

DANILO DE MENEZES DALOSO

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DO MUTANTE *GUN4* DE
Arabidopsis thaliana SOB ESTRESSE LUMINOSO

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

2009

DANILO DE MENEZES DALOSO

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DO MUTANTE *GUN4* DE *Arabidopsis thaliana* SOB ESTRESSE LUMINOSO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2009.



Gilberto Sachetto Martins



Rogério Ferreira Ribas



Fábio Murilo DaMatta
(Coorientador)



Kacilda Naomi Kuki



Marcelo Ehlers Loureiro
(Orientador)

A Deus, dedico.

*“Quem Deus abençoa, ninguém
amaldiçoa.” Bob Marley*

Aos meus pais, ofereço.

*“Grandes riscos fazem parte de grandes
vitórias.” Roberto Shinyashiki*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ser meu fiel escudeiro, meu conselheiro, minha paz e sabedoria. Um homem feliz e realizado é aquele que traça seus planos e objetivos sempre com a paz de Deus no coração.

Ao professor Marcelo Loureiro, por esses dois anos de orientação, os quais contribuíram muito para minha formação acadêmica, sou especialmente grato.

Aos professores do programa de Fisiologia Vegetal-UFV, Fábio, Marco Aurélio, Andréa e Marco Oliva, pelo convívio e ensinamentos passados ao longo das disciplinas, bem como aos meus professores da graduação (Ciências Biológicas-UEMS), sobretudo Felipe, Gessi, Luiz e Willian, pela especial amizade.

Aos membros da banca de avaliação dessa dissertação, Kacilda Kuki, Fábio DaMatta, Rogério Ribas e Gilberto Sachetto, pelas valiosas considerações, enriqueceram sobremaneira esse trabalho.

Aos meus pais, por todo amor, compreensão e, principalmente, amizade. Minha maior realização é saber que vocês estão felizes e se orgulham de mais essa conquista, obrigado por existirem, vocês são tudo pra mim, amo vocês.

Aos companheiros de laboratório, em especial Carla Quinhones, Dani, Giselle, Téssio, Valdir e Werner, sou especialmente grato pela ajuda, puxões de orelha e pela amizade, sem os quais não seria possível chegar até aqui, muito obrigado.

Aos velhos amigos presentes em viçosa, Thales, Thiago, Carol, Paulo e Carla, por me proporcionarem ótimos momentos de lazer, foram extremamente importantes pra esse trabalho. Aos novos amigos de viçosa, Ana Maria, Camilo, Claudio, Clarice, Clenilso, Diego Carretero, Dudu, Elaine Cabrini, Fábio baiano, Ivan, Iulla, Juliane, Laís, Lucas, Michele Pacheco, Moisés, Tereza, e, em especial, minhas irmãs Giselle e Letícia.

Aos meus irmãos e irmãs da graduação, Carla, Carol, Clayton, Paulo, Vanessa, Vitor, Zildamara e todos(as) das Repúblicas Mikarreguem e Rep Sem Nome, pela excelente convivência, também sou especialmente grato.

Aos meus grandes amigos de Rancharia/SP, Alex, Adriano, Denis, Enio, Família Budiski, Joãozinho, João Paulo, Júlio César, Juninho, Paulo Letícia, Rafael Duarte, Renato Maeda e Fernando Casagrande, dentre outros, cada um com sua contribuição foram muito importantes para minha formação pessoal, podem contar comigo, sempre.

A todos da minha família Menezes, a mais divertida e trabalhadora, tenho certeza que o senhor Zizinho tem muito orgulho de vocês, assim como eu.

Aos técnicos(as) de laboratório Reginaldo, Rogério Gomide, Oswaldo, Marco Antônio, Mercês e Geraldo, por todo apoio às atividades realizadas nesse trabalho.

A CAPES pela bolsa de estudo, ao programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal e à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade.

BIOGRAFIA

Danilo de Menezes Daloso, filho de Roberto Belino Daloso e Maria Juciene de Menezes, nasceu em 18 de setembro de 1982 na cidade de Rancharia, estado de São Paulo.

Graduou-se em Ciências Biológicas em Fevereiro de 2007 pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul. Iniciou seu mestrado em Fisiologia Vegetal em março de 2007 na Universidade Federal de Viçosa, defendendo sua dissertação em fevereiro de 2009.

ÍNDICE

NOMENCLATURAS E ABREVIACÕES.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1 - Material vegetal e condições de crescimento das plantas.....	5
2.2 - Imposição do estresse luminoso	5
2.3 - Caracterização dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila- <i>a</i> em diferentes condições de luz	6
2.4 - Análises do padrão de modulação das redes fotossintéticas.....	7
2.5 - Acúmulo de aldeído malônico (MDA) e pigmentos fotossintéticos.....	8
2.6 - Determinação de fluxos metabólicos em folhas expostas a ¹⁴ CO ₂	9
2.7 - Delineamento experimental e análise estatística	10
3 - RESULTADOS	10
3.1 - Concentração de pigmentos	10
3.2 - Efeito do estresse luminoso nas trocas gasosas	11
3.3 - Fluxo metabólico fotossintético.....	12
3.4 - Efeito do estresse luminoso sobre a fluorescência da clorofila- <i>a</i> e nível de dano oxidativo.....	13
3.5 - Padrão de conectância das redes fotossintéticas de acordo com as diferentes condições de luz impostas.....	18
4 - DISCUSSÃO	19
4.1 - Caracterização fotossintética do mutante <i>gun4</i>	19
4.2 - Análises sistêmicas dos dados fotossintéticos	23
5 - CONCLUSÃO	25
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
7 - ANEXOS	35

NOMENCLATURAS E ABREVIACÕES

A taxa de assimilação fotossintética líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

C_i/C_a razão entre as concentrações internas e atmosféricas de CO_2 ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)

CG conectância global da rede

CG_F conectância global da rede fotoquímica

CG_{TG} conectância global da rede de trocas gasosas

Chl (a ; b) Clorofila a ; Clorofila b

Col-0 ecotipo Columbia de *Arabidopsis thaliana*

E taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

ETR taxa aparente de transporte de elétrons ($\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

FFFA fluxo de fótons fotossinteticamente ativos ($\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

F_m fluorescência máxima em folhas adaptadas ao escuro

F_m' fluorescência máxima de folhas adaptadas a luz

F_o fluorescência mínima em folhas adaptadas ao escuro

F_o' Fluorescência mínima de folhas adaptadas a luz

FSI fotossistema I

FSII fotossistema II

F_v/F_m rendimento quântico máximo potencial do FSII

GUN *genome uncoapled*

GUN gene GUN de *Arabidopsis thaliana*

gun4 mutante para o gene *GUN4* de *Arabidopsis thaliana*

g_s condutância estomática ao vapor de água ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

Lhcb light-harvesting chlorophyll binding protein

LHCI light-harvesting complex I (complexo coletor de luz do FSI)

LHCII light-harvesting complex II (complexo coletor de luz do FSII)

MDA aldeído malônico

Mg-Chl enzima magnésio-chelatase

Mg-ProtoIX magnésio-protoporfirina-IX

q_N coeficiente de extinção não fotoquímico

q_L coeficiente de extinção fotoquímica

R_F rede fotoquímica

RFA radiação fotossinteticamente ativa

R_{TG} rede de trocas gasosas

WT – wild Type (genótipo selvagem)

Φ_{NPQ} rendimento quântico da dissipação de energia regulada no FSII

Φ_{NO} rendimento quântico da dissipação de energia não regulada no FSII

Φ_{FSII} rendimento quântico efetivo do FSII

RESUMO

DALOSO, Danilo de Menezes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Caracterização fisiológica do mutante *gun4* de *Arabidopsis thaliana* sob estresse luminoso.** Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Coorientadores: Fábio Murilo DaMatta e Dimas Mendes Ribeiro.

Mutações em genes denominados *GUN* (*Genome UNcoupled*) têm auxiliado na compreensão das rotas de transdução de sinais do cloroplasto que controlam a expressão de genes fotossintéticos nucleares. Nesse sentido, o genótipo *gun4* tem sido caracterizado em aspectos bioquímicos e moleculares, no entanto pouco se sabe sobre aspectos fisiológicos desse mutante. Diante disso, de forma a complementar essa caracterização fenotípica, o objetivo desse trabalho foi avaliar as respostas fotossintéticas do mutante *gun4* de *Arabidopsis thaliana* sob diferentes níveis de luz. Plantas *gun4*, na ausência de estresse luminoso, apresentaram níveis de clorofila a e b, fluorescências mínima (F_0) e máxima (F_m) de folhas adaptadas ao escuro e rendimento quântico de dissipação não regulada de energia do fotossistema II (Φ_{NO}) reduzidos em 20%, 26%, 18% e 32%, respectivamente, enquanto que o rendimento quântico efetivo do FSII (Φ_{FSII}) e o coeficiente de extinção fotoquímico (qL) foram 11% e 20% maiores, respectivamente. Valores maiores de ETR (taxa de transporte de elétrons), Φ_{FSII} e qL também foram observados em *gun4* sob diferentes intensidades luminosas, demonstrando que este fenótipo transfere de forma mais eficiente a energia luminosa absorvida no complexo coletor de luz do FSII para o processo fotossintético. A taxa de assimilação líquida de carbono (A) e a condutância estomática (g_s) foram 43% e 61% menores em *gun4*, respectivamente. Porém, não houve diferença no fluxo de absorção de $^{14}CO_2$, sugerindo que a menor magnitude de A seja devido a uma restrição difusional ao influxo de CO_2 . Após 14 h de estresse, não houve diferença em A e os valores da taxa de transporte de elétrons (ETR) e Φ_{FSII} foram reduzidos em 35% e 50%, respectivamente, tanto nas plantas *gun4* como no tipo selvagem (WT). Entretanto, o

rendimento quântico potencial do FSII (F_v/F_m) decresceu significativamente apenas em WT, sugerindo que *gun4* possa minimizar, mais eficientemente, efeitos fotoinibitórios. Isto se evidencia, adicionalmente, nos maiores valores de coeficiente de extinção não fotoquímico (qN) e rendimento quântico de dissipação regulada de energia do FSII (Φ_{NPQ}). Em conjunto, esses fenótipos fotoquímicos de *gun4* podem explicar o maior aumento (48%) na conectância global da rede fotoquímica após 28 h de estresse, demonstrando a maior capacidade deste genótipo em ajustar seu aparato fotossintético em resposta ao estresse luminoso. Por fim, os resultados encontrados neste trabalho demonstraram a alta capacidade do genótipo *gun4* em dissipar o excesso de energia luminosa absorvida sob estresse e, apesar da forte redução no teor de clorofila, transferir esta mais eficientemente. Isso sugere a existência de um mecanismo de adaptação dos fotossistemas de forma a compensar a redução na absorção de luz, indicando um valor importante deste mutante para explorar os mecanismos que controlam a plasticidade dos complexos protéicos fotoquímicos.

ABSTRACT

DALOSO, Danilo de Menezes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february 2009.
Physiological characterization of *gun4* mutant of *Arabidopsis thaliana* under light stress. Advisor: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-Advisors: Fábio Murilo DaMatta and Dimas Mendes Ribeiro.

Mutations in *GUN* (*Genome UNcoupled*) genes have helped to understand the pathways of the chloroplast signal transduction that control the expression of nuclear photosynthetic genes. In this context, the *gun4* genotype has been characterized in biochemical and molecular aspects. However, little is known whether this mutant produces a phenotype physiological aspects. In order to complement the phenotypic characterization of *gun4* genotype, the aim of this study was evaluate the photosynthetic responses of *gun4* plants of *Arabidopsis thaliana* under different levels of light and under light stress. The *gun4* plants, in the absence of light stress showed reduced levels of chlorophyll a and b, minimal (F_o) and maximal (F_m) fluorescence in dark-adapted leaves, and quantum yield of unregulated energy dissipation of photosystem II (Φ_{NO}) in 20%, 26%, 18% e 32%, respectively. Also, the effective quantum yield of the FSII (Φ_{FSII}) and photochemical quenching (qL) were 11% and 20% higher, respectively. Higher values of ETR (electrons transport rate), Φ_{FSII} and qL were also found in *gun4* under different light intensities, showing that *gun4* can maximize the transfer of light energy absorbed in the light harvest complex of FSII for the photosynthetic process. The rate of net carbon assimilation (A) and stomatal conductance (g_s) were 43% and 61% lower in *gun4* respectively, despite no difference in the flow of absorption of $^{14}CO_2$ was observed, suggesting that the lower magnitude of photosynthesis is due to resistance to influx of CO_2 . After 14 hours of light stress, there was no difference in A , and the values of the electron transport rate (ETR) and Φ_{FSII} were reduced by 35% and 50% respectively, both in *gun4* and wild type (WT) plants. However, the quantum yield potential of FSII (F_v/F_m) decreased significantly only in WT, suggesting that *gun4* may

have a greater ability to minimize photoinhibitory effects. These results provide additional evidences for the higher non-photochemical quenching (qN) and quantum yield of regulated energy dissipation of the *gun4* FSII (Φ_{NPQ}). Together, the photochemical phenotypes of *gun4* may explain the increase (48%) in the photochemical global network connectance after 28 hours of stress, demonstrating the greater ability of this genotype to adjust its photosynthetic apparatus in response to light stress. Finally, the results found in this study demonstrated that *gun4* transfers and dissipates more efficiently the excess of light energy absorbed under light stress condition, despite a strong reduction in chlorophyll content. The results suggest the existence of a mechanism for the adjustment of the photosystem in order to offset the reduction of light absorption, indicating the importance of this mutant to explore the mechanisms that control the plasticity of the photochemical protein complex.

1 - INTRODUÇÃO

Rotas de comunicação entre o cloroplasto e o núcleo têm sido reveladas via mutações em *Arabidopsis thaliana* que demonstram um fenótipo *GUN* (*Genome UNcoupled*), associado à regulação da expressão de genes responsáveis pela geração de sinais cloroplastídicos que governam a expressão de genes nucleares. Dentre os genes *GUN*, cinco já foram relatados, *GUN1*, 2, 3, 4 e 5, sendo que quatro (*GUN2-5*) codificam proteínas envolvidas na biossíntese de tetrapirrólicos (Susek e Chory, 1992; Mochizuki et al. 2001; Larkin et al. 2003).

O gene *GUN4* codifica uma proteína cloroplastídica que interage com a subunidade H da enzima Magnésio-quelatase (Mg-ChlH) (Larkin et al. 2003), estimulando sua atividade para conversão de Protoporfirina-IX (ProtoIX) em Mg-Protoporfirina-IX (Mg-ProtoIX) (Figura 1) (Tanaka e Tanaka, 2006). Em adição, devido à localização sub-celular e ao fato de uma parte significativa dessa proteína não estar associada à Mg-ChlH, sugere-se que esteja relacionada ao transporte de Mg-ProtoIX do cloroplasto para o citosol (Nott et al. 2006; Ankele et al. 2007; Fernández e Strand, 2008), o que a confere um possível papel fotoprotetor, já que, assim, pode contribuir para minimizar danos oxidativos no cloroplasto causados pelo acúmulo deste tetrapirrólico, devido suas propriedades foto-oxidantes (Rodermel e Park, 2003; Tanaka e Tanaka, 2007).

O fenótipo do mutante *gun4* é caracterizado por níveis reduzidos de clorofilas e de Mg-ProtoIX, uma molécula candidata a ser um efector negativo da expressão de genes fotossintéticos nucleares, por iniciar a sinalização retrógrada cloroplasto-núcleo (*retrograde signalling*) (Pontier et al. 2007). A mutação do gene *GUN4* em cianobactéria reduz a atividade da enzima ferro-quelatase (Fe-Chl) bem como os níveis de grupos Heme, sugerindo também estar envolvida na biossíntese desses grupamentos

e, assim, pode controlar o fluxo de substrato para as rotas biossintéticas de clorofilas ou grupos Heme (Wilde et al. 2004; Masuda e Fujita, 2008).

Os mecanismos pelos quais os genes *GUN* estão envolvidos na sinalização retrógrada são pouco compreendidos (Koussevitzky et al. 2007). Porém, sabe-se que essa sinalização pode ocorrer mediante variações no potencial redox da maquinaria fotossintética, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou acúmulo de tetrapirrólicos no cloroplasto, de forma a reprimir a expressão de genes fotossintéticos no núcleo, sob condições de estresse (Gray, 2003; Apel e Hirt, 2004; Zhang, 2007; Pogson et al. 2008), como a família gênica *Lhcb* (*Light-harvesting chlorophyll binding protein*) e *RbcS* (*Small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*) (Nott et al. 2006; Ankele et al. 2007; Larkin e Ruckle, 2008).

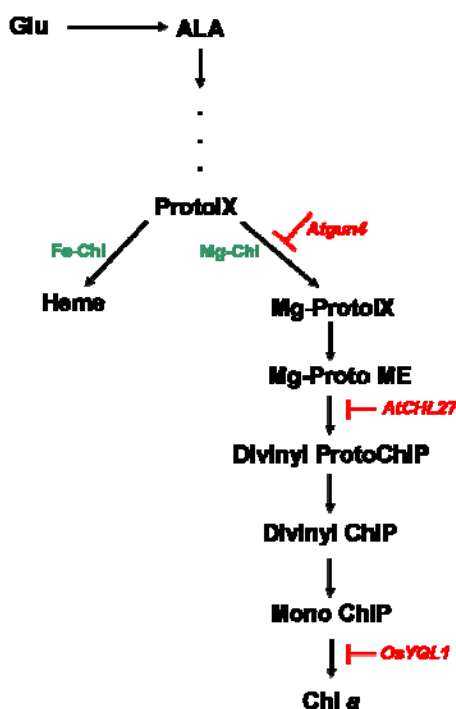


Figura 1. Rota biossintética de tetrapirrólicos em *Arabidopsis thaliana*. Glu, glutamato; ALA, Ácido 5-aminolevulínico; ProtoIX, protoporfirina IX; Fe-Chl, Enzima Ferro-quelataase; Mg-Chl, Enzima Magnésio-quelataase; Mg-protoIX, Magnésio-protoporfirina IX; Mg-proto ME, Magnésio-protoporfirina monometil éster; Divinyl ProtoChlP, divinil Proto-clorofilídeo; Divinyl ChlP, divinil clorofilídeo; Mono ChlP, monovinil clorofilídeo; Chl a, clorofila a. *Atgun4* e *AtCHL27* são mutantes de *A. thaliana* e *OsYGL1* é um mutante de *Oryza sativa*. Rota baseada em Tanaka e Tanaka (2007).

O acúmulo de Mg-ProtoIX no cloroplasto foi reportado como um dos sinais dessa organela que regula negativamente a expressão de genes fotossintéticos, como *Lhcb1*, quando o desenvolvimento do plastídio é inibido (Strand et al. 2003; Larkin et al. 2003; Koussevitzky et al. 2007; Pontier et al. 2007). No entanto, Mochizuki et al. (2008) e Moulin et al. (2008) demonstraram que essa sinalização pode não estar relacionada com o acúmulo de Mg-ProtoIX, indicando que outro sinal estaria envolvido na sinalização cloroplasto-núcleo, o qual é ainda elusivo a esses autores. Esses resultados recentes lançam uma nova atenção à importância da caracterização do fenótipo *gun4* para a compreensão da função desse gene bem como para o entendimento da sinalização entre cloroplasto e núcleo. Nesse sentido, informações advindas da caracterização fisiológica de mutantes *gun* podem auxiliar na compreensão do controle genético da fotossíntese.

A compreensão das respostas de plantas ao estresse luminoso tem sido caracterizada com auxílio de mutantes e/ou plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*, sendo que aumentos substanciais nos conteúdos de carotenóides, rubisco e ATP sintase (Walters et al. 1999, 2003; Mullineaux et al. 2006; Bechtold et al. 2008), assim como aumentos na expressão de genes relacionados ao ciclo de Calvin e da glicólise, em detrimento de genes que codificam proteínas do complexo coletor de luz do FSII, têm sido comumente relatados (Piippo et al. 2006). Diante de altos níveis de luz, diversos mecanismos podem atuar no intuito de minimizar maiores danos foto-oxidativos, em que podem ocorrer movimentos cloroplastídicos, mudanças na posição, estequiometria e/ou atividade dos centros de reação e dos complexos coletores de luz dos fotossistemas assim como aumentos no transporte cíclico de elétrons, fotorrespiração e dissipação de energia na forma de calor (Miyake et al. 2004; Deming-Adams e Adams, 2006; Li et al. 2009; Frenkel et al. 2009).

Com o intuito de auxiliar na caracterização do fenótipo *gun4*, este trabalho utilizou ferramentas como genética reversa, que consiste em avaliar o fenótipo a partir de mudanças genotípicas, utilizando plantas mutantes para o gene *GUN4*, análise de trocas gasosas, fluorescência da clorofila-*a* bem como de análises sistêmicas (*in silico*) dos dados fotossintéticos gerados, de forma a integrar essas diferentes ferramentas com objetivo de obter uma caracterização do fenótipo desse mutante em resposta ao estresse luminoso.

As análises sistêmicas, oriundas da área Biologia de Sistemas, pertencem a uma metodologia de análise de dados pautada no princípio de que um fenótipo é o resultado da interação de suas partes, em contraponto à abordagem cartesiana clássica predominante, a qual acredita que a propriedade do todo é a soma de suas partes (Friboulet e Thomas, 2005; Palsson, 2005; Bruggeman et al. 2007; Lorenz et al. 2009), sendo, recentemente, aplicadas em estudos de fisiologia vegetal em diferentes contextos experimentais (Amzallag, 2000; Prado et al. 2004, Camargo-Bortolin et al. 2008; Souza et al. 2009). Nesse âmbito, as interações entre elementos de diferentes níveis escalares de organismos biológicos têm sido caracterizadas em redes (Ravasz et al. 2002; Almaas et al. 2004; Ihmels et al. 2004; Nikiforova e Willmitzer, 2007). No entanto, há poucas informações sobre estrutura, função e padrão de modulação de redes complexas, como as de plantas, uma vez que pouco se sabe sobre o funcionamento das diferentes sub-redes que compõem um indivíduo vegetal (Stelling et al. 2002; Bruggeman et al. 2007), sobretudo sob condições adversas, contexto no qual se insere esse trabalho.

Diante do exposto, esse trabalho objetivou caracterizar o mutante *gun4* de *Arabidopsis thaliana* em resposta ao estresse luminoso, evidenciando as respostas fotossintéticas desse genótipo, uma vez que as informações a respeito da caracterização fisiológica dos genótipos *GUN* são escassas, porém de grande relevância, visto a importância desses genes para o controle genético da fotossíntese. Nesse sentido, o

mutante *gun4* foi caracterizado como um fenótipo capaz de transferir mais eficientemente a luz absorvida para o processo fotossintético bem como de dissipar o excesso desta, resultando em um fenótipo potencialmente mais tolerante ao estresse luminoso.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material vegetal e condições de crescimento das plantas

Sementes do mutante *gun4* foram gentilmente cedidas pelos professores Gilberto Sachetto Martins (Universidade Federal do Rio de Janeiro) e Joanne Chory (Plant Biology Laboratory – Salk Institute).

As sementes dos genótipos selvagem (WT) (Ecotipo Columbia - Col-0) e mutante *gun4* foram esterilizadas por cinco minutos em álcool 70% + Tween 20 (0,04%), seguido de um minuto em álcool 100%, sendo cultivadas *in vitro*, em placas de petri contendo meio MS ½ força, onde permaneceram por cerca de 15 dias, quando então foram transplantadas para vasos de 0,1 L preenchidos com substrato comercial (Plantimax, Eucatex). Após, as plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura e umidade controlada em torno de 22°C e 70%, respectivamente, intensidade luminosa de 120 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoper\u00edodo de 14 h.

2.2 - Imposi\u00e7\u00e3o do estresse luminoso

O estresse luminoso foi imposto \u00e0s plantas por 14 ou 28 h com 800 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, caracterizando 1 ou 2 dias de estresse, respectivamente. Como fonte luminosa para a imposi\u00e7\u00e3o do estresse, utilizou-se lâmpadas de 1000 W, dispostas em sala com temperatura controlada, mantendo uma camada de \u00e1gua num recipiente transparente entre a fonte luminosa e as plantas, a fim de minimizar o excesso de calor gerado pelas lâmpadas.

2.3 - Caracterização dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila-*a* em diferentes condições de luz

A caracterização dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila-*a* foram feitas em folhas completamente expandidas de plantas de *Arabidopsis* (WT e *gun4*), com cerca de 30 dias de idade, em sala com temperatura controlada em torno de $22^{\circ}\text{C} \pm 3$. Os parâmetros ligados às trocas gasosas foram determinados entre 08:00 e 10:00 h dos dias amostrais a 0 e 14 h de $800 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilizando-se de um sistema de determinações da concentração de gases no infravermelho (IRGA, Li-cor Inc. LI-6400, Lincoln, EUA), com pinça e software específicos para *Arabidopsis thaliana*. Determinou-se a taxa de assimilação líquida de carbono (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração interna de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$) e transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sob concentrações de CO_2 , temperatura e vapor de água ambientes.

Os parâmetros de fluorescência da clorofila-*a* foram determinados com auxílio de fluorômetro de luz modulada (MINI-PAM) (Walz, Effeltrich, Germany). Dentre estes, as fluorescências mínima (F_o) e máxima (F_m) de folhas adaptadas ao escuro foram determinadas às 06:00 h dos dias amostrais. Determinou-se também o rendimento quântico potencial do FSII (F_v/F_m), fluorescência mínima estimada de folhas adaptadas à luz ($F_o' = F_o/(F_v/F_m + F_o/F_m')$), fluorescência máxima de folhas adaptadas à luz (F_m'), taxa aparente de transporte de elétrons ($\text{ETR} = \Phi_{\text{FSII}} \times \text{RFA} \times 0,5 \times 0,84$) (Genty et al. 1989), rendimento quântico efetivo do FSII (Φ_{FSII}), coeficiente de extinção fotoquímico ($q_L = (F_m' - F) \times F_o'/(F_m' - F_o') \times F$), coeficiente de extinção não-fotoquímico ($q_N = F_m - F_m'/F_v$), rendimento quântico da dissipação de energia regulada do FSII ($\Phi_{\text{NPQ}} = (F/F_m') - (F/F_m)$) e rendimento quântico da dissipação de energia não regulada do FSII ($\Phi_{\text{NO}} = F/F_m$). Os parâmetros de Φ_{NPQ} , Φ_{FSII} e Φ_{NO} foram calculados seguindo Genty et al. (1989) e Hendrickson et al. (2004), no qual $\Phi_{\text{NPQ}} + \Phi_{\text{FSII}} + \Phi_{\text{NO}} = 1$.

Os componentes do q_N , coeficientes de extinção dependente de energia (q_E), do estado de transição (q_T) e fotoinibitório (q_I), foram calculados seguindo Lichtenthaler et al. (2005) usando-se a cinética de relaxamento da fluorescência máxima da clorofila,

submetendo-se as folhas a pulsos de luz actínica saturante (1 s de $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) após 1 h de estresse luminoso ($1000 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) seguido de 1 , 5 e 20 min de adaptação ao escuro, em que foram obtidos os valores de $F_{m'1}$, $F_{m'5}$ e $F_{m'20}$, respectivamente. Diante desses valores, calculou-se nF_1 ($F_m - F_{m'1}$), nF_5 ($F_m - F_{m'5}$) e nF_{20} ($F_m - F_{m'20}$), utilizados para determinar os valores desses componentes (Tabela 4 – anexo), que foram expressos como porcentagem relativa ao valor de qN ($qN = qE + qT + qI$) (Lichtenthaler et al. 2005). A tabela 5 (em anexo) resume todas as fórmulas utilizadas para os cálculos dos parâmetros supracitados, com os referidos autores que as propuseram assim como a descrição de cada informação biológica neles contida.

Determinou-se, também via fluorômetro de pulso de luz modulado, a curva de resposta dos parâmetros de fluorescência da clorofila-*a* (ETR , Φ_{FII} , Φ_{NO} e qL) em respostas a oito níveis crescentes de luz actínica (0 , 80 , 160 , 260 , 370 , 560 , 800 , 1060 e $1660 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). No final de cada nível foi aplicado pulso de luz actínica saturante ($6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) após 45 s de aclimação àquelas irradiâncias.

2.4 - Análises do padrão de modulação das redes fotossintéticas

Para analisar os dados fotossintéticos sob um ponto de vista sistêmico, englobando-os em redes, seguiram-se as metodologias propostas por Amzallag (2001) e Souza et al. (2009), a fim de testar a hipótese se há correlação entre o grau de conectância das redes de trocas gasosas (R_{TG}) e fotoquímica (R_F) em resposta a quantidade de luz imposta.

Esses modelos de redes (Figura 2) são baseados na interação entre cada elemento, em que o grau de conectância entre estes é calculado com base no estudo comparativo da correlação de Pearson (r) entre cada par de constituinte da rede, avaliando o grau de associação relativo (conexão) entre dois elementos da rede (Souza e Buckeridge, 2004). Dessa forma, determinou-se a correlação de Pearson entre os pares $A-g_s$, $A-E$, $A-C_i$, C_i-g_s , C_i-E e g_s-E (Rede de trocas gasosas - R_{TG}), e $ETR-\Phi_{FII}$, $ETR-$

F_v/F_m , $ETR-qN$, $\Phi_{FSII}-F_v/F_m$, $\Phi_{FSII}-qN$ e F_v/F_m-qN (Rede Fotoquímica - R_F). Em seguida, os valores de (r) foram normalizados definindo para cada correlação um valor “ z ”, seguindo metodologia proposta por Amzallag (2001), com objetivo de obter a intensidade das relações entre os parâmetros analisados além de sua significância, em que:

$$z = 0,5 \times \ln \left[\frac{(1+r)}{(1-r)} \right]$$

Por fim, a conectância global (CG) de cada rede (R_F e R_{TG}) foi determinada pela média dos valores de z , correspondendo ao grau com o que os elementos das redes estão conectados (Souza e Buckeridge, 2004), em que:

$$CG_{TG} = ((z A-g_s) + (z A-E) + (z A-C_i) + (z C_i-g_s) + (z C_i-E) + (z g_s-E))/n$$

$$CG_F = ((z ETR-\Phi_{FSII}) + (z ETR-F_v/F_m) + (z ETR-qN) + (z \Phi_{FSII}-F_v/F_m) + (z \Phi_{FSII}-qN) + (z F_v/F_m-qN))/n$$

2.5 - Acúmulo de aldeído malônico (MDA) e pigmentos fotossintéticos

O acúmulo de aldeído malônico (MDA) foi estimado em folhas de *Arabidopsis* submetidas ao estresse luminoso, conforme Hodges et al (1999).

Clorofilas e carotenóides totais foram extraídos em acetona 80% (v/v) e os seus conteúdos determinados espectrofotometricamente, seguindo Lichtenthaler (1987).

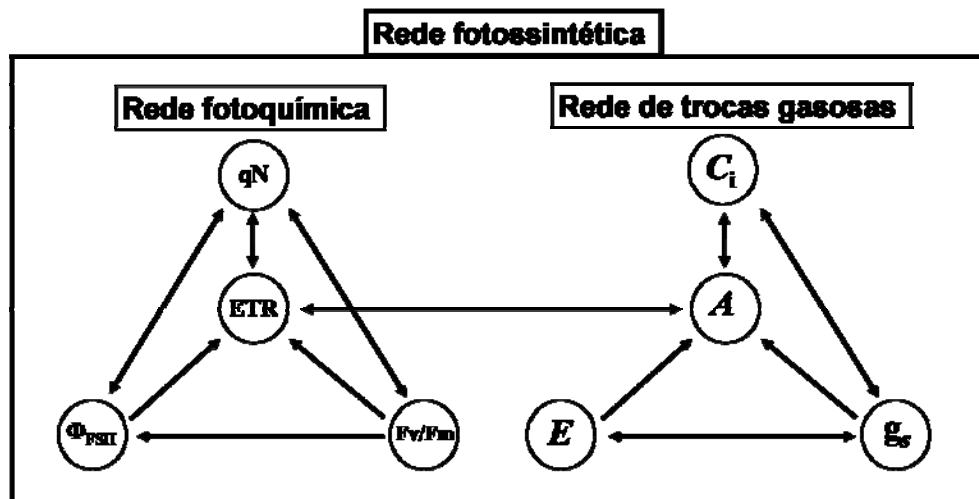


Figura 2. Padrões de conectância entre os elementos que constituem as redes fotoquímica (R_F) e de trocas gasosas (R_{TG}) deste estudo. As setas indicam possíveis retro-alimentações (*feedback*) entre cada parâmetro de cada rede e entre as redes. ETR - taxa de transporte de elétrons, qN - coeficiente de extinção não-fotoquímico, F_v/F_m - eficiência quântica potencial do fotossistema II, Φ_{PSII} - eficiência quântica efetiva do fotossistema II, A - assimilação líquida de CO_2 , g_s - condutância estomática, C_i - concentração intercelular de CO_2 , E - taxa de transpiração. Baseado em Souza et al. (2009).

2.6 - Determinação de fluxos metabólicos em folhas expostas a $^{14}CO_2$

A determinação de fluxos metabólicos foi realizada pela exposição de folhas de *Arabidopsis* (WT ou *gun4*) a $^{14}CO_2$ em um eletrodo de oxigênio (Hansatech, Kings Lynn, UK), sob intensidade luminosa de $400 \mu mol \text{ fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a $25^\circ C$, por 60 minutos. Foram realizadas seis repetições para cada genótipo. A preparação da solução radioativa contendo o ^{14}C bem como a exposição dos materiais vegetais a esta foram realizadas seguindo a metodologia descrita em DaMatta et al. (2008). Logo após, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, sendo armazenadas a $-80^\circ C$. As extrações em soluções etanólicas bem como as determinações dos fluxos de síntese de sacarose, parede celular, aminoácidos e açúcares foram realizadas conforme descrito por DaMatta et al. (2008). A radioatividade incorporada foi determinada usando-se de um analisador de cintilação líquida (Beckman LS 6500; Beckman Instruments, Fullerton, CA, EUA).

2.7 - Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram realizados em fatorial, com dois genótipos (WT e *gun4*), dois e três níveis de estresse luminoso para as análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila-*a*, respectivamente, com cinco repetições para cada genótipo. As concentrações de MDA e de pigmentos fotossintéticos, a curva de fluorescência da clorofila-*a* em resposta à luz bem como a análise de fluxo metabólico foram realizadas com seis repetições. Os resultados entre os genótipos foram comparados por teste-t com nível de significância de 5%. Dentro de cada genótipo, os dados foram submetidos à análise de variância seguida do teste Dunnet a 5%, com auxílio do programa SAEG (SAEG, 2007).

3 - RESULTADOS

3.1 – Concentração de pigmentos

O mutante *gun4* apresentou um fenótipo de plantas com folhas amareladas (Figura 11 - anexo), resultado dos menores teores de clorofilas (Tabela 1). Não foram observadas diferenças estatísticas dentro de cada genótipo após 14 h de estresse, no entanto, *gun4* ainda apresentou menores concentrações de clorofilas (Chl-b e Chl-a+b) e carotenóides em relação ao WT (Tabela 1).

A concentração de carotenóides foi pouco influenciada pelos tratamentos luminosos, já que não houve diferenças estatísticas dentro dos genótipos, porém diferiu estatisticamente entre os genótipos a 0 e 14 h de estresse. Em contrapartida, as concentrações de clorofilas apresentaram reduções significativas em ambos genótipos após 28 h de estresse de luminoso, com exceção de clorofila-b em *gun4* (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios e erro padrão do acúmulo de clorofilas (Chl) e carotenóides (Carot) (g kg^{-1} matéria fresca), em plantas selvagem (WT) e mutante (*gun4*) de *Arabidopsis thaliana* sob 0, 14 ou 28 h de estresse.

	WT			<i>gun4</i>		
	0	14	28	0	14	28
Chl-a	<u>5,86^A</u>	4,10 ^A	2,04 ^B	4,73 ^A	4,53 ^A	2,81 ^B
	±0,19	±0,37	±0,23	±0,34	±0,33	±0,56
Chl-b	<u>2,37^A</u>	<u>2,22^A</u>	1,17 ^B	1,56 ^A	0,95 ^A	0,94 ^A
	±0,10	±0,25	±0,12	±0,12	±0,13	±0,18
Chl-a+b	<u>8,23^A</u>	<u>7,06^A</u>	<u>5,36^B</u>	6,30 ^A	5,48 ^A	3,76 ^B
	±0,29	±0,52	±0,49	±0,4	±0,30	±0,49
Carot	<u>1,13^A</u>	<u>1,27^A</u>	0,90 ^A	0,83 ^A	0,60 ^A	0,79 ^A
	±0,04	±0,2	±0,36	±0,05	±0,2	±0,25

Diferentes letras, nas linhas, denotam diferença estatística entre os níveis de estresse dentro de cada genótipo (teste de Dunnet, $p < 0,05$). Valores sublinhados indicam diferença estatística entre os genótipos dentro do mesmo tratamento (teste-t, $p < 0,05$). (n=6).

3.2 - Efeito do estresse luminoso nas trocas gasosas

Entre os genótipos, na ausência de estresse luminoso, o mutante *gun4* apresentou menores valores de A (43%), g_s (61%) e E (46%), mas sem alterações na razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a), quando comparado com plantas selvagem (WT) (Figura 3). Para um mesmo genótipo, não foram observadas diferenças significativas na taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (g_s) e taxa de transpiração após 14 h sob estresse.

Após 14 h de estresse, apenas g_s se manteve diferente entre os genótipos. Em adição, devido a baixa magnitude de g_s encontrada nas plantas *gun4*, a razão A/g_s (eficiência intrínseca do uso da água - E_{ia}) mostrou valores significativamente maiores em comparação ao WT (Figura 12 - Anexo), sendo 30% e 36% maior sob 0 e 14 h de estresse, respectivamente.

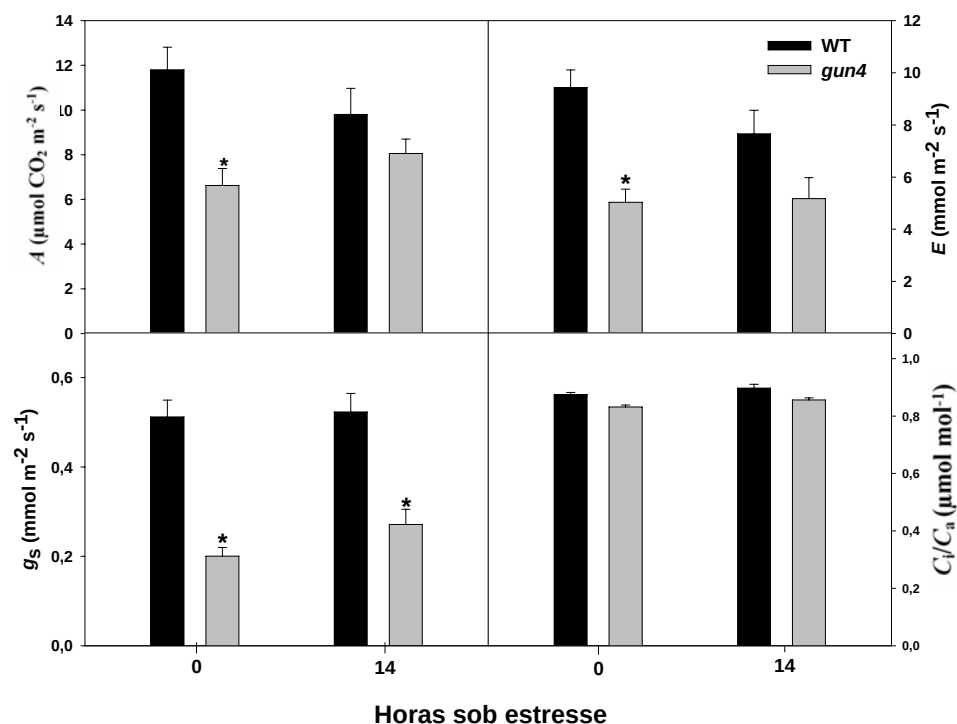


Figura 3. Valores médios e erro padrão da taxa de assimilação líquida de carbono (A), taxa de transpiração (E), condutância estomática (g_s) e razão entre a concentração interna (C_i) e ambiente (C_a) de CO_2 em *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante *gun4*. Asterisco (*) indica diferença estatística entre os genótipos (teste-t, $p < 0,05$). ($n=5$).

3.3 - Fluxo metabólico fotossintético

Sob as condições de saturação de CO_2 , utilizadas em experimentos de fluxo metabólico, a taxa de absorção total de $^{14}\text{CO}_2$ em folhas de *Arabidopsis* completamente expandidas não diferiu entre WT e *gun4* (Tabela 2). A partição do ^{14}C não diferiu significativamente entre os genótipos, exceto para a síntese de ácidos orgânicos (fração aniônica), porquanto o fluxo para essa fração foi de 4,88% em plantas selvagens e de 3,52% em *gun4* (Tabela 2).

Em ambos genótipos, o ^{14}C foi redistribuído preferencialmente à fração solúvel total (ST; 60%), quando comparada à insolúvel (amido e parede celular; 37% em média), sendo que, por volta de 50% do fluxo à fração solúvel correspondeu à síntese de açúcares (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios e erro padrão da absorção total e partição do $^{14}\text{CO}_2$ em *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*gun4*).

Parâmetro	Genótipo	
	WT	<i>gun4</i>
Absorção Total (Bq g^{-1})	5.376,1 $\pm$ 279	5.884,1 $\pm$ 293
<i>Redistribuição do ^{14}C assimilado (% do total)</i>		
Amido e parede celular	36,27 $\pm$ 2,99	39,05 $\pm$ 2,84
Açúcares	51,70 $\pm$ 2,35	50,50 $\pm$ 2,83
Aminoácidos Básicos	7,16 $\pm$ 0,34	6,93 $\pm$ 0,54
Ácidos orgânicos	4,88* $\pm$ 0,48	3,52 $\pm$ 0,38
Erro	0,23	0,22

Estatística conforme Figura 3. (n=6)

3.4 - Efeito do estresse luminoso sobre a fluorescência da clorofila-*a* e nível de dano oxidativo

Os dados de fluorescência da clorofila-*a* sugerem que o tempo de exposição dos genótipos à alta irradiância foi suficiente para produzir um estresse luminoso, uma vez que 14 h de exposição nessas condições acarretaram uma clara redução em F_m , ETR e qL em ambos os genótipos, com diferenças ainda maiores sob 28 h de estresse (Figuras 4, 5 e 13, em anexo).

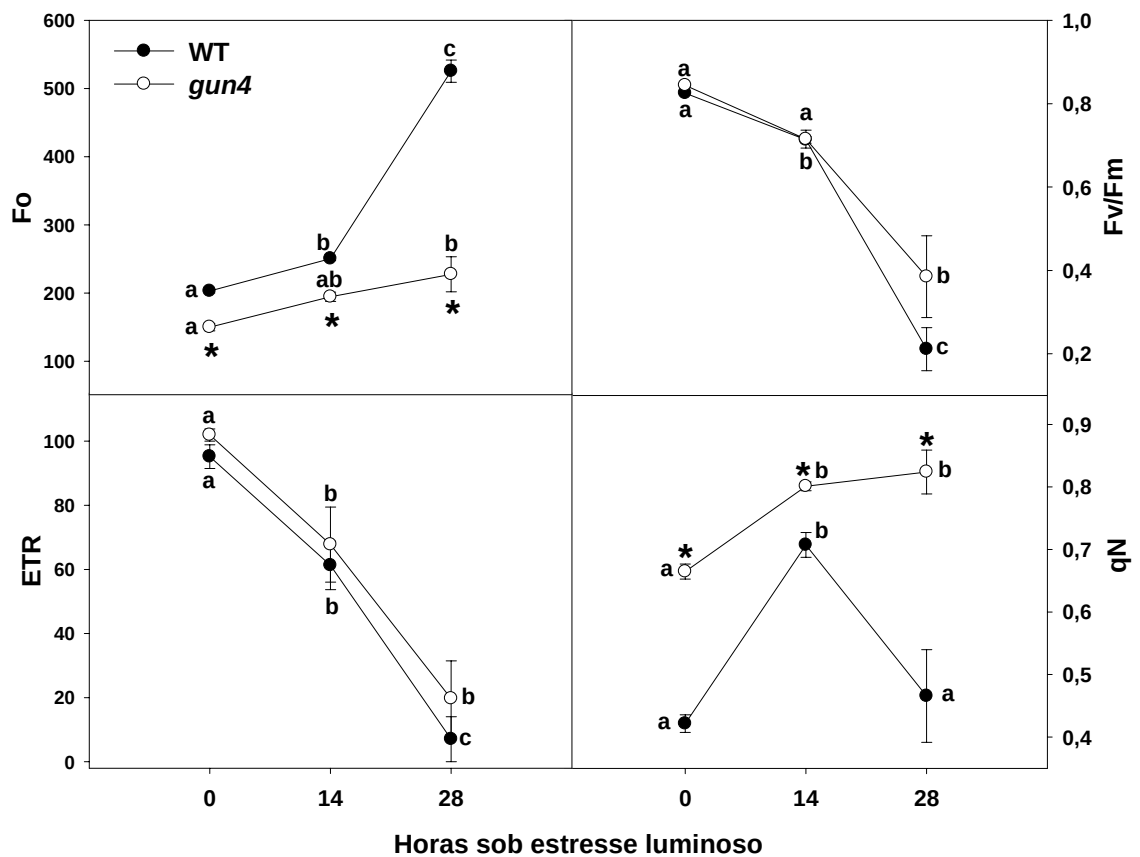


Figura 4. Valores médios e erro padrão de parâmetros de fluorescência da clorofila-*a* em plantas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante *gun4* em resposta ao estresse luminoso. Fluorescência mínima em folhas adaptadas ao escuro (F_o), rendimento quântico máximo potencial do FSII (F_v/F_m), taxa de transporte de elétrons (ETR) e coeficiente de extinção não-fotoquímico (qN). Dentro de cada genótipo, valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si (teste de Dunnett, $p < 0,05$). Asterisco (*) indica diferença significativa entre os genótipos dentro de cada nível de estresse (teste-t, $p < 0,05$). ($n=5$).

Nas plantas *gun4* foram observados menores valores de F_o (26%, 22% e 57%) (Figura 4) e F_m (18%, 21% e 38%) (Figura 13, em anexo) sob 0, 14 e 28 h de estresse, respectivamente, em relação às plantas WT. Ressalta-se que, apesar de as plantas *gun4* apresentarem menor taxa de fotossíntese líquida e clorofila, apresentaram maiores valores de coeficiente de extinção fotoquímico (qL), rendimento quântico efetivo do FSII (Φ_{FSII}), rendimento quântico da dissipação de energia regulada no FSII (Φ_{NPQ}) (20%, 11%, e 15%, respectivamente) e valores significativamente menores de rendimento quântico da dissipação de energia não regulada no FSII (Φ_{NO}) (32%) (Figura 5).

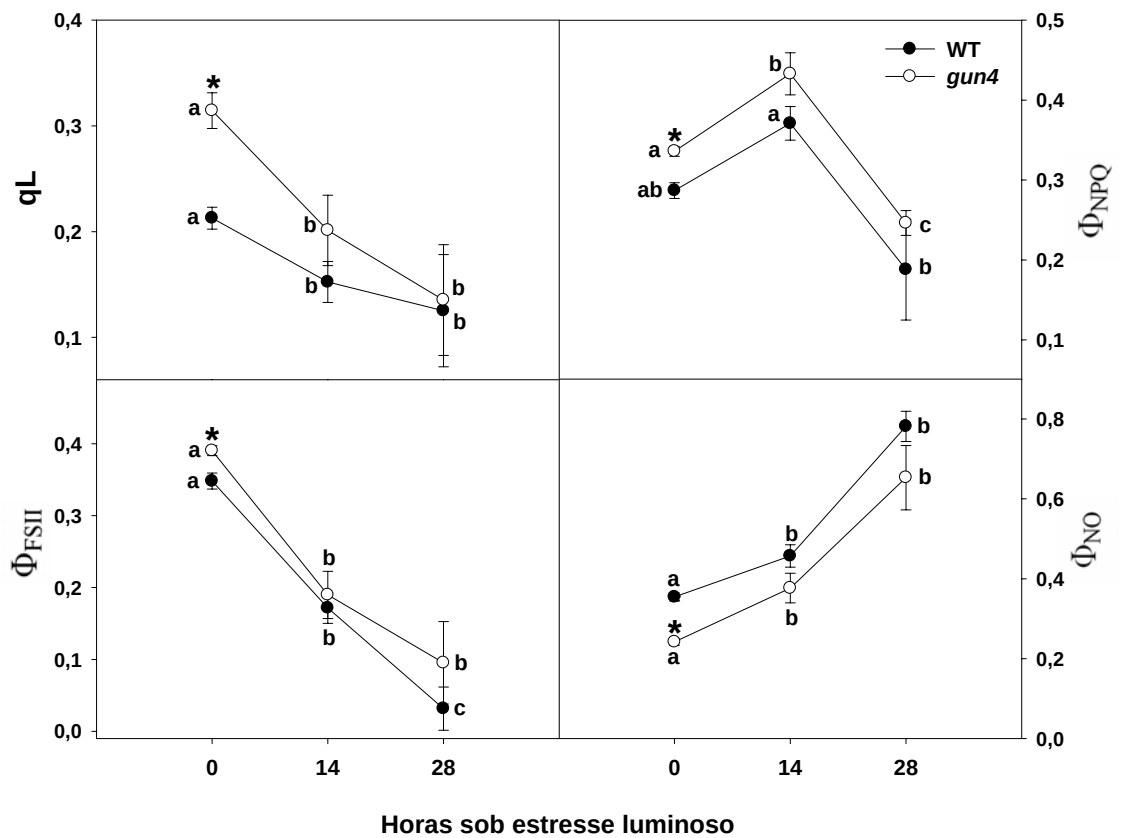


Figura 5. Valores médios e erro padrão do coeficiente de extinção fotoquímico (q_L), rendimento quântico da dissipação de energia regulada no FSII (Φ_{NPQ}), rendimento quântico efetivo do FSII (Φ_{FSII}) e rendimento quântico da dissipação de energia não regulada no FSII (Φ_{NO}) nos genótipos selvagem (WT) e mutante *gun4* sob diferentes níveis de estresse luminoso. Detalhes das análises estatísticas são descritas na Figura 4. (n=5).

A dissipação não fotoquímica da energia luminosa (q_N) diferiu estatisticamente entre os genótipos nos diferentes tratamentos (Figura 4), sendo que a maior dissipação encontrada no mutante *gun4* foi associada a maiores valores do coeficiente de extinção fotoinibitório (q_I) e menores valores do coeficiente de extinção dependente de energia (q_E) (Figura 6). Não foram observadas diferenças no coeficiente de extinção do estado de transição (q_T) entre os genótipos.

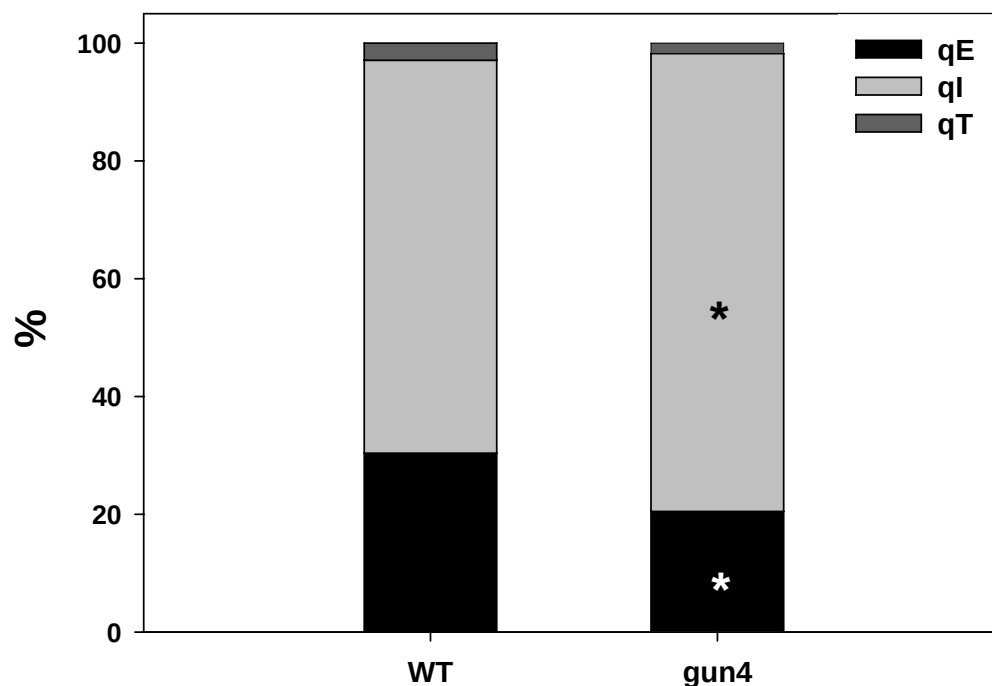


Figura 6. Contribuição relativa dos coeficientes de extinção dependente de energia (qE), do estado de transição (qT) e fotoinibitório (qI) para a dissipação não fotoquímica em plantas selvagem (WT) e no mutante *gun4*. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os genótipos (teste-t, $p > 0,05$). (n=5).

Quando os parâmetros de fluorescência são analisados em resposta a diferentes intensidades de radiação fotossinteticamente ativa (RFA), diferenças significativas foram encontradas entre os genótipos para ETR, Φ_{FSII} e Φ_{NO} em quase todas as intensidades luminosas analisadas (Figura 7). No que concerne ao qL, maiores valores médios foram encontrados nas plantas *gun4*, porém sendo significativamente apenas sob $80 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Com relação ao ac\u00famulo de MDA, foi poss\u00edvel observar que o aumento no n\u00edvel de dano oxidativo, para ambos os gen\u00f3tipos, somente foi significativo ap\u00f3s 28 h sob alta intensidade luminosa. N\u00e3o foram observadas diferen\u00e7as significativas entre os gen\u00f3tipos quanto \u00e0 concentra\u00e7\u00e3o de MDA nos diferentes per\u00edodos sob estresse (Figura 8).

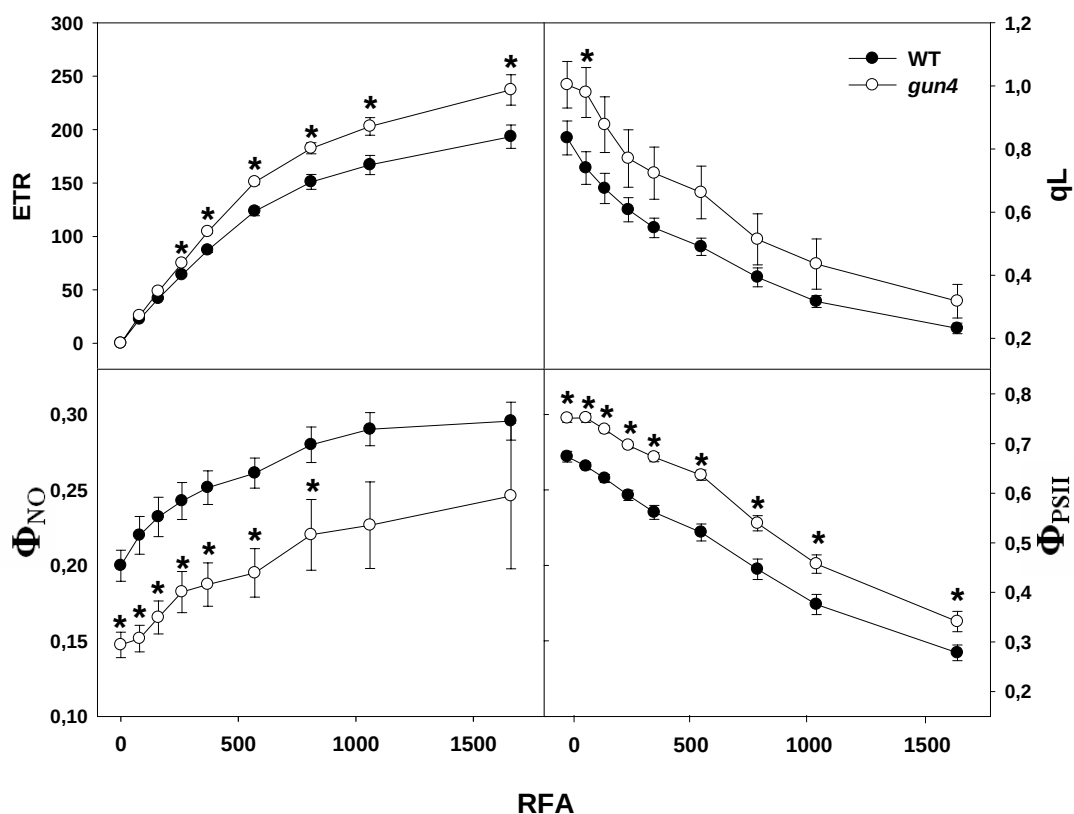


Figura 7. Valores médios e erro padrão da taxa de transporte de elétrons (ETR), coeficiente de extinção fotoquímico (q_L), rendimento quântico da dissipação de energia não regulada no FSII (Φ_{NO}) e rendimento quântico efetivo do FSII (Φ_{PSII}) ao longo do gradiente de radiação fotossinteticamente ativa (RFA). Asterisco (*) indica diferença significativa entre os genótipos em cada ponto da curva de luz (teste-t, $p < 0,05$). (n=6).

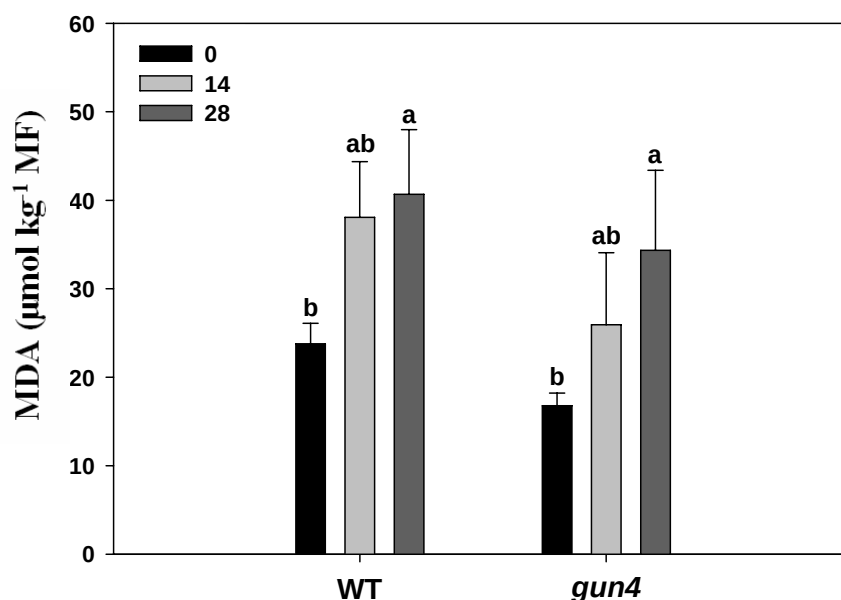


Figura 8. Valores médios e erro padrão do acúmulo de aldeído malônico (MDA) ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca - MF), em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*gun4*) submetidas a 0, 14 ou 28 h de estresse luminoso. Dentro de cada genótipo, valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si (teste de Dunnet, $p < 0,05$). (n=6).

3.5 - Padrão de conectância das redes fotossintéticas de acordo com as diferentes condições de luz impostas

O padrão de modulação das redes fotoquímica (R_F) e de trocas gasosas (R_{TG}) demonstrou uma relação diretamente proporcional entre a conectância global (CG) dessas redes e o nível de luz imposto às plantas, uma vez que, após 14 h sob $800 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os valores de CG_{TG} e CG_F tiveram um aumento de, respectivamente, 8% e 60% nas plantas WT, e de 37% e 60% no genótipo *gun4* (Figura 9). Observaram-se, também, diferenças entre os genótipos em relação à CG_{TG} (após 14 h de estresse) e CG_F (após 28 h de estresse), sendo a magnitude destas da ordem de 33% e 48%, respectivamente (Figura 9).

Os valores das correlações de Pearson entre $F_v/F_m - \Phi_{FSII}$ e $F_v/F_m - \text{ETR}$ foram determinantes para o padrão de modulação da R_F , apresentando o mesmo comportamento da CG_F em ambos os genótipos (Tabela 3 - Anexo). Nesse contexto, as diferenças relatadas na CG_{TG} em resposta ao aumento do nível de estresse foram definidas, principalmente, pelas correlações entre $A-g_s$, já que estes valores se correlacionaram significativamente e se mantiveram acima de 0,84 após 14 h de estresse em *gun4* (Tabela 4 - Anexo).

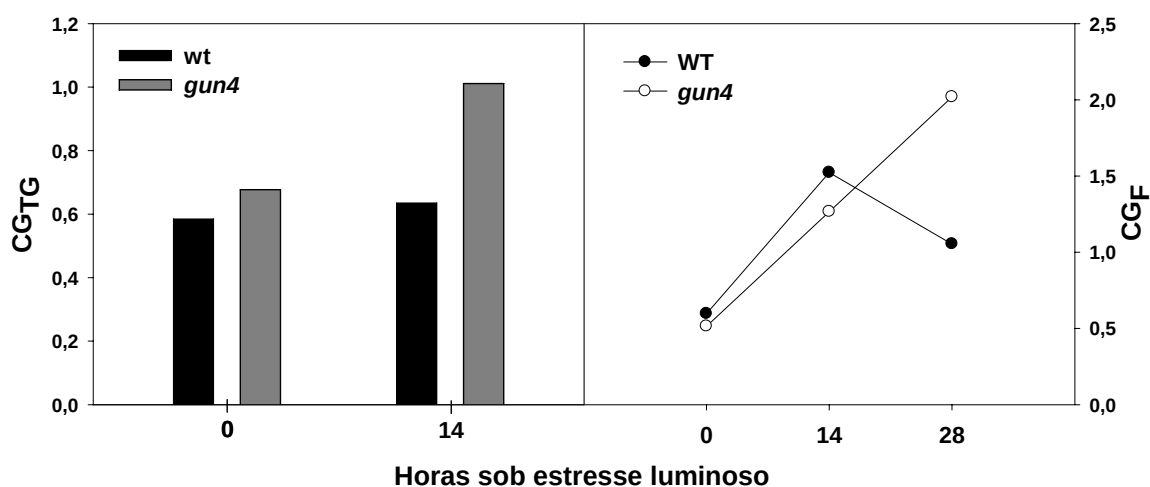


Figura 9. Conectância global das redes fotoquímica (CG_F) e de trocas gasosas (CG_{TG}) nos genótipos WT e *gun4* sob diferentes níveis de estresse luminoso.

4 - DISCUSSÃO

4.1 - Caracterização fotossintética do mutante *gun4*

A manutenção do crescimento de plantas sujeitas a quantidades excessivas de luz tem sido relatada, principalmente, como resultado do aumento da capacidade fotossintética da planta e/ou mediante a ativação de vias de dissipação do excesso de energia absorvida, estratégias para reduzir a susceptibilidade a danos foto-oxidativos (Apel e Hirt, 2004; Walters, 2005). Dentro dessa perspectiva, as análises de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila-*a* vêm sendo largamente utilizadas como bons indicadores do nível de estresse ao qual o organismo vegetal está submetido (Bolhàr-Nordenkamp e Öquist, 1993; Lichtenthaler e Miehe, 1997; Maxwell e Johnson, 2000; Broetto et al. 2007).

No que concerne às trocas gasosas, os altos valores de C_i encontrados em ambos genótipos (cerca de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ - dados não mostrados) se devem, provavelmente, ao ambiente em que as análises foram realizadas, não sendo, pois, um parâmetro confiável, nesse estudo, para indicar se houve ou não restrição ao influxo de CO_2 para o interior da folha. Ademais, ressalta-se que não houve diferença entre os genótipos na capacidade de fixação do $^{14}\text{CO}_2$ (Tabela 2), sugerindo que a menor magnitude de *A* encontrada em *gun4* na ausência de estresse, pode estar relacionada a uma limitação difusional e não bioquímica.

Os menores valores de F_o sob 0, 14 ou 28 h de estresse luminoso (Figura 4) refletem o efeito do menor conteúdo de Clorofilas *a* e *b* encontrados em *gun4*, e, conseqüentemente, em uma menor capacidade de absorção de energia luminosa desse genótipo, fruto, possivelmente, de um menor acúmulo do complexo antena do FSII. Há evidências em plantas e cianobactérias de que mutantes para genes que codificam enzimas da rota biossintética de clorofilas, que, como *gun4*, possuem menor nível de clorofila, apresentam fenótipo com menores acúmulos de componentes do complexo-

antena e subunidades do fotossistema II (Havaux et al. 2007; Sobotka et al. 2008; Hansson e Jensen, 2009).

O genótipo *gun4* apresentou maior número de centros de reação do FSII abertos (maiores valores de qL) e maior rendimento quântico da conversão fotoquímica da energia absorvida no FSII (Φ_{FSII}) na ausência de estresse (Figuras 5 e 7), sugerindo que, apesar das plantas *gun4* apresentarem menor capacidade de absorver luz pela sua deficiência em pigmentos fotossintéticos, essas apresentam maior eficiência de utilização da luz absorvida, indicando uma flexibilidade do FSII em compensar a redução no nível total de luz absorvida nesse fotossistema. De maneira similar, Hansson e Jensen (2009), analisando o mutante para o gene *chl27* (Figura 1), demonstraram que a sua capacidade restrita de biossíntese de clorofila resulta em uma redução de 30% e 50% no conteúdo dos complexos coletores de luz dos FSI (LHCI) e FSII (LHCII), respectivamente, porém a razão F_v/F_m e o rendimento quântico do FSI foram maiores em *chl27*.

Os decréscimos em F_m e F_v/F_m e o aumento em F_o em ambos genótipos, após estresse luminoso (Figuras 4 e 13, em anexo), sugerem efeitos fotoinibitórios sobre o aparato fotoquímico (Maxwell e Johnson, 2000; Müller et al. 2001), sendo que o aumento em F_o pode estar relacionado a danos nos centros de reação ou no complexo coletor de luz do FSII (Demmig-Adams e Adams, 1992; Bolhàr-Nordenkamp e Öquist, 1993). No entanto, considerando que o decréscimo em F_v/F_m e o aumento em F_o foram maiores em WT após 14 ou 28 h de estresse luminoso, sugerem que os danos oxidativos sejam menores nas plantas mutantes, que pode ser devido a menor quantidade de luz absorvida. Em adição, nota-se que o genótipo WT apresentou um aumento em qN após 14 h de estresse, porém não demonstrou este comportamento após 28 h, ao contrário das plantas *gun4*, o que sugere, novamente, maiores danos foto-oxidativos em WT, embora

não tenham sido detectadas diferenças nos níveis de MDA entre os genótipos (Figura 8).

A ocorrência ou não de fotoinibição não pode ser determinada somente pelo declínio na razão F_v/F_m , sendo que os valores do coeficiente de extinção fotoinibitório (q_l) são mais precisos no que concerne ao nível de foto-dano (Lichtenthaler et al. 2005) ou de fotoproteção do FSII (Maxwell e Johnson, 2000). Considerando que o mutante absorve menores quantidades de luz e possui maior capacidade em dissipar energia na forma de calor, não é sustentável a hipótese de que estas plantas teriam um maior dano fotoquímico no FSII, mas sim, que teriam um mecanismo protetor mais eficiente em dissipar o excesso de energia não absorvido. Essa poderia ser mais uma razão que permitiria uma maior eficiência fotoquímica observada em *gun4*, evitando danos que poderiam comprometer o desempenho fotossintético.

Os danos induzidos por estresse luminoso podem ser evidenciados em aumentos no rendimento quântico de dissipação constitutiva de energia (Φ_{NO}) (Klughammer e Schreiber, 2008), fato observado em ambos genótipos após 14 ou 28 h de estresse. Nesse contexto, as plantas *gun4* apresentaram Φ_{NO} menor do que plantas WT na ausência de estresse (Figura 5) e sob diferentes intensidades luminosas (Figura 7). Essa redução na perda constitutiva de energia dissipada pode ser mais uma das causas para a maior eficiência da conversão fotoquímica nas plantas *gun4*, reduzindo a quantidade de energia dissipada constitutivamente, de forma a melhor utilizá-la nas reações fotoquímicas.

Recentemente, Havaux et al. (2007) demonstraram que o mutante *chl* de *Arabidopsis*, genótipo que também apresenta menor conteúdo de clorofila, possui reduções no acúmulo de proteínas do complexo LHCII (proteínas *LHCII-B*), porém com maior acúmulo de algumas proteínas específicas desse grupo, como *LHCII-B5*. Nesse contexto, inúmeros trabalhos têm demonstrado que os genótipos *gun* possuem maiores

níveis de expressão do gene *Lhcb1* (La Rocca et al. 2001; Mochizuki et al. 2001; Strand et al. 2003; Nott et al. 2006), que codifica uma proteína relacionada à transferência de energia para os centros de reação do FSII (Teramoto et al. 2001, 2002), o que poderia, por uma razão ainda desconhecida, contribuir para a maior capacidade de *gun4* em transferir energia luminosa para o processo fotossintético. Essa hipótese se baseia no fato de que maiores níveis de *Lhcb1* poderiam otimizar a transferência da energia absorvida no LHCII para os centros de reação, permitindo, assim, maior conversão de energia por fóton absorvido no FSII.

Os maiores valores encontrados em *gun4* para qN e Φ_{NPQ} sob diferentes condições de luz (Figuras 4 e 5) indicam que o mutante possui maior capacidade de dissipar energia térmica não utilizada nas reações fotoquímicas. Essa diferença na dissipação não fotoquímica sugere um mecanismo de aclimação em *gun4*, de forma a permitir melhor integridade dos fotossistemas, também contribuindo para a maior eficiência quântica de conversão fotoquímica da energia absorvida (Φ_{FSII}).

O menor valor do coeficiente de extinção dependente de energia (qE) em *gun4* pode estar relacionado a uma menor variação de pH (ΔpH) no lúmen do cloroplasto destas plantas, pois o qE está associado a processos regulados por xantofilas que reduziram essa ΔpH (Pérez-Bueno et al. 2008; Frenkel et al. 2009). Além disso, evidências apresentadas por Zulfugarov et al. (2007) e Pérez-Bueno et al. (2008) apontam que a magnitude de qE pode estar relacionada ao tamanho do LHCII, em que a diminuição desse complexo se correlaciona com menor qE , devido à redução de funções fotoprotetoras oriundas da ligação de proteínas que compõem o LHCII com xantofilas, o que pode explicar os menores valores de qE em *gun4*, visto o menor conteúdo de carotenóides e o possível menor complexo antena desse genótipo. Diante disso, espera-se que a dissipação do excesso de energia em *gun4* seja mediante mecanismos independentes dessa ΔpH , possivelmente por mudanças conformacionais na estrutura ou

composição do LHCII, que geram um mecanismo de dissipação em que a energia é transferida diretamente da clorofila-*a* para carotenóides (Dall'Osto et al. 2005; Ruban et al. 2007; Pérez-Bueno et al. 2008; Johnson et al. 2009).

Devido a maior eficiência em dissipar energia na forma de calor observada em *gun4*, esperava-se que as plantas desse genótipo apresentassem maiores valores de carotenóides totais, já que são pigmentos que auxiliam no processo de dissipação do excesso de energia absorvida (Jarvis, 2001; Schulze et al. 2005). Não obstante, esse mutante demonstrou valor significativamente menor de carotenóides sob 0 e 14 h de estresse, similarmente ao demonstrado por Wu et al. (2007) em mutantes de *Oryza sativa* para o gene *YGL1* (Figura 1), sugerindo que a dissipação do excesso de energia em *gun4* pode não estar associada ao conteúdo total de carotenóides, e sim na razão carotenóides/LHCII, pois apesar da concentração de carotenóides totais ser menor em *gun4*, possivelmente seja suficiente para dissipar eficientemente a menor quantidade de luz absorvida pelo LHCII.

Os parâmetros de fluorescência da clorofila-*a* permitiram uma mais complexa diferenciação do comportamento fisiológico do mutante *gun4*, ilustrando a presença de um mecanismo adaptativo à menor captação de luz, que pode ter relevância fisiológica também em plantas selvagem, uma vez que a caracterização dos mecanismos que permitem uma flexibilidade da atuação dos complexos fotoquímicos dos tilacóides é um importante assunto para compreender a tolerância das plantas aos estresses abióticos.

4.2 - Análises sistêmicas dos dados fotossintéticos

Em geral, os sistemas biológicos têm a capacidade de modular a conectância global (CG) de suas redes de acordo com as condições ambientais, de forma a otimizar a manutenção da capacidade de crescimento, defesa e/ou reprodução sob uma grande diversidade de condições ambientais (Amzallag, 2001; Barabási e Oltvai, 2004). Em adição, Amzallag (2001) demonstrou que alguns efeitos fisiológicos podem ser

revelados apenas após a análise do padrão de modulação de CG da rede, não sendo detectados nos valores médios.

As maiores capacidades do genótipo *gun4* em transferir a energia luminosa absorvida para o processo fotossintético bem como a de dissipar a energia excedente pode ser devido, também, à maior capacidade desse genótipo em ajustar suas redes fotoquímica (R_F) e de trocas gasosas (R_{TG}) em resposta a condições de luz potencialmente estressantes, uma vez que redes com maior CG estariam relacionadas com maior capacidade homeostática do sistema e flexibilidade de resposta (aclimatação) às perturbações, por possibilitar implementar ajustes mais rápidos e mais “precisos” em resposta às condições adversas (Souza e Oliveira, 2004; Souza et al. 2005).

O maior ajuste na conectância global da R_{TG} (CG_{TG}) após 14 h de estresse encontrado em *gun4* (Figura 9) deve-se, possivelmente, a um alto controle de g_s sobre A , evidenciados pelos coeficiente de correlação entre essas variáveis (Tabela 4, em anexo).

Estudo desenvolvido por Souza et al. (2009), utilizando modelos de R_F e R_{TG} similares aos deste estudo, demonstraram resultados semelhantes aos encontrados, em que a CG destas redes sofreram forte influência das condições adversas impostas. Esses conjuntos de dados reforçam a hipótese de que pode haver um padrão de resposta aos diferentes tipos estresse através da modulação das redes fotossintéticas, demonstrando que essas análises podem auxiliar para averiguar o nível de estresse o qual o indivíduo vegetal está submetido.

5 - CONCLUSÃO

Analisando conjuntamente os dados de fluorescência da clorofila-*a*, percebe-se que o mutante *gun4* se caracteriza como um fenótipo capaz de: (i) absorver menos energia luminosa, demonstrado pelos menores valores de F_o , provavelmente devido aos menores níveis de clorofilas e menor complexo antena; (ii) transferir mais eficientemente a energia absorvida para o processo fotossintético, evidenciado nos maiores valores de q_L e Φ_{FSII} na ausência de estresse e de ETR e Φ_{FSII} sob diferentes intensidades de luz; e (iii) sob condições normais, ou mais notoriamente sob estresse luminoso, dissipar mais energia não absorvida nas reações fotoquímicas na forma de calor, demonstrado pelos maiores valores de q_N e Φ_{NPQ} .

O fato do fenótipo apresentado por *gun4* diferir de outros mutantes com reduções também drásticas no teor de clorofilas, indica que os resultados encontrados nesse trabalho não podem ser explicados unicamente pela redução no conteúdo de clorofilas. Em adição, as alterações fotossintéticas encontradas em *gun4* podem refletir uma aclimação do LHCII desse genótipo de forma a compensar a menor capacidade em absorver luz, aumentando a eficiência dos processos de transferência da energia luminosa, o que contribuiu para um maior controle das redes fotossintéticas em resposta ao estresse luminoso.

Embora ainda especulativo, mudanças na composição das antenas fotossintéticas, ou alteração na conformação ou mobilidade das proteínas componentes das mesmas em resposta, por exemplo, a alterações nos seus padrões de fosforilação e protonação, podem auxiliar para uma maior eficiência fotoquímica assim como para maior dissipação de energia em *gun4*.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almaas, E, Kovács, B; Vicsek, T; Oltvai, ZN; Barabási, AL. 2004. Global organization of metabolic fluxes in the bacterium *Escherichia coli*. *Nature*, 427: 839-843.
- Amzallag, GN. 2000. Connectance in Sorghum development: beyond the genotype-phenotype duality. *BioSystems*, 56:1-11.
- Amzallag, GN. 2001. Data analysis in plant physiology: are we missing the reality? *Plant Cell Environ*, 24, 881-890.
- Ankele, E; Kindgren, P; Pesquet, E; Strand, A. 2007. In Vivo Visualization of Mg-ProtoporphyrinIX, a Coordinator of Photosynthetic Gene Expression in the Nucleus and the Chloroplast. *Plant Cell*, 19: 1964–1979.
- Apel, K; Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55:373–99.
- Baker, NR; Harbinson, J; Kramer, DM. 2007. Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. *Plant Cell Environ*, 30: 1107–1125.
- Barabási, AL; Oltvai, ZN. 2004. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature*, 5: 101-105.
- Bilger, W; Björkman, O. 1990. Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth Res*, 25: 173-185.
- Bilger, W; Schreiber, U. 1986. Energy-dependent quenching of dark level chlorophyll fluorescence in intact leaves. *Photosynth Res*, 10: 303-308.
- Bolhàr-Nordenkamp, HR; Öquist, GO. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Hall, DO; Scurlock, JMO; Bolhàr-Nordenkamp, HR; Leegood, RC; Long, SP (eds.). *Photosynthesis and production in a changing environment*. Chapman & Hall, London, pp. 193-205.

- Broetto, F; Duarte, HM; Lüttge, U. 2007. Responses of chlorophyll fluorescence parameters of the facultative halophyte and C3–CAM intermediate species *Mesembryanthemum crystallinum* to salinity and high irradiance stress. *J Plant Physiol*, 164: 904-912.
- Bruce, D; Samson, G; Carpenter, C. 1997. The origins of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in photosynthesis. Direct coeficiente de extinção by P680⁺ in photosystem II enriched membranes at low pH. *Biochem*, 36: 749-755.
- Bruggeman, FJ; Hornberg, JJ; Boogerd, FC; Westerhoff, HV. 2007. Introduction to systems biology In: Baginsky, S; Fernie, AR. *Plant Systems Biology*. Birkhäuser Verlag. Berlin.
- Camargo-Bortolin, LHG; Prado, CHBA; Souza, GM; Novaes, P. 2008. Autonomy and network modulation of photosynthesis and water relations of *Coffea arabica* in the field. *Braz J Plant Physiol*, 20(2): 141-151.
- Dall'Osto, L; Caffarri, S; Bassi, R. 2005. A mechanism of non photochemical energy dissipation, independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna protein CP26. *Plant Cell*, 17: 1217–1232.
- DaMatta, FM; Cunha, RL; Antunes, WC; Martins, SCV; Araujo, WL; Fernie, AR; Moraes, GABK. 2008. In field-grown coffee trees source–sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function. *New Phytol*, 178: 348–357.
- Davison, PA; Schubert, HL; Reid, JD; Iorg, CD; Heroux, A; Hill CP; Hunter, CN. 2005. Structural and biochemical characterization of Gun4 suggests a mechanism for its role in chlorophyll biosynthesis. *Biochem*, 44: 7603–7612
- Demmig-Adams, B; Adams, WW 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 43:599-626.

- Demmig-Adams, B; Adams, WW. 2006. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol*, 172: 11–21.
- Demmig-Adams, B; Ebberta, V; Mellmana, DL; Mueha, KE; Schaffera, L; Funkb, C; Zartera, CR; Adamskac, I; Janssond, S; Adams, WW. 2006. Modulation of PsbS and flexible vs sustained energy dissipation by light environment in different species. *Physiol Plant*, 127: 670–680.
- Fernández, AP; Strand, A. 2008. Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 509-513.
- Frenkel, M; Külheim, C; Jänkänpää, HJ; Skogström, O; Dall'Osto, L; Ågren, J; Bassi, R; Moritz, T; Moen, J; Jansson, S. 2009. Improper excess light energy dissipation in *Arabidopsis* results in a metabolic reprogramming. *BMC Plant Biol*, 9: 12-20.
- Friboulet, A; Thomas, D. 2005. Systems biology-an interdisciplinary approach. *Biosen Bioelect*, 20: 2404–2407.
- Genty, B; Briantais, JM; Baker, NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*, 990: 87-92.
- Gray, JC. 2003. Chloroplast-to-nucleus signaling: a role for Mg-protoporphyrin. *Trends Gen*, 19(10): 526-529.
- Hansson, A; Jensen, PE. 2009. Chlorophyll limitation in plants remodels and balances the photosynthetic apparatus by changing the accumulation of photosystems I and II through two different approaches. *Physiol Plant*, 135: 214–228.
- Havaux, M; Dall'Osto, L; Bassi, R. 2007. Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in *Arabidopsis* leaves and functions independent of binding to PSII antennae. *Plant Physiol*, 145: 1506–1520.

- Hendrikson, L; Furbank, RT; Chow, WS. 2004. A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynth Res*, 82:73-81.
- Hodges, DM; DeLong, JM; Forney, CF; Prange, RK. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207: 604-611.
- Ihmels, J; Levy, R; Barkai, N. 2004. Principles of transcriptional control in the metabolic network of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnol*, 22(1): 86-92.
- Jarvis, P. 2001. Intracellular signalling: The chloroplast talks! *Current Biol*, 11: 307–310.
- Jones, H. 2004. What is water use efficiency? In: Bacon, MA. *Water use efficiency in plant biology*. Blackwell Publishing, pp. 27-40.
- Johnson, MP; Pérez-Bueno, ML; Zia, A; Horton, P; Ruban, AV. *in press*. The zeaxanthin-independent and zeaxanthin-dependent qE components of non-photochemical quenching involve common conformational changes within the Photosystem II antenna in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*.
- Kittsteiner, U; Brunner, H; Rudiger, W. 1991. The greening process in cress seedlings. II. Complexing agents and 5-aminolevulinate inhibit accumulation of cab messenger RNA coding for the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Physiol Plant*, 81:190–96.
- Klughammer, C; Schreiber, U. 2008. Complementary PSII quantum yield calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and saturation pulse method. *PAM Application Notes*, 1: 27-35.
- Koussevitzky, S; Nott, TC; Mockler, FH; Sachetto-Martins, G; Surpin, MJ; Chory, J. 2007. Multiple signals from damaged chloroplasts converge on a common pathway to regulate nuclear gene expression. *Science*, 316: 715–719.
- Larkin, RM; Alonso, JM; Ecker, JR; Chory, J. 2003. GUN4, a regulator of chlorophyll

- synthesis and intracellular signaling. *Science*, 299: 902-906.
- Larkin, RM; Ruckle, ME. 2008. Integration of light and plastid signals. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 1–7.
- La Rocca, N; Rascio, N; Oster, U; Rudiger, W. 2001. Amitrole treatment of etiolated barley seedlings leads to deregulation of tetrapyrrole synthesis and to reduced expression of Lhc and RbcS genes. *Planta*, 213: 101-108.
- Li, Z; Wakao, S; Fischer, BB; Niyogi, KK. 2009. Sensing and responding to excess light. *Annu Rev Plant Biol*, 60: 239-60.
- Lichtenthaler, HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzimol*, 148: 350-382.
- Lichtenthaler, HK; Burkart, S. 1999. Photosynthesis and high light stress. *Bulg J Plant Physiol*, 25(3–4): 3–16.
- Lichtenthaler, HK; Buschmann, C; Knapp, M. 2005. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{Fd} of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica*, 43(3): 379-393.
- Lichtenthaler, HK; Miehe, JA. 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci*, 2: 316-320.
- Lorenz, DR; Cantor, CR; Collins, JJ. 2009. A network biology approach to aging in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(4): 1145-1150.
- Masuda, T; Fujita, Y. 2008. Regulation and evolution of chlorophyll metabolism. *Photochem Photobiol Sci*, 7: 1131–1149.
- Maxwell, K; Johnson, GN. 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J Exp Bot*, 51, 659-668.
- Miyake, C; Shinzaki, Y; Miyata, M; Tomizawa, KI. 2004. Enhancement of cyclic electron flow around PSI at high light and its contribution to the induction of non-

photochemical quenching of Chl fluorescence in intact leaves of Tobacco plants. *Plant Cell Physiol*, 45(10): 1426–1433.

Mochizuki, N; Brusslan, JÁ; Larkin, R; Nagatani, A; Chory, J. 2001. Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelataseH subunit in plastid-nucleus signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 2053-2058.

Mochizuki, N; Tanaka, R; Tanaka, A; Masuda, T; Nagatani, A. 2008. The steady state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 15184–15189.

Moulin, M; McCormac, AC; Terry, MJ; Smith, AG. 2008. Tetrapyrrole profiling in Arabidopsis seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 15178-15183.

Muller, P; Li, XP; Niyogi, KK. 2001. Non-photochemical quenching: A response to excess light energy. *Plant Physiol*, 125: 1558-1566.

Nikiforova, VJ; Willmitzer, L. 2007. Network visualization and network analysis. In: Baginsky, S; Fernie, AR. *Plant Systems Biology*. Birkhäuser Verlag. Berlin.

Nott, A; Jung, HS; Koussevitzky, S; Chory, J. 2006. Plastid-to-nucleus retrograde signalling. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 739-759.

Oxborough, K; Baker, NR. 1997. An instrument capable of imaging chlorophyll a fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at the cellular and sub-cellular levels of organization. *Plant Cell Environ*, 20: 1473-1483.

Palsson, BØ. 2005. *Systems biology: properties of reconstructed networks*. Cambridge University Press, New York.

Pérez-Bueno, ML; Johnson, MP; Zia, A; Ruban, AV; Horton, P. 2008. The Lhcb protein and xanthophyll composition of the light harvesting antenna controls the DpH-dependency of non-photochemical quenching in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 582: 1477–1482.

- Piippo, M; Allahverdiyeva, Y; Paakkanen, V; Suoranta, UM; Battchikova, N; Aro, EM. 2006. Chloroplast-mediated regulation of nuclear genes in *Arabidopsis thaliana* in the absence of light stress. *Physiol Genomics*, 25: 142–152.
- Pogson, BJ; Woo, NS; Förster, B; Small, ID. 2008. Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci*, 13(11): 602-609.
- Pogson, BJ; Rissler, HM. 2000. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and Photoprotection. *Phil Trans R Soc Lond*, 355: 1395-1403.
- Pontier, D; Albrieux, C; Joyard, J; Lagrange, T; Block, MA. 2007. Knock-out of the magnesium protoporphyrin IX methyltransferase gene in *Arabidopsis* - Effects on chloroplast development and on chloroplast-to-nucleus signaling. *J Biol Chem*, 282: 2297-2304.
- Prado, CHBA; Wenhui, Z, Rojas, MHC; Souza, GM. 2004. Seasonal leaf gas exchange and water potential in a woody cerrado species community. *Braz J Plant Physiol*, 16: 7-16.
- Ravasz, E; Oltvai, ZN; Barabási, AL. 2002. Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science*, 297: 1003-1011.
- Ruban, AV; Berera, R; Iliaia, C; van Stokkum, IHM; Kennis, JTM; Pascal, AA; van Amerongen, H; Robert, B; Horton, P; van Grondelle, R. 2007. Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature*, 450: 575-579.
- SAEG 2007. *Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas*. Versão 9.1. Viçosa, Fundação Arthur Bernardes.
- Schulze, EA; Beck, E; Müller-Hohenstein, K. 2005. Stress Physiology. In: Schulze, EA; Beck, E; Müller-Hohenstein, K. *Plant Ecology*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-250.

- Shen, YY; Wang, XF; Wu, FQ; Du, SY; Cao, Z; Shang, Y; Wang, XL; Peng, CC; Yu, XC; Zhu, SY; Fan, RC; Xu, YH; Zhang, DP. 2006. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature*, 443: 445-451.
- Sobotka, R; Dühring, U; Komenda, J; Peter, E; Gardian, Z; Tichy, M; Grimm, B; Wilde, A. 2008. Importance of the cyanobacterial Gun4 protein for chlorophyll metabolism and assembly of photosynthetic complexes. *J Biol Chem*, 283(38): 25794–25802.
- Souza, GM; Aida, ST; Oliveira, RF. 2005. Developmental stability and network connectance in *Phaseolus vulgaris* genotypes under water deficit. *Isr J Plant Sci*, 52: 205-212.
- Souza, GM; Buckeridge, MS. 2004. Sistemas complexos: novas formas de ver a botânica. *Rev Bras Bot*, 27: 407-19.
- Souza, GM; Oliveira, RF. 2004. Estabilidade e complexidade em sistemas biológicos. Em: Souza, GM; D'Ottaviano, IML; Gonzales, MEQ. (Eds.). *Auto-organização: estudos interdisciplinares*. CLE/UNICAMP, Campinas. 38: 123-136.
- Souza, GM; Ribeiro, RV; Prado, CHBA; Damineli, DSC; Sato, AM; Oliveira, MS. 2009. Using network connectance and autonomy analyses to uncover patterns of photosynthetic responses in tropical woody species. *Ecol Complex*, 6: 15-26.
- Stelling, J; Klamt, S; Bettenbrock, K; Schuster, S; Gilles, ED. 2002. Metabolic network structure determines key aspects of functionality and regulation. *Nature*, 420(14): 190-193.
- Strand A, Asami T, Alonso J, Ecker JR, Chory J. 2003. Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature*, 421:79-83.
- Susek, RE; Chory, J. 1992. A tale of two genomes: Role of a chloroplast signal in coordinating nuclear and plastid genome expression. *Aust J Plant Physiol*. 19: 387-399.
- Tanaka A, Tanaka R. 2006. Chlorophyll metabolism. *Curr Opin Plant Biol*, 9:248–55

- Tanaka, R.; Tanaka, A. 2007. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, 58: 321-346.
- Teramoto H; Ono, T; Minagawa, J. 2001. Identification of Lhcb gene family encoding the light-harvesting chlorophyll-a/b proteins of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol*, 42: 849–856.
- Teramoto, H; Nakamori, A; Minagawa, J; Ono, T. 2002. Light-Intensity-Dependent expression of Lhc gene family encoding light-harvesting chlorophyll-a/b proteins of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 130: 325–333.
- Vinti, G; Hills, A; Campbell1, S; Bowyer, JR; Mochizuki, N; Chory, J; Pez-Jue, EL. 2000. Interactions between *hyl* and *gun* mutants of *Arabidopsis*, and their implications for plastid/nuclear signaling. *Plant J*, 24:883–894.
- Walters, RG 2005. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *J Exp Bot*, 56(411): 435-447.
- Wilde, A; Mikolajczyk, S; Alawady, A; Lokstein, H; Grimm, B. 2004. The *gun4* gene is essential for cyanobacterial porphyrin metabolism, *FEBS Lett*, 571: 119–123.
- Wu, Z; Zhang, X; He, B; Diao, L; Sheng, S; Wang, J; Guo, X; Su, N; Wang, L; Jiang, L; Wang, C; Zhai, H; Wan, J. 2007. A Chlorophyll-Deficient rice mutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiol*, 145: 29–40.
- Zhang, DP. 2007. Signaling to the nucleus with a loaded GUN. *Science*, 316: 700-701.
- Zulfugarov, IS; Ham, OK; Mishra, SR; Kim, JY; Nath, K; Koo, HY; Kim, HS; Moon, YH; An, G; Lee, CH. 2007. Dependence of reaction center-type energy-dependent quenching on photosystem II antenna size. *Biochim Biophys Acta*, 1767: 773–780.

7 - ANEXOS

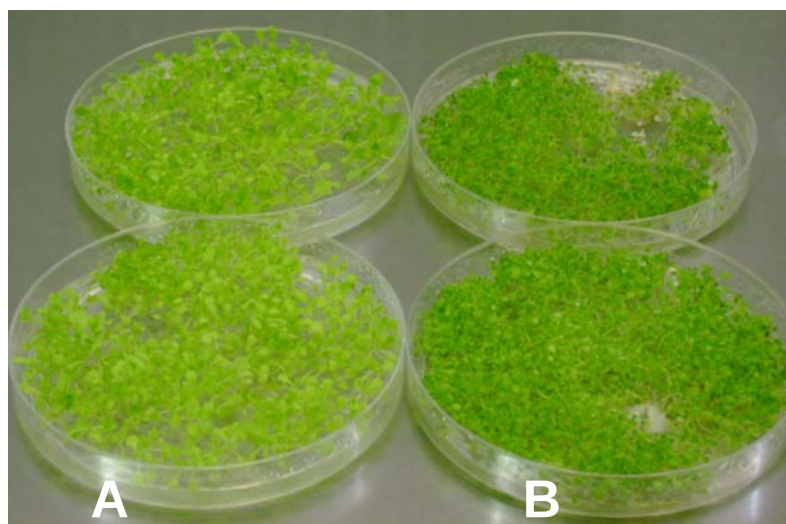


Figura 11. Visão de plântulas do mutante *gun4* (A) e do genótipo selvagem (B) de *Arabidopsis thaliana*.

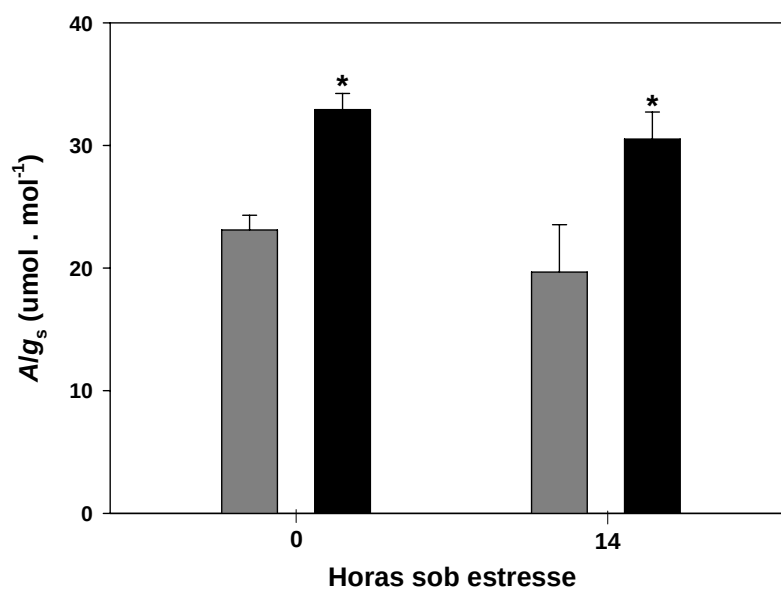


Figura 12. Eficiência intrínseca do uso da água (E_{ia}) em *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante *gun4*. E_{ia} denota a relação entre a taxa de assimilação líquida de CO_2 e a condutância estomática (A/g_s) (Jones et al. 2004). Estatística conforme Figura 4. (n=5)

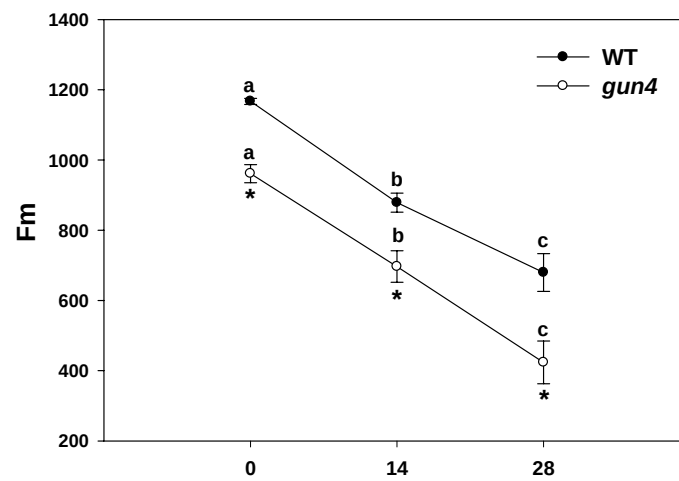


Figura 13. Fluorescência máxima de folhas adaptadas ao escuro em plantas selvagem (WT) e no mutante *gun4* sob 0, 14 ou 28 h de estresse. Estatística conforme Figura 6.

Tabela 3. Correlação de Pearson entre os parâmetros da rede fotoquímica de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e *gun4* de acordo com o nível de estresse luminoso (0, 14 ou 28 h sob 800 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). ETR - taxa de transporte de el\u00e9trons, qN - coeficiente de extin\u00e7\u00e3o n\u00e3o-fotoqu\u00edmico, Fv/Fm - efici\u00eancia qu\u00e2ntica potencial do fotossistema II, Φ_{FSII} - efici\u00eancia qu\u00e2ntica efetiva do fotossistema II.

WT	F _v /F _m			Φ_{FSII}			ETR		
	0	14	28	0	14	28	0	14	28
Φ_{FSII}	0.122	<u>0.928</u>	-0.181	-	-	-	-	-	-
ETR	0.472	<u>0.928</u>	-0.181	<u>0.857</u>	<u>0.999</u>	<u>0.999</u>	-	-	-
qN	-0.734	0.250	-0.457	-0.332	0.311	-0.250	-0.361	0.311	-0.250
<i>gun4</i>	F _v /F _m			Φ_{FSII}			ETR		
	0	14	28	0	14	28	0	14	28
Φ_{FSII}	-0.490	0.745	<u>0.971</u>	-	-	-	-	-	-
ETR	-0.571	0.745	<u>0.974</u>	0.710	<u>0.999</u>	<u>0.999</u>	-	-	-
qN	0.391	0.537	-0.775	0.392	0.060	-0.902	-0.181	0.060	-0.897

Valores sublinhados denotam correla\u00e7\u00e3o de Pearson significativa a 5%.

Tabela 4. Correlação de Pearson entre os parâmetros da rede de trocas gasosas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e *gun4* de acordo com o nível de estresse luminoso (0 ou 14 h sob 800 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

WT	A		E		g_s	
	0	14	0	14	0	14
E	-0,215	-0,632	-	-	-	-
g_s	0,800	-0,390	-0,124	0,476	-	-
C_i	0,410	-0,900	-0,751	0,578	0,575	0,004
gun4	A		E		g_s	
	0	14	0	14	0	14
E	0,348	0,734	-	-	-	-
g_s	<u>0,934</u>	<u>0,844</u>	0,539	<u>0,954</u>	-	-
C_i	0,376	-0,699	-0,594	-0,561	0,315	-0,480

Estatística conforme Tabela 3.

Tabela 5. Resumo dos parâmetros de fluorescência da clorofila-*a* calculados. Fórmulas utilizadas, autores que as propuseram bem como a descrição biológica a qual estes parâmetros estimam.

Parâmetro	Cálculo	Autor	Nomenclatura e descrições biológicas
Fo'	$F_o/(F_v/F_m + (F_o/F_m'))$	Oxborough e Baker (1997)	<i>Fluorescência mínima de folhas adaptadas a luz.</i> Denota a fluorescência mínima quando os aceptores primários de elétrons (Q_A) estão oxidados, em que todos os centros de reação do FSII estão abertos (Maxwell e Johnson, 2000; Baker et al. 2007).
Fv/Fm	$F_m - F_o/F_m$	Brakman e Demming (1987)	<i>Rendimento quântico potencial do FSII.</i> Refere-se à eficiência máxima na qual a luz absorvida no FSII é convertida em energia química (redução de Q_A) (Baker et al. 2007).
qN	$(F_m - F_m')/F_v$	Bilger e Schreiber (1986)	<i>Coeficiente de extinção não fotoquímico relacionado à fluorescência variável.</i> Segundo Lichtenthaler et al. (2005), é subdividido em qE, qT e qI. É o processo pelo qual a energia de excitação é rapidamente dissipada no complexo antena do FSII, através de Xantofilas e mudanças na antena deste complexo (Pogson e Rissler, 2000; Pérez-Bueno et al. 2008).
qE	$(nF_1 - nF_5)/F_v$	Walters e Horton (1991)	<i>Coeficiente de extinção dependente de energia.</i> Induzido pela variação de pH entre o estroma o lúmen do tilacóide (Bruce et al. 1997; ; Lichtenthaler et al. 2005), gerado pelo gradiente de próton da cadeia transportadora de elétrons (Müller et al. 2001).
qT	$(nF_5 - nF_{20})/F_v$	Walters e Horton (1991)	<i>Coeficiente de extinção do estado de transição.</i> Envolve à fosforilação do complexo coletor de luz do FSII e sua subsequente dissociação deste fotossistema, reduzindo assim a quantidade de energia de excitação que este fotossistema recebe (Bruce et al. 1997; Müller et al. 2001; Lichtenthaler et al. 2005).
qI	nF_{20}/F_v	Walters e Horton (1991)	<i>Coeficiente de extinção fotoinibitório.</i> Induzido por excesso de luz, está relacionado com danos no FSII (Bruce et al. 1997; Lichtenthaler et al. 2005).
Φ_{NPQ}	$(F/F_m') - (F/F_m)$	Hendrickson et al. (2004)	<i>Rendimento quântico da dissipação de energia regulada no FSII.</i> Demonstra a dissipação regulada de energia térmica relacionada ao qN (Klughammer e Schreiber, 2008).

Φ_{NO}	F/Fm	Hendrickson et al. (2004)	<i>Rendimento quântico da dissipação de energia não regulada no FSII.</i> Corresponde às perdas constitutivas de energia no FSII, sendo a soma da emissão de fluorescência e dissipação de calor (Klughammer e Schreiber, 2008).
Φ_{FSII}	(Fm'-F)/Fm'	Genty et al. (1989)	<i>Rendimento quântico efetivo do FSII.</i> Refere-se ao rendimento quântico da conversão fotoquímica da energia absorvida no FSII (Klughammer e Schreiber, 2008).
qL	$qL = (F_m' - F) \times F_0' / (F_m' - F_0') \times F$	Kramer et al. (2004)	<i>Coefficiente de extinção fotoquímico (modelo lake).</i> Fornece uma indicação da proporção de centros de reação do FSII que estão abertos (Kramer et al. 2004), evidenciando o uso da energia de excitação para reações fotoquímicas (Müller et al. 2001).
ETR	$\Phi_{FSII} \times RFA \times 0,84 \times 0,5$	Genty et al. (1989)	<i>Taxa de transporte de elétrons.</i> Fluxo de elétrons fotossintéticos no FSII, indica a capacidade fotossintética da planta (Maxwell e Johnson, 2000).