disso, a redução da atividade da GO não aumentou a eficiência fotossintética, nem tão pouco diminuiu os danos oxidativos nestas condições. A ocorrência dos danos oxidativos sobre os estresses combinados de seca e excesso de calor foi associado a distúrbios no metabolismo fotossintético em cloroplastos.

Os resultados mostram também que nas plantas submetidas ao estresse hídrico a redução da fotossíntese (P_N) foi devido a limitações estomáticas, menor condutância estomática (g_s) e transpiração (E), e metabólicas direta, restrições para a eficiência fotoquímica e carboxilação instantânea (P_N/C_i). Por outro lado, nas plantas expostas ao calor ocorreu restrição fotossintética associada a parâmetros estomáticos (g_s e E) e fotoquímicos ($\Delta F/F_m'$, qP e ETR). O estresse hídrico e a luminosidade elevada causaram redução no conteúdo de clorofilas, especialmente clorofila *b*, distúrbio não observado nas plantas submetidas a temperaturas elevadas (42°C).

Os dados mostram que sob condição de seca, calor e excesso de luz, a menor atividade da GO não reduz a fotorrespiração (Pr) e não possui relação direta como os conteúdos de glioxilato, glicina e serina. As plantas submetidas à combinação de seca e calor apresentaram maior restrição estomática, comparadas àquelas expostas apenas a seca. Esse resultado indica que a seca combinado com o calor pode levar a maior limitação da dissipação térmica, via fluxo transpiratório, que o estresse hídrico. Os resultados sugerem uma interação negativa destes fatores, que reduziu a fotossíntese por intensificar a restrição estomática (g_s e E) e aumentar a fotorrespiração (Pr) mesmo com redução da atividade da GO.

Essa combinação também limitou proteção oxidativa conferida pelas peroxidases CAT-APX e o antioxidante ASA, que resultou em aumento na peroxidação de lipídios (TBARS) e foi associado à acumulação de H_2O_2 gerado por distúrbios fotossintéticos, aparentemente mais importante para induzir danos que a fotorrespiração. Por outro lado, quando o estresse hídrico foi combinado com excesso de luz ($1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a

redução da atividade da GO favoreceu P_N e reduziu os danos oxidativos indicados pelo dano de membrana (DM) e peroxidação de lipídios (TBARS).

No geral, os resultados mostram que a menor atividade da GO nas plantas expostas a combinação de seca e calor resulta em modulações distintas em relação aquelas sob seca e luz elevada. A redução de atividade da GO levou a uma melhor P_N em repostas a combinação de seca com luz elevada se comparado a seca com o calor. Por fim, a redução de atividade da GO não apresentou relação direta com os conteúdos de metabólitos da via fotorrespiratória, além de sugerir que essa via não foi a principal geradora de danos oxidativos nas plantas submetidas aos estresses aqui avaliados.