

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Tese

**ESTRESSE PELA APLICAÇÃO DE RADIAÇÃO UV-C E DO
DEFICIT HÍDRICO EM GENÓTIPOS DE TOMATE
'MICRO-TOM'**

Cristina Moll Hüther

Pelotas, 2014

Cristina Moll Hüther

**ESTRESSE PELA APLICAÇÃO DE RADIAÇÃO UV-C E DO
DEFICIT HÍDRICO EM GENÓTIPOS DE TOMATE
'MICRO-TOM'**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Doutora em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Dr. Marcos Antonio Bacarin

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

H979eHüther, Cristina Moll

Estresse pela aplicação de radiação uv-c e do deficit hídrico em genótipos de tomate 'micro-tom'/ Cristina Moll Hüther. – 107f. : il.– Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.UniversidadeFederal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orientador Marcos Antonio Bacarin ; co-orientador Cesar Valmor Rombaldi.

1.Fisiologia vegetal.2.Tomates. 3.*Solanum lycopersicum* Mill. 4.Crescimento. 5.Estresse abiótico. 6.Fluorescência da clorofila a. 7.Trocas gasosas.I.Bacarin, Marcos Antonio.II.Rombaldi, Cesar Valmor.III.Título.

CDD: 635.642

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Antonio Bacarin (Presidente)

Prof. Dr. Nei Fernandes Lopes

Prof. Dr. José Antonio Peters

Prof. Dr. Luciano Carlos da Maia

AGRADECIMENTOS

Em especial à Deus, meu alicerce e que sempre esteve comigo...

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida durante o transcorrer do curso.

À Universidade Federal de Pelotas, em especial o Departamento de Botânica, e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (PPGFV). Bem como à coordenação, professores e funcionários do PPGFV, pelo acolhimento, ensinamentos e atenção dedicada.

Meu agradecimento em especial ao professor e orientador Dr. Marcos Antonio Bacarin que em primeiro momento: pelo apoio, compreensão e sensibilidade em ocasiões decisivas. E em segundo momento: pelos ensinamentos, dedicação, paciência, disponibilidade em me orientar também no doutorado, além da responsabilidade direta na construção dessa Tese e principalmente pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao professor e co-orientador Dr. Cesar Valmor Rombaldi, pelo seu conhecimento, pela oportunidade em trabalhar com esses genótipos, além de sempre me conceder e proporcionar vários encontros para dialogar sobre os experimentos e resultados obtidos!

À banca pelas valiosas sugestões e tempo dedicado a avaliação do presente estudo.

A minha família que também é meu alicerce...meu refúgio...meu aconchego!

Em especial ao meu pai Zeno, que mesmo perdendo-o tão cedo, permaneceu *in memoriam*. Seus ensinamentos e o seu exemplo a ser seguido: a estar constantemente em busca de conhecimentos. Isso o que me inspirou a ir a busca de novos 'horizontes'!

À minha mãe Ada, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e me orientando, e mesmo tendo ficado sozinha tão cedo, soube educar e ter força para cumprir o papel de pai e mãe, sem perder a doçura de ser mãe!

Ao meu irmão André, que mesmo distante da minha realidade de estudante, sempre me incentivou...e mesmo ao final ainda me proporcionava um incentivo à moda gaúcha, dizendo: vê se faz coisa que 'preste' nessa escrita!

Ao meu irmão Ricardo 'cadinho da mana': que proporcionou vários incômodos durante o transcorrer do doutorado, mas também me proporcionou ótimos momentos, inclusive com seus amigos que se tornaram meus amigos também, ou melhor 'mana deles também'! Um dos itens que ele mais merece agradecimentos é que ele foi meu maior 'INCENTIVADOR', principalmente naqueles momentos decisivos!

Ao meu namorado Tiago: pelo carinho e companheirismo, tanto em momentos alegres como nos ‘não tão alegres’, bem como à sua família, que admiro muito, pois sempre me acolheu de braços abertos, e com todo amor!

Estendo meus agradecimentos aos meus colegas de curso, amigos do Laboratório de Metabolismo Vegetal, como também os amigos de longe e de perto, em especial aos que conviveram a maior parte do doutorado comigo: Aline Ramm, Alitcia Kleinowski, Anderson Schock, Camila Souza, Daniela De Conti, Davi Dalberto, Elisia Corrêa, Emanuela Martinazzo, Fernanda Tonel, Junior Borella, Marcio Farias e ‘as meninas do Laboratório de Sementes!’ Obrigada pela prontidão, auxílio nos experimentos, ensinamentos, discussões de resultados, pelas brincadeiras e parceria nos momentos de aflição e descontração!

Aos bolsistas de iniciação científica, Ana, Douglas, Mônica e Marcelo pelo auxílio na condução dos experimentos e pela amizade.

Não posso deixar de agradecer também duas grandes incentivadoras que marcaram importante presença na minha vida acadêmica e pessoal, sempre me estimulando a continuar os estudos após a graduação: Obrigada professoras Lurdes Zanchetta da Rosa e Rozangela Catarina Chaves Borges.

E por fim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

Obrigada!

*Não eduque seu filho para ser rico, eduque-o para ser feliz.
Assim ele saberá o VALOR das coisas e não o seu PREÇO"*
(Max Gehringer)

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
INTRODUÇÃO GERAL	10
CAPÍTULO I – Crescimento e componentes de produção em plantas transformadas e não transformadas de tomate ‘Micro-Tom’ com diferentes expressões da sHSP23.6 mitocondrial	15
Introdução	16
Materiais e Métodos	18
Resultados e Discussão.....	20
Conclusões	28
CAPÍTULO II – Radiação UV-C aplicada em plantas transformadas e não transformadas de tomate ‘Micro-Tom’ com diferentes expressões da sHSP23.6 mitocondrial.....	29
Introdução	30
Materiais e Métodos	34
Resultados	36
Discussão	52
Conclusões	59
CAPÍTULO III –Déficit hídrico em plantas transformadas e não transformadas de tomate ‘Micro-Tom’ com diferentes expressões da sHSP23.6 mitocondrial.....	60
Introdução	61
Materiais e Métodos	63
Resultados	66
Discussão	80
Conclusões	86
CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
REFERÊNCIAS	89

RESUMO

HÜTHER, Cristina Moll. **Estresse pela aplicação de radiação UV-C e o déficit hídrico em genótipos de tomate ‘Micro-Tom’**. 2014. 107Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Resumo: Este trabalho teve por objetivo: a) comparar o crescimento e componentes de produção de plantas de tomateiro ‘Micro-Tom’, com plantas selvagem e plantas transformadas para diferentes níveis de expressão da MT-sHSP23.6 (*mitochondrial small heat shock proteins*); b) verificar as injúrias causadas pela aplicação UV-C, na atividade fotossintética, no estágio vegetativo e reprodutivo, com os mesmos genótipos descritos anteriormente; c) comparar os efeitos que o déficit hídrico apresenta sobre a atividade fotossintética em plantas de tomate ‘Micro-Tom’, no período de indução floral, nos mesmos genótipos relatados. O primeiro experimento foi conduzido em câmaras de crescimento, sob condições controladas. As análises foram realizadas com intervalos regulares de tempo de 21 dias, iniciando as coletas no 21º dia após o transplante e ao total foram realizadas seis coletas. Foram determinadas: área foliar, massa seca das partes das plantas e o número de frutos verdes e vermelhos. Através dos resultados obtidos verificou-se que a transformação genética desta variedade não interferiu de maneira significativa no crescimento destas plantas. No segundo experimento, que apresentou objetivo de avaliar o efeito da aplicação da radiação UV-C, foram realizados dois ensaios, sendo que as plantas foram cultivadas em casa de vegetação, com temperatura e umidade controlada. No primeiro ensaio, a aplicação da radiação UV-C foi realizada apenas uma só vez quando as plantas estavam no estágio vegetativo. No segundo ensaio as plantas foram submetidas a duas doses de radiação UV-C, com intervalo de 10 dias, iniciando a aplicação quando as plantas estavam em início de estágio reprodutivo. A aplicação durou 2 minutos com uma dose de 0,5 kJ.m⁻². Foram avaliados: índice de clorofila, fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas. No primeiro ensaio as avaliações foram realizadas após 16, 64, 168 e 336 horas após a aplicação da radiação, e no segundo as 16, 64 e 168 horas após a primeira aplicação e com o mesmo intervalo após a segunda aplicação da radiação. Por intermédio dos resultados observou-se os genótipos apresentaram comportamentos distintos em relação aos dados da fluorescência transiente. Contudo a taxa assimilatória líquida foi mais afetada nos genótipos transformados e com maior intensidade no segundo ensaio, principalmente após a segunda aplicação da radiação UV-C. Dessa forma verificou-se que em ambos os ensaios, a transformação genética não contribuiu de maneira significativa para proporcionar melhor desempenho nessas condições experimentais. No terceiro experimento as plantas foram cultivadas em câmara de crescimento. Quando estas estavam com 44 dias após a semeadura, no período de indução floral, as mesmas foram submetidas ao déficit hídrico por cinco dias. Foram avaliados: índice de clorofila, fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas e ao final do experimento foram realizadas análises simultâneas da decaída da fluorescência, reflexão modulada a 820nm, teor de prolina nas folhas área foliar e massa seca das partes das plantas. Pode-se verificar que o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 foi mais eficiente que os demais genótipos nas reações fotoquímicas, permitindo que os dados do déficit hídrico fossem menores, contudo não foi possível evidenciar relação da superexpressão dessa proteína com os parâmetros das trocas gasosas.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* Mill, crescimento, estresse abiótico, fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas.

ABSTRACT

HÜTHER, Cristina Moll. **Stress by the application of UV-C and water déficit in genotypes of 'Micro-Tom' tomato plants.** 2014. 107 Thesis (Doctoral) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Abstract: The objectives of this study were: a. to compare growth and yield components of 'Micro-Tom' tomato plants with wild plants and transformed plants for different levels of MT-sHSP23.6 expression (*mitochondrial small heat shock proteins*); b. to verify damages caused by UV-C application to photosynthetic activity, in the vegetative and reproductive stages, with the same genotypes previously described; c. to compare the effects of water deficit on photosynthetic activity in 'Micro-Tom' tomato plants with the genotypes reported, in the period of floral induction. The first experiment was carried out in growth chambers, under controlled conditions. The analyses were performed at regular time intervals of 21 days. Collections started on 21st day after the transplant, a total of six collections. Leaf area, dry weight of the plants parts, and the number of green and red fruits were determined. From the results obtained we verified that the genetic transformation of this variety did not interfere significantly with these plants growth. In the second experiment that aimed to evaluate the effect of application of UV-C radiation, two trials were performed; the plants were grown in a green house, under controlled temperature and humidity. In the first trial the application of UV-C radiation was performed only once, when the plants were in vegetative stage. In the second trial the plants were exposed to two doses of UV-C radiation, with an interval of ten days, the application began when the plants were starting the reproductive stage. The application lasted two minutes with a dose of 0,5kJ.m⁻². Chlorophyll index, chlorophyll *a* fluorescence, and gas exchanges were evaluated. At the first trial, the evaluations were performed at 16, 64, 168, and 336 hours after the application of the radiation, and in the second trial at 16, 64, and at 168 hours after first application, with the same interval after the second application of radiation. From the results we observed that the genotypes showed different behaviors in relation to the data of transient fluorescence. However, the net assimilation rate was more affected in the transformed genotypes, with greater intensity in the second trial, especially after the second application. We noticed that in both trials genetic transformation did not contributed significantly to provide better performance under these experimental conditions. In the third trial the plants were grown in a growth chamber. Forty-four days after sowing, in floral induction period, they were submitted to water deficit for five days. Chlorophyll index, chlorophyll *a* fluorescence, and gas exchanges were evaluated, and at the end of the experiment we made simultaneous analysis of fluorescence decrease, modulated reflection at 820 nm, proline content in the foliar area, and dry matter of plant parts. We could verify that genotype with over-expression of MT-sHSP23.6 was more efficient than the other genotypes in photochemical reactions, allowing that water deficit data were smaller, however it was not possible to identify the relation of the over-expression of these proteins with the parameters of gas exchange.

Keywords: *Solanum lycopersicum* Mill, growth, abiotic stress, fluorescence of chlorophyll *a*, gas exchanges

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro é uma das plantas hortícolas mais importantes do mundo. Isso se deve, principalmente, pela sua importância como alimento e como modelo para estudos fisiológicos e bioquímicos, como modelo alternativo à *Arabidopsis thaliana*, uma vez que apresenta um padrão morfológico (MEISSNER et al., 1997; LIMA et al., 2004; GRATÃO et al., 2008; CARVALHO et al., 2011; FISCHER et al., 2011; BECKLES, 2012). Pesquisas com tomateiro tem proposto o desenvolvimento de cultivares voltadas para aumento da produtividade, bem como na tolerância a estresses (MURCHIE et al., 1999; KIMURA e SINHA 2008; MONTEIRO et al., 2012).

A variedade de tomateiro 'Micro-Tom' vem sendo amplamente utilizada como modelo genético para inúmeras pesquisas relacionadas à genética, fisiologia ou mesmo estudos com estresses abióticos, bióticos, produtividade, qualidade nutricional (MEISSNER et al., 1997; PINO-NUNES, 2005; MARTÍ et al., 2006; PIOTTO, 2007; WATANABE et al., 2007; GRATÃO et al., 2008; FARINHA et al., 2009; MELO et al., 2009; AOKI et al., 2010; BARSAN et al., 2010; CARVALHO et al., 2010; PINO et al., 2010; TIECHER, 2010b).

Algumas plantas induzem à síntese de um grupo de proteínas chamadas '*heat shock proteins*' (HSPs), isto é, proteínas de choque térmico, em resposta a elevada temperatura (LINDQUIST e CRAIG, 1988; LEE, et al., 2000). Existindo uma cooperação entre suas diferentes classes destas proteínas, além de interações com outros componentes induzidos pelo estresse (WANG et al., 2004). Atualmente, é conhecido que essas proteínas também são induzidas em diversas situações estressantes (SUNG et al., 2003; SUN et al., 2006; HU et

al.,2007; WAHID et al., 2007; SCARPECI et al., 2008; TIMPERIO et al., 2008; XUE et al., 2014).As HSPs estão classificadas em cinco grupos: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e as de pequena massa molecular (sHSP ou smHSP de ‘small’) que apresentam entre 15-30 kDa (LINDQUIST e CRAIG, 1988). Contudo, as mais abundantes em plantas superiores é o grupo sHSP, principalmente o que constitui a família sHSP20 (VIERLING, 1991).

Nesse sentido, o uso de plantas transformadas para diferentes níveis de expressão dessas proteínas são essenciais para estudos fisiológicos, em virtude principalmente de sua participação efetiva em situações estressantes para o vegetal.Diversos trabalhos, com diferentes tipos de estresses,são relatados na literatura (LIU e SHONO, 1999; LEE, et al., 2000; SUN et al., 2003; SANMIYA et al., 2004; NAUTIYAL e SHONO, 2010),principalmente voltados para elucidar o comportamento fotossintético das plantas, visto que este é um dos principais processos influenciados em condições estressantes,proporcionando e desencadeando uma cascata de alterações no restante do organismo.

Atualmente objetiva-se desenvolver técnicas e metodologias não destrutivas, para estudos do processo fotossintético, devendo estas serem flexíveis, rápidas e acessíveis para a detecção confiável das respostas fisiológicas das plantas sob diferentes ambientes de crescimento e condições agronômicas (BÜRLING et al., 2013; TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2013).Além de permitir que a análise do estado fisiológico do vegetal, ocorra sem que a planta ainda demonstre sintomas visuais do estresse (YUSUF et al., 2010; MURCHIE e LAWSON, 2013; TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2013).

Desse modo, as vantagens dos métodos baseados em fluorescência, para avaliar a resposta fisiológica das plantas, são bem descritas, pois se trata de um método simples, rápido e não invasivo. Fornecendo dados precisos sobre a eficiência fotoquímica, uma vez que permite a medição da fração de radiação fotossinteticamente ativa absorvida, não utilizada na fase fotoquímica pelo centro de reação, sendo possível estimar a absorção de energia pelos pigmentos do sistema antena, a captura de um éxciton pelo centro de reação e consequentemente, no transporte de elétrons para o acceptor final de elétrons. A análise da fluorescência da clorofila é amplamente empregada como ferramenta em estudos voltados à investigação de respostas fisiológicas das plantas quando submetidas a múltiplos fatores de estresses(PAPAGEORGIOU e GOVINDJEE, 1968; STRASSER e GOVINDJEE, 1992; STRASSER e STRASSER, 1995; STRASSER e TSIMILLI-MICHAEL, 1998; STRASSER et al., 2000; STRASSER et al., 2004).

A análise da fluorescência da clorofila tornou-se um dos meios mais poderosos e amplamente utilizados para a obtenção de informações sobre o estado do fotossistema II (FSII) (WANG et al., 2013), sendo influenciada pela funcionalidade dos fotossistemas, pelo fluxo de elétrons e pela concentração de clorofila (CHRISTEN et al., 2007). Resulta numa medida da eficiência fotossintética, fornecendo informações sobre a relação entre estrutura e função do FSII e centro de reação (RC) (ADAMS e DEMMIG-ADAMS, 2004), sendo precisa para identificar danos ocasionados ao FSII por estresses (WANG et al., 2013).

A fluorescência transiente é caracterizada por um aumento polifásico, iniciando na fluorescência inicial (F_0) e atingindo a fluorescência máxima (F_M). Onde F_0 é a intensidade mínima de fluorescência, sendo o nível de fluorescência da clorofila quando todos os centros do FSII estão abertos e F_M é a intensidade máxima de fluorescência, quando todos os centros de reação do FSII estão fechados (KRAUSE e WEIS, 1991). O valor mínimo é alcançado por meio da adaptação da amostra ao escuro, permitindo assim a abertura de todos os centros de reação do FSII. Posteriormente, a fluorescência máxima é obtida pela incidência de luz, ou seja, por um pulso de luz saturante (STRASSER et al., 2004). Obtidas as intensidades de fluorescência, estas podem ser analisadas pelo teste JIP, desenvolvido por Strasser e Strasser (1995), que descreve por intermédio de vários parâmetros o comportamento do fluxo de energia na cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese.

A fluorescência variável é obtida pela diferença entre a fluorescência F_M e F_0 , que é uma medida relativa dos centros de reação fotoquimicamente ativos, que é extremamente sensível às mudanças na ultraestrutura das membranas e na taxa de transferência de elétrons. A relação F_v/F_M pode ser apresentada como o rendimento da reação fotoquímica (KRAUSE e WEIS, 1991), sendo considerado um dos parâmetros mais simples e prático para o monitoramento da sobrevivência de um vegetal perante um fator estressante. Uma vez que pode ser identificada a alteração neste parâmetro em resposta a vários estresses ambientais, sendo que o seu declínio indica perda da eficiência fotoquímica (WANG et al., 2013). Porém, os índices de performance (PI_{abs} e PI_{total}) são considerados como muito sensíveis para a detecção e quantificação de estresse em plantas (OUKARROUM et al., 2007).

Atualmente, tem-se buscado melhor entendimento do comportamento do FSI, perante situações estressantes, e não somente estimar a probabilidade do que possa acontecer nele. Anteriormente, muito poucas pesquisas eram realizadas com a fluorescência emitida pelo FSI, pois sendo praticamente constante, além de que contribui muito pouco para o sinal de fluorescência total (BYRDIN et al., 2000; MURCHIE e LAWSON, 2013). No entanto

diferentes técnicas estão sendo aplicadas para a elucidação das reações em domínios e tempo diferentes e também ao mesmo tempo.

Recentemente, foi proposto que a cinética de reflexão modulada a 820 nm (MR_{820}), pode refletir a atividade do FSI (STRASSER et al., 2010; GAO et al., 2013), sendo que este parâmetros indica alterações no estado redox da plastocianina e do centro de reação do FSI (P_{700}) (OUKARROUM et al., 2009). Assim sendo, possível monitorar a atividade do FSI, durante as medições da fluorescência transiente ou rápida de modo simultâneo.

Papageorgiou e Govindjee (2011) ressaltam que a fluorescência transiente é importante para obter informações sobre os complexos de pigmentos, sua organização, transferência de energia de excitação entre eles, além das diversas reações de transferência de elétrons específicas do FSII. Entretanto, Goltsev et al., (2009), ressaltam que assim como as clorofilas do FSII, emitem luz denominada fluorescência transiente, também enviam outro tipo de luz chamada de decaída da fluorescência, como resultado da reversão da separação de carga, seguida pela transferência rápida da energia de excitação do P_{680}^* para as clorofilas do sistema antena (ZAHARIERA et al., 1999; STRASSER et al., 2010; OUKARROUM et al., 2013). Para distinguir os dois tipos de emissão de luz (região do infravermelho do espectro), a fluorescência transiente é medida simultaneamente com a iluminação, enquanto a decaída da fluorescência é medida depois que a luz actínica é desligada durante ciclos alternados de luz/escuro (GOLTSEV et al., 2009; GAO et al., 2013; OUKARROUM et al., 2013).

A decaída da fluorescência da clorofila excitada do sistema antena é formada como um resultado do retorno de transferência de elétrons e da recombinação de cargas no RC do FSII, seguida pela repopulação do estado excitado da clorofila (Chl^*)(excitação secundária) do sistema antena do FSII pela transferência de energia (GOLTSEV et al., 2009). A decaída da fluorescência existe porque em cada reação redox do transporte de elétrons fotossintético é reversível. De forma, um quantum de luz absorvido leva a formação do estado excitado da clorofila, transferência de energia para P_{680} e separação de cargas entre P_{680} e feoftina (Pheo). A separação de cargas no par $P_{680}^+Pheo^-$ pode recombinar-se, sendo que tal fato leva a formação de $P_{680}^*(Chl^*)$ novamente (GOLTSEV et al., 2005; 2009; STRASSER et al., 2010). Assim, a recombinação de cargas, que é o resultado do retorno do transporte de elétrons a partir de carreadores de elétrons no FSII, pode levar a formação de clorofilas secundariamente excitadas e a emissão da decaída da fluorescência. Desta forma, a análise da cinética da decaída da fluorescência permite a interpretação da formação de pares iônicos específicos formados durante o fluxo de elétrons entre os lados doador de elétrons (complexo de evolução de oxigênio) e acceptor de elétrons (Q_A e Q_B) do FSII.

Strasser et al., (2010) enfatizam que medidas simultâneas da fluorescência transiente, da decaída da fluorescência e a reflexão modulada a 820 nm, é imprescindível para a correlação total das informações sobre os distintos domínios da cadeia de transporte de elétrons. Em virtude dessa correlação, algumas pesquisas estão sendo realizadas para demonstrar a importância dessas análises simultâneas, utilizando principalmente compostos químicos artificiais, que podem doar ou aceitar elétrons em locais específicos na cadeia de transporte de elétrons (KATSUMATA, et al., 2006; LI e XING 2006; GAO et al., 2013; FARIAS, 2014).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento e componentes de produção de três genótipos de tomate 'Micro-Tom' com diferentes expressões da sHSP23.6 mitocondrial, bem como verificar o comportamento desses genótipos em situações estressantes de aplicação da radiação UV-C e do déficit hídrico.

CAPÍTULO 1

Crescimento e componentes de produção em plantas transformadas e não transformadas de tomate ‘Micro-Tom’ com diferentes expressões da sHSP23.6 mitocondrial

Resumo - O crescimento da planta de tomateiro depende de numerosos fatores, entre esses o genótipo. O tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill), da variedade Micro-Tom vem sendo considerado como um modelo para estudos experimentais, pois possui características que o tornam adequado, tais como o tamanho pequeno, tempo de geração curto, e facilidade de transformação. Modificações nas quantidades de certas proteínas têm proporcionado vários estudos, dentre as proteínas que vem sendo foco de pesquisas tanto animal quanto vegetal são as denominadas *heat shock proteins* (HSP), que possuem muitas formas, sendo a maioria constitutiva. Entretanto outras formas são induzíveis por algum determinado fator estressante. Avaliaram-se o crescimento e os componentes de produção em plantas de tomate ‘Micro-Tom’ transformadas para diferentes níveis de HSPs mitocondrial (MT-sHSP23.6). Plantas de três genótipos de tomate ‘Micro-Tom’ (não transformados, transformados com superexpressão e com silenciamento da expressão) foram cultivadas em condições controladas de temperatura, fotoperíodo e densidade de fluxo de fótons. Para a obtenção dos dados, foram efetuadas coletas sucessivas a intervalos regulares de tempo (21 dias) ao longo do ciclo de desenvolvimento das plantas, iniciando as coletas a partir do 21º dia após o transplante (DAT). A matéria seca total, área foliar, partição de massa seca entre órgãos da planta e os componentes da produção dos três genótipos foram determinados. Com a interpretação dos resultados verificou-se que as plantas transformadas com superexpressão da MT-sHSP23.6 apresentaram maior capacidade produtiva, considerando a massa fresca dos frutos, mas em geral os dados indicaram que a transformação genética não acarretou grandes mudanças no crescimento, pois os três genótipos tiveram comportamento similar.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* Mill, distribuição de matéria seca, produção de frutos.

Growth and yield components of transformed and non-transformed Micro-Tom tomato plants with different expressions of mitochondrial sHSP23.6

Abstract: Growth of tomato plant depends on numerous factors, the genotype is among them. Tomato plant (*Solanum lycopersicum* Mill), variety ‘Micro-Tom’ has been considered as a model because it has characteristics that make it suitable, such as small size, short generation time, and ease of transformation. Changes in the amounts of certain proteins have provided several studies. Among the proteins that have been focus of research, both animal and vegetable, are the heat shock proteins (HSP) showing many forms, most constitutive proteins. However other forms are inducible by some given stressor. We evaluated growth and components of production in ‘Micro-Tom’ tomato plants transformed into different levels of mitochondrial HSPs (MT-sHSP23.6). Plants of three genotypes of ‘Micro-Tom’ tomato (non-transformed, transformed with over-expression, and with silencing of expression) were grown under controlled conditions of temperature, photoperiod, and photon flow density. To obtain

the data we did successive collections at regular time intervals (21 days) throughout the development cycle of the plants, starting collections from the 21st day after transplantation (DAT). Total dry matter, leaf area, partitioning of dry weight of plant organs and production components of the three genotypes were determined. From the interpretation of results it was found that transformed plants with over-expression of MT-sHSP23.6 showed higher productive capacity, considering fresh fruit weight, but in general the data indicated that the genetic transformation did not cause major changes in growth, because the three genotypes showed similar behavior.

Keywords: *Solanum lycopersicum* Mill, dry matter distribution, fruit production

INTRODUÇÃO

A planta de tomateiro possui várias fases de desenvolvimento em seu ciclo de crescimento, sendo amplamente utilizada como modelo em várias áreas de pesquisa com plantas (MONTEIRO et al., 2012). Caracterizada por ter um genoma relativamente compacto (950 Mb), combinado com coleções ricas de germoplasma e protocolos de transformação altamente eficientes. Além disso, incluem outras características como: ser uma dicotiledônea, de folhas compostas, com o florescimento simpodial e com formação de frutos climatérios carnosos, tornando-o um modelo importante para pesquisas em fisiologia e genética de plantas (MEISSNER et al., 1997; VOGG et al., 2004; WANG et al., 2005; CARVALHO et al., 2011).

Um benefício adicional para o uso do tomateiro em experiências é a existência da variedade miniatura nomeada de 'Micro-Tom', criada para fins ornamentais (SCOTT e HARBAUGH, 1989). O tomateiro da variedade Micro-Tom vem se destacando como candidato ao sistema modelo dos tomates, mesmo apresentando mutações que causam o seu tamanho anão, com crescimento determinado. Tal característica é devido a duas mutações recessivas, a *selfpruning* (*sp*), que apareceram espontaneamente e que controlam o hábito de crescimento sendo uma delas alélica à mutação *dwarf* (*d*), que é um componente da via biossintética de brassinoesteróides, o que implica em níveis reduzidos de brassinoesteróides. No entanto, possui níveis endógenos adequados de ácido giberélico (GA), sendo assim, não é um mutante deficiente ou insensível à GA (MEISSNER et al., 1997; MARTÌ et al., 2006). Apesar dessas mutações naturais, esta variedade tem-se mostrado adequada como um genótipo padrão para a pesquisa com tomate, incluindo estudos de novas interações hormonais, além dos recursos genéticos disponíveis através da coleção de mutantes

da variedade Micro-Tom (MATHEWS et al., 2003; WATANABE et al., 2007; CARVALHO et al., 2010; 2011).

Meissner et al., (1997) consideram o tomate 'Micro-Tom' como planta modelo para a Família Solanaceae, por possuir características que o tornam adequado para o estudo experimental, tais como: o tamanho pequeno, cerca de 150mm de altura, permitindo o cultivo denso, ciclo de vida curto, com frutos e sementes viáveis, genoma pequeno e de fácil transformação, desta forma apropriado para a mutagênese em larga escala e a produção de plantas transgênicas (SUN et al., 2006; CARVALHO et al., 2010; PINO et al., 2010).

Desta maneira, a partir do uso de plantas transgênicas é possível explorar as variações genéticas e características agronômicas, proporcionando melhoramento das plantas cultiváveis (SUN et al., 2006; RIBAS et al., 2006; MATSUKURA et al., 2008; OKABE et al., 2012).

Muitos trabalhos demonstram que a perda de função ou a superexpressão de um gene podem trazer inúmeras vantagens, principalmente em espécies cultivadas (LANAHAN et al., 1994; WILKINSON et al., 1995; MURCHIE et al., 1999; BASSEL et al., 2008; FERNANDEZ et al., 2009; CARVALHO et al., 2011; OKABE et al., 2012; CHETTY et al., 2013; KHUONG et al., 2013). Sendo que a partir dessas linhagens (transgênicas), outros estudos fisiológicos poderão ser realizados, a fim de compreender o seu comportamento frente a diferentes situações, estressantes ou não.

Modificações nas quantidades de certas proteínas, de modo a alterar a expressão, em menor quantidade do que o habitual, ou com a expressão aumentada têm proporcionado vários estudos (QUEITSCH et al., 2000). Uma das proteínas que vem sendo foco de estudos, tanto animal quanto vegetal, são as denominadas *heat shock proteins* (HSP) (LIU e SHONO 1999; MICHILS et al., 2001; TERAQ et al., 2003; WANG et al., 2004; YUAN et al., 2009; PEGORARO et al., 2011). HSP são uma família de proteínas, que possuem muitas formas, sendo a maioria constitutiva, com papel citoprotetor, entretanto outras formas são induzíveis por algum determinado fator e, ou situações de estresse (LEE et al., 2000; SIDDIQUE et al., 2008; JACOBY et al., 2012; SANDOVAL-MONTIEL et al., 2013), bem como apresentam papel primordial no envolvimento com a termotolerância (LIN et al., 1984; RAMPINO et al., 2009).

A possível interação destas proteínas em determinadas situações, e muitas vezes comprovada, tem instigado o uso de genótipos que exibam um comportamento distinto em relação à indução e acumulação de transcritos para genes *HSPs* (GURLEY, 2000; CHO e HONG, 2006; HUTHER et al., 2013).

Entre esses genes, o gene *sHSP23.6*, que codifica uma proteína de baixo peso molecular (sHSP), de localização mitocondrial, tem contribuído para melhor caracterização dos mecanismos moleculares e fisiológicos, envolvidos nas suas diferentes funções (NICOLE e TANGUAY 1987; WILLETT et al., 1996; GURLEY 2000). Trabalhos relatam que este gene *sHSP23.6*, além de estar envolvido em situações de estresses, pode estar envolvido durante o processo de desenvolvimento, e estar localizado em diferentes órgãos da planta, e que durante os vários estádios de desenvolvimento seus níveis de expressão são variados, destacando-se pela sua expressão constitutiva (SARKAR et al., 2009; WATERS, 2013).

Desta maneira, a avaliação das plantas transformadas, em condições normais de crescimento, pode esclarecer como estas se comportam em relação ao desempenho e fixação de carbono, assim como na partição dos fotoassimilados e nos possíveis impactos que a transformação pode ocasionar no equilíbrio do crescimento.

Poorter e Gamier (1996) expõem que emprego da análise de crescimento das plantas, é possível descrever mudanças na produção vegetal em função do tempo. Assim, a análise de crescimento permite seguir a dinâmica da produção fotossintética avaliada por meio do acúmulo de matéria seca, pois o aumento da produtividade é determinado pela capacidade das plantas em produzir os fotoassimilados (URCHEI et al., 2000; THILAKARATHNE et al., 2013). O tomateiro apresenta várias fases de desenvolvimento em seu ciclo de crescimento, e em cada fase, a demanda por fotoassimilados é distinta. Desta maneira, isso interfere no local de alocação, sendo que o equilíbrio entre a fonte e o dreno são determinados por processos fisiológicos (THWE et al., 2013), contudo podem ser alterada pela interação ambientais - genótipo.

O objetivo do presente trabalho foi comparar o crescimento e componentes de produção de plantas de tomateiro da variedade Micro-Tom selvagem e as linhagens transgênicas que conferem diferentes níveis de expressão da MT-sHSP23.6 (*mitochondrial small heat shock proteins*).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill) da variedade Micro-Tom não transformadas e transformadas geneticamente para diferentes níveis de expressão de MT-sHSP23.6 mitocondrial, conforme descrito em Huther et al., (2013).

Sementes dos três genótipos foram colocadas em caixas tipo Gerbox®, após 7 dias quando as plântulas estavam desenvolvidas, foram transplantadas para vasos plásticos

(capacidade de 500 mm³) tendo como substrato areia. As plântulas foram colocadas em câmaras de crescimento com condições controladas: densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo na altura central das copas das plantas em torno de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 10 horas, e temperatura de $21 \pm 3^\circ\text{C}$. A irrigação foi realizada diariamente e, três vezes por semana, sendo usada solução nutritiva de Hoagland e Arnon, (1950).

Para a obtenção dos dados primários de área foliar e massa da matéria seca, foram efetuadas coletas sucessivas a intervalos regulares de tempo de 21 dias, iniciando as coletas no vigésimo primeiro dia após o transplante (DAT), totalizando seis coletas, com três repetições por genótipo e coleta. Em cada amostragem as plantas foram cortadas rente ao substrato, separadas em órgãos (folhas, caule, flores e frutos) e acondicionadas em sacos de papel. As raízes foram lavadas sobre peneira de malha fina com auxílio de água corrente

Em cada coleta foi determinada a área foliar e a massa seca das partes da planta (folha, pecíolo, caule, raízes, e partes reprodutivas quando presentes), e o número de frutos verdes e vermelhos.

A área foliar das lâminas verdes (A_f) foi determinada com medidor de área Li-Cor (Modelo Li-3100 – Li-Cor In., NE USA), e expressa em centímetros quadrados por planta ($\text{cm}^2 \text{planta}^{-1}$). A matéria seca de cada parte da planta foi obtida após a secagem em estufa de ventilação forçada a temperatura de $65 \pm 2^\circ\text{C}$, por pelo menos três dias, sendo considerada a matéria seca total o somatório da massa seca das partes das plantas. Para análise da partição de assimilados ao longo do desenvolvimento das plantas, a massa seca de cada parte da planta foi expressa em porcentagem em relação à massa seca total. O número de frutos (N_{fr}) foi determinado a partir da contagem direta de frutos por planta e massa fresca de frutos (W_{fr}), aferida em balança de precisão, imediatamente após a colheita.

Os dados primários de área foliar (A_f) ajustados por meio de polinômios ortogonais (RICHARDS, 1969); enquanto que os dados primários de matéria seca total acumulada (W_t) foram ajustados pela equação logística simples: $W_t = W_m / (1 + Ae^{-Bt})$, sendo “ W_m ” a estimativa assintótica do crescimento máximo, “ A ” e “ B ” constantes de ajustamento, “ e ” a base natural de logaritmo neperiano e “ t ” o tempo em dias após o transplante (RICHARDS, 1969).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A área foliar é um importante parâmetro relacionado à fotossíntese, sendo responsável pela interceptação da radiação luminosa, também está associada à manutenção do potencial hídrico da planta, balanço hormonal e de nutrientes.

As plantas transformadas apresentaram área foliar maior do que as plantas não transformadas (selvagem) (Figura 1). As máximas áreas foliar foram de: 369, 459 e 446 cm² planta⁻¹ respectivamente para plantas selvagem, com superexpressão da MT-sHSP23.6 e plantas do genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6, atingidos aos 106, 113 e 107 DAT. As plantas dos três genótipos mostraram A_f similar na fase inicial de crescimento, até aproximadamente 42 DAT. A seguir as plantas das linhagens transformadas tiveram maior taxa de crescimento de área foliar, resultando em maior área foliar máxima. Depois de atingido os valores máximos, a A_f foi reduzida caracterizando uma senescência foliar.

Fayad et al., (2001) abordam que uma estabilização e posterior queda na área foliar é causado pela senescência e abscisão foliar. Os mesmos autores citam que a área foliar do tomateiro híbrido EF-50, em ambiente protegido, atingiu seu auge aos 93 DAT e para a cv. Santa Clara ocorreu o declínio a partir dos 58 DAT. Segundo Lopes (2010) há diminuição a partir dos 74 DAT para o tomateiro híbrido SM-16, podendo ser explicada pela abscisão e senescência natural das folhas, ocorrências naturais ao aproximar-se o fim do ciclo da cultura, bem como pelo maior direcionamento dos fotoassimilados para as estruturas reprodutivas que passam a ser dreno preferencial da planta. Para Bezerra Neto e Nogueira (1999), a redução na área foliar pode estar associada à diminuição da extensibilidade da parede celular, que por sua vez depende especialmente do balanço hídrico das células do tecido foliar.

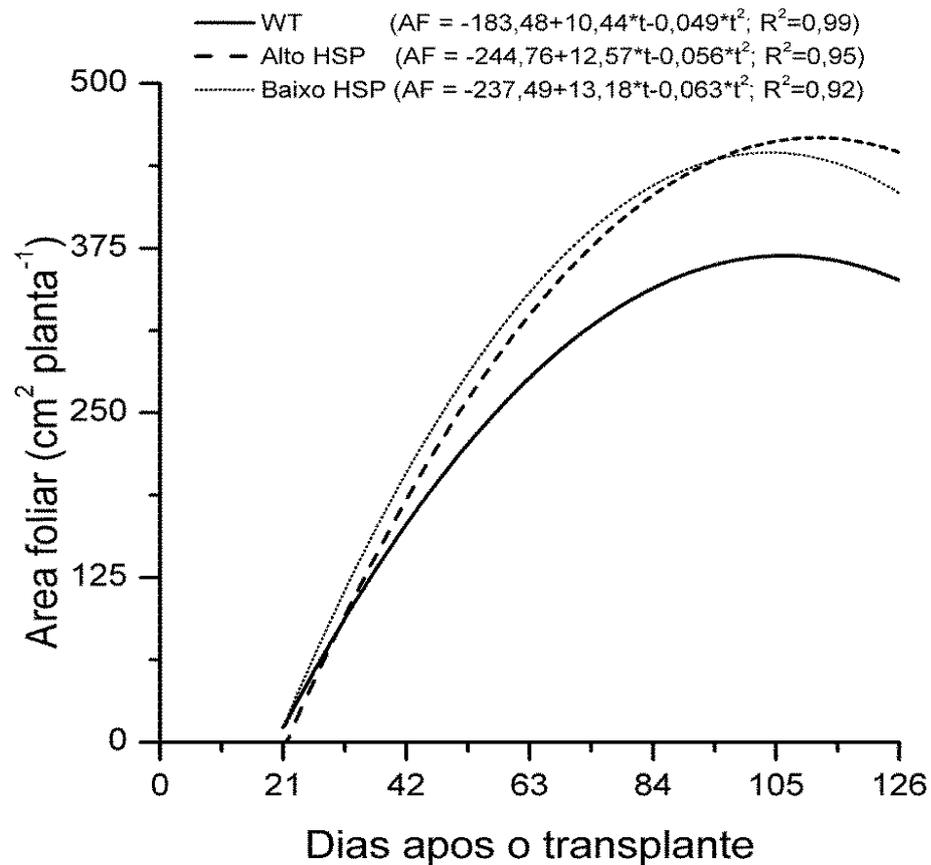


Figura 1- Área foliar ajustada, expressa em $\text{cm}^2 \text{ planta}^{-1}$, de plantas de tomate 'Micro-Tom' transformadas com superexpressão da MT-sHSP23.6 (Alto HSP); com silenciamento da MT-sHSP23.6 (Baixo HSP) e não transformada (WT) em função dos dias após o transplante.

Em relação ao acúmulo de massa seca total, verifica-se que nas três linhagens estudadas (selvagem e transformados), as plantas apresentaram um comportamento de acúmulo de massa seca total similar. Inicialmente, lento até aproximadamente 32 DAT, seguidos de uma fase de crescimento acentuado e posterior estabilidade no crescimento assintótico. Os valores máximos de massa seca total foram de 6147; 6728 e 6745 mg planta^{-1} respectivamente para plantas selvagem, com superexpressão da MT-sHSP23.6 e com silenciamento da MT-sHSP23.6 (Figura 2).

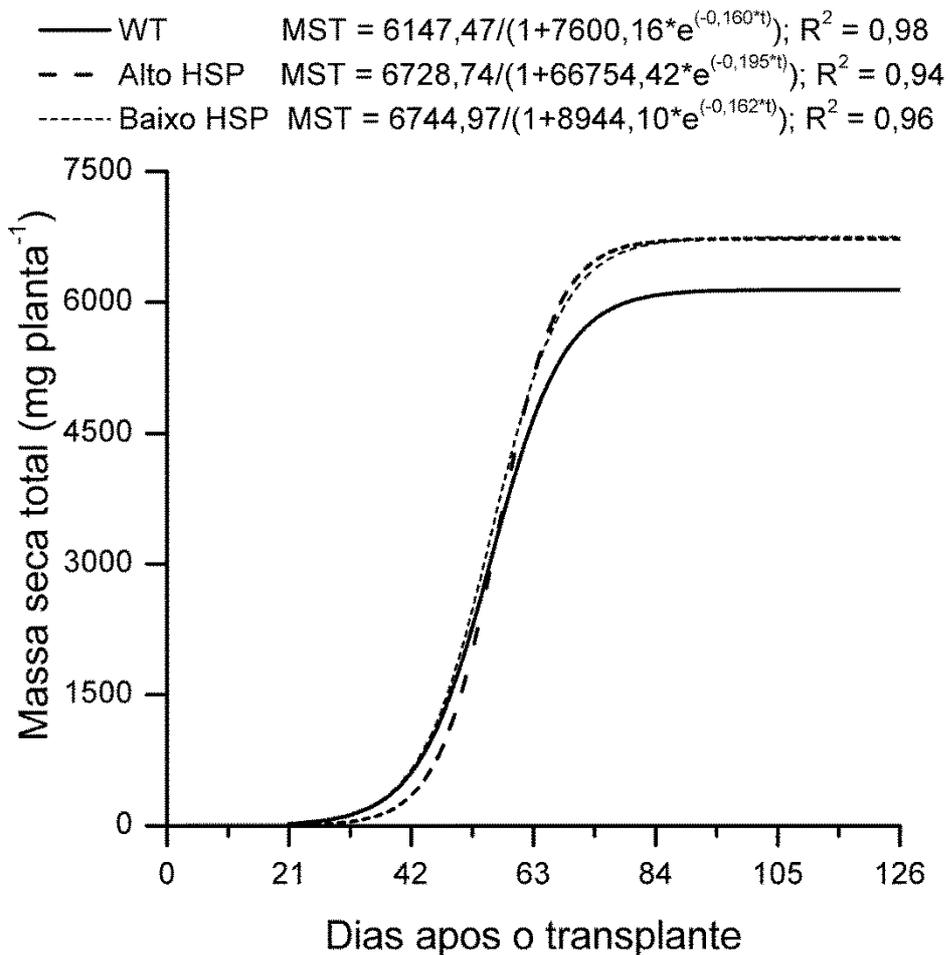


Figura 2 - Massa seca total ajustadas, expressa em mg planta⁻¹, de plantas de tomate 'Micro-Tom' transformadas com superexpressão da MT-sHSP23.6 (Alto HSP), com silenciamento da MT-sHSP23.6 (Baixo HSP) e não transformada (WT), em função dos dias após o transplante.

O crescimento inicial lento ocorre em virtude das plantas gastarem grande parte da energia para a fixação no solo, devido nesta fase as raízes serem o dreno preferencial dos assimilados quando comparada com a parte aérea, sendo o crescimento do sistema radicular nesta fase dependente dos fotoassimilados produzidos nas folhas (LOPES, 2010). Após a fase de crescimento lento, a planta passa ter como dreno principal a parte aérea e o crescimento é acelerado até atingir um valor máximo. No início, o crescimento é lento, pois depende da reserva energética contida na semente do tomate, posteriormente após o desenvolvimento do sistema radical e a emergência das folhas, tem um rápido crescimento (absorção de água, nutrientes e atividade fotossintética), e após atingir o tamanho definitivo entra na fase de senescência (MARTINS et al., 1985).

A partição de assimilados, expresso em percentagem de massa seca por órgãos, em plantas do tomateiro 'Micro-Tom', seguiu o mesmo padrão para todos os genótipos, de modo a apresentar uma distribuição de fotoassimilados nos diferentes órgãos das plantas, bem semelhante nas diversas datas de coletas (Figura 3).

Na primeira coleta, aos 21 DAT, a predominância de massa seca total da planta foi relacionada ao conteúdo de folhas, chegando a 70% do total para o genótipo selvagem (Figura 3A), em torno de 80% para o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 (Figura 3B), e aproximadamente 65% para o genótipo silenciado (Figura 3C). O restante da massa seca sendo dividido entre raiz e caule. No tomateiro 'SM-16, logo após o transplante até aos 14 DAT, as folhas se comportaram como fonte-dreno, uma vez que são responsáveis pela produção de fotoassimilados e também órgão de maior armazenamento (LOPES, 2010). Aos 42 DAT, cerca de 70% da matéria seca total das plantas do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 são alocadas no tecido foliar, sendo o restante distribuído entre caules e raízes, e para os genótipos selvagem e silenciado em torno de 60% compreendia a massa seca das folhas.

A partir de 63 DAT, houve a presença de inflorescências, e também frutos verdes, ou seja, a fase reprodutiva, nos três genótipos e permaneceram presentes até o final das análises. Com isso, é evidente que houve um deslocamento dos assimilados das folhas para as partes reprodutivas. Deste modo, a massa seca das folhas então começou a apresentar uma tendência de estabilização após os 63 DAT, até o final das análises. Para Lopes (2010), a estabilização no acúmulo de massa nas folhas ocorre, possivelmente em decorrência da fase da senescência se sobrepôr à emissão de novas folhas, episódio que ocorre em plantas de tomate com crescimento determinado.

No Brasil, ainda são poucos os trabalhos sobre a dinâmica da produção e alocação de biomassa em partes do tomateiro (LOPES, 2010). Caliman (2008) enfatiza que a produção das culturas é determinada pelo crescimento da planta pela alocação da biomassa para os órgãos de interesse comercial e a massa seca não se refere a uma única substância componente da planta, mas ao conjunto da matéria orgânica que é produzida para as atividades essenciais da fotossíntese e metabolismo das proteínas.

Heuvelink (1997) destaca que o estudo da distribuição da massa seca nas plantas, é importante para obter melhor compreensão da influência das frutas na partição de matéria seca entre estas e a parte vegetativa do tomateiro, com o propósito de determinar se a força geradora (fonte) é proporcional ao número de frutos por haste.

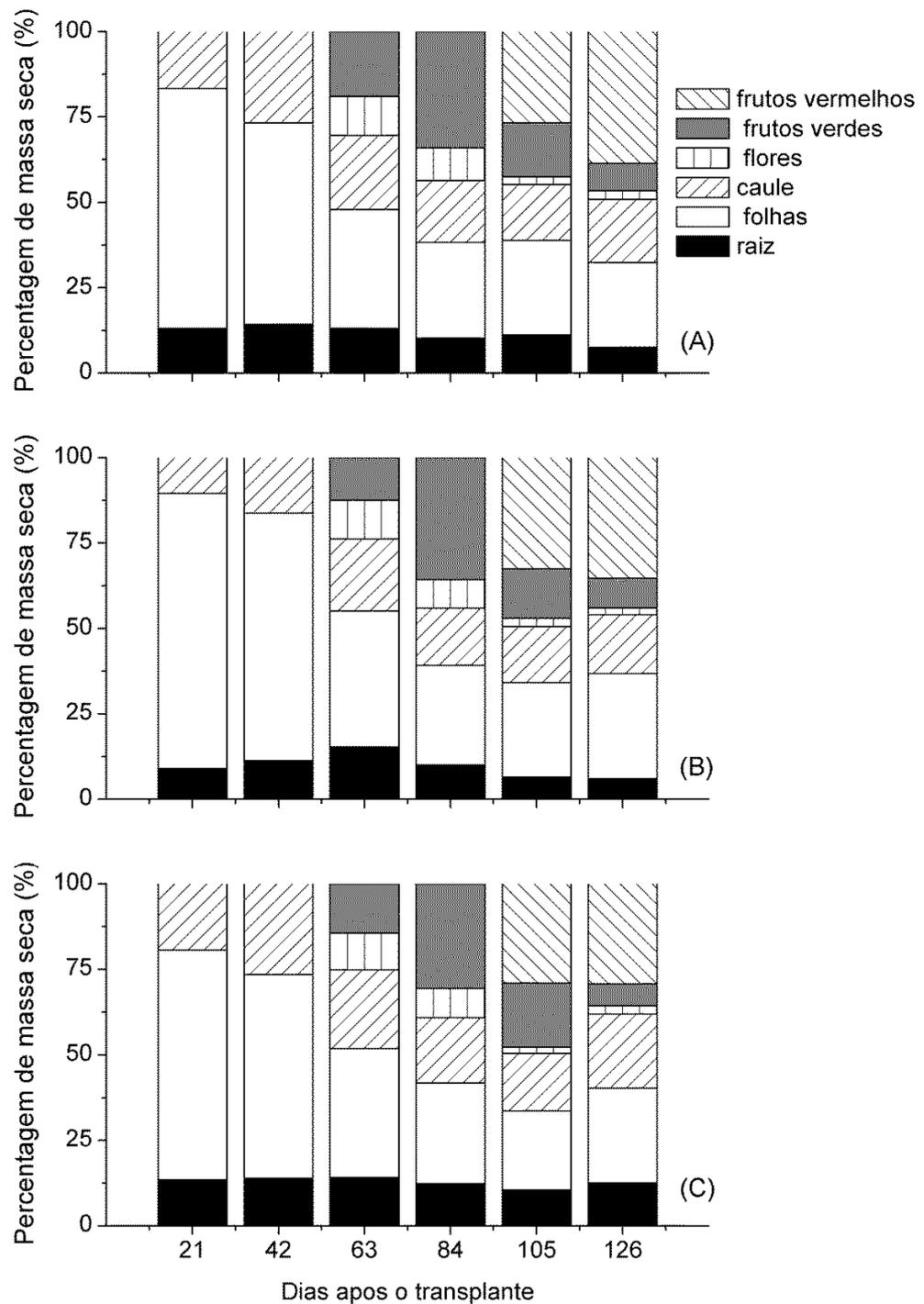


Figura 3- Partição de assimilados, expresso em porcentagem de massa seca por órgãos, de plantas de tomate 'Micro-Tom' transformadas com superexpressão da MT-sHSP23.6, com silenciamento da MT-sHSP23.6 e não transformada (selvagem), em função dos dias após o transplante.

Grande parte dos fotoassimilados produzidos é utilizada no crescimento, sendo parcial e temporariamente armazenados sob a forma de amido e açúcares, mas outra parte é exportada para outros órgãos da planta (LOPES, 2010). A produção de biomassa da planta é proporcional à disponibilidade de fotoassimilados, que por sua vez está relacionada, entre outros fatores, com a disponibilidade de energia luminosa ao dossel e a concentração de CO₂ (CALIMAN, 2008).

Em geral, o ciclo do tomateiro, pode ser dividido em três fases, conforme Alvarenga (2004): primeira fase que tem duração de quatro a cinco semanas (do transplântio até início do florescimento); segunda fase tem duração de cinco a seis semanas, iniciando com o florescimento e terminando no início da colheita dos frutos; e terceira fase vai do início ao final da colheita dos frutos.

Em estudos com o tomateiro Cereja Yubi, de hábito determinado, Albuquerque Neto e Peil (2012), afirmam que o desenvolvimento da parte vegetativa acontece separado temporalmente da parte generativa (frutos), isto é, a planta vegeta, floresce e frutifica em períodos sequenciados, apresentando altíssimo número de brotações laterais, as quais foram mantidas, perfazendo grande quantidade de massa seca para as folhas, inclusive se igualando a massa seca de outros órgãos da planta.

O crescimento mais vigoroso e a maior velocidade de emissão de folhas são nas hastes que estão localizadas logo abaixo das inflorescências, certamente constituem estratégias da planta do tomateiro para maximizar a translocação de fotoassimilados para o crescimento dos frutos (PIVETTA et al., 2007).

No dossel do tomateiro, as folhas possuem em torno de 36% da massa seca, correspondente ao amido (EDWARDS et al., 2010). Estes autores também abordaram que para as próximas camadas e/ou camadas abaixo do dossel, as folhas apresentam um declínio no teor de amido, em comparação com as folhas da copa e que estes baixos níveis de amido nas folhas inferiores indicam que possivelmente em grande parte utilizado para o crescimento dos frutos. Depois da floração, o fruto começa a se desenvolver e crescer, e conseqüentemente o acúmulo de massa seca na parte aérea começa a ocorrer nos frutos (PIVETTA, et al., 2007). Lopes (2010) descreve que ramos, inflorescências e frutos se comportam como dreno, entretanto, os frutos são o dreno preferencial da planta, ocorrendo assim um direcionamento dos assimilados das folhas para os frutos de maneira intensa, como decorrência da predominância da fase reprodutiva sobre a fase vegetativa.

Desta forma, ainda em relação à distribuição de massa seca por partes na planta, a partir dos 105 DAT das mudas, os tomateiros de todos os genótipos apresentaram frutos

vermelhos, equivalendo aproximadamente em torno de 30 a 35% para todos os genótipos em relação à massa seca, não ultrapassando os 50% dos valores de percentagem de massa seca da planta, somente para frutos, diferindo dos valores observados por Fayad et al., (2001), em tomateiros EF-50 e cv. Santa Clara, que verificaram ao final do ciclo, do total de massa seca produzida pela planta, 68% e 51% estavam, respectivamente, presentes nos frutos.

Em se tratando de uma variedade chamada de 'Micro-Tom', subentende-se que o fruto é em menor proporção, comparando com as demais variedades presentes no mercado. Isto demonstra que esta variedade é mais evidenciada como modelo genético, para a família Solanaceae, do que voltada para a produção de frutos, mesmo que esta variedade apresente frutos viáveis (MEISSNER et al. 1997;FAYADet al., 2001; 2002; MARTÌ et al., 2006).

De acordo com Albuquerque Neto e Peil (2012), os genótipos pertencentes ao grupo de mini tomates tem maior partição proporcional de matéria seca para a formação de folhas, em prejuízo para a formação dos frutos, quando comparados com os genótipos de frutos maiores. Também foi perceptível que nas últimas análises deste experimento, foi alcançada uma distribuição quase constante de matéria seca, o que pode ser descrita por uma função do tipo de saturação do número de frutos retidos por haste.

A avaliação e classificação da coloração dos frutos de tomate foi proposta por Pratt e Workman (1962) que estipularam uma escala de coloração, divididas em cinco categorias: verde-imaturos (quando estão em fase de crescimento), verde-maduros (quando adquirem o tamanho máximo) e a capacidade de amadurecer, "breaker" (quando houver pigmentação amareloavermelhada em até 20% da superfície), vermelhos (quando ficam completamente avermelhados) e senescentes (quando apresentam amolecimento avançado). Mas neste trabalho somente utilizou-se duas classificações, frutos verdes (verde-imaturos e verde-maduros) e frutos vermelhos ("breaker", vermelhos e senescentes).

No presente experimento as plantas de todas as linhagens apresentaram frutos verdes somente a partir da terceira análise, aos 63 DAT (Figura 4A), e o auge da produção foi aos 84 DAT, depois se manteve com produção comparada ao início das análises, e apresentando ao final, pequena redução na quantidade de números de frutos verdes por genótipo. Com relação aos frutos vermelhos, estes estavam presentes a partir de 105 DAT e manteve-se uma média de amadurecimento em todos os genótipos até o final do experimento (Figura 4C).

A partir do 105 DAT foi verificado a massa fresca dos frutos de tomate vermelhos, e entre os três genótipos, o que se destacou foi o genótipo superexpressão da MT-sHSP23.6, fato observado também aos 126 DAT, onde as plantas não transformadas também se igualaram as plantas com superexpressão da MT-sHSP23.6 (Figura 4D). Para a massa fresca

dos frutos verdes, a maior massa fresca culminou com a maior produção de números de frutos verdes, aos 84 DAT, e o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 apresentou maior massa, o mesmo verificado na massa fresca do tomate vermelho deste genótipo. A diminuição da massa fresca dos frutos verdes coincidiu com a diminuição do número de frutos verdes, durante o ciclo de produção de frutos ao longo das análises (Figura 4B).

O crescimento dos frutos de tomate implica um processo de fluxo irreversível (GAO et al., 1998), sendo um poderoso dreno de carboidratos (ALMEIDA, 2012), e como um rendimento elevado de frutos, é desejável, então uma distribuição elevada de biomassa para os frutos é importante, além da diminuição do número de frutos por planta, (HEUVELINK, 1997), com o propósito de adquirir uniformidade dos frutos.

Vale ressaltar, também, que em todos os genótipos os frutos desenvolveram normalmente a coloração avermelhada, bem como as demais características, como a evolução de aromas e amolecimento. A coloração avermelhada no tomate maduro é devido à farta quantidade de licopeno e este varia conforme o tipo e o grau de amadurecimento dos tomates, podendo, também, ser encontrado nos produtos derivados do tomate e por se tratar de um carotenóide, o licopeno se encontra em maiores quantidades na casca dos alimentos, aumentando consideravelmente durante seu amadurecimento (SHAMI e MOREIRA, 2004).

Os frutos oriundos de plantas transformadas não apresentaram ciclo de maturação diferenciado daquele verificado em frutos não transformados, mesmo fato verificado por Chaves et al., (1998), relatando que quando amadurecidos nas plantas, os frutos de tomate cv. Kadá, oriundos de plantas transformadas (ACC oxidase em orientação *antisense*) não apresentam ciclo de maturação significativamente diferenciada daquele verificado em frutos não transformados, mas os transformados se comportavam de maneira diferenciada quando os frutos são colhidos no estágio verde-maduro e amadurecidos à temperatura de $20 \pm 5^\circ\text{C}$, apresentando um retardo da maturação.

Assim, analisando esses genótipos, verificou-se que o silenciamento do gene, para essa proteína não interferiu na estabilidade do crescimento. A presença da proteína codificada pelo gene *MT-sHSP23.6*, também não acarretou em maiores benefícios para as plantas. Isto é, na maioria dos resultados analisados os genótipos, tanto transformados, como não transformados, obtiveram dados similares, não demonstrando assim que os diferentes níveis dessa proteína fosse algo prejudicial para o crescimento adequado desse tomateiro.

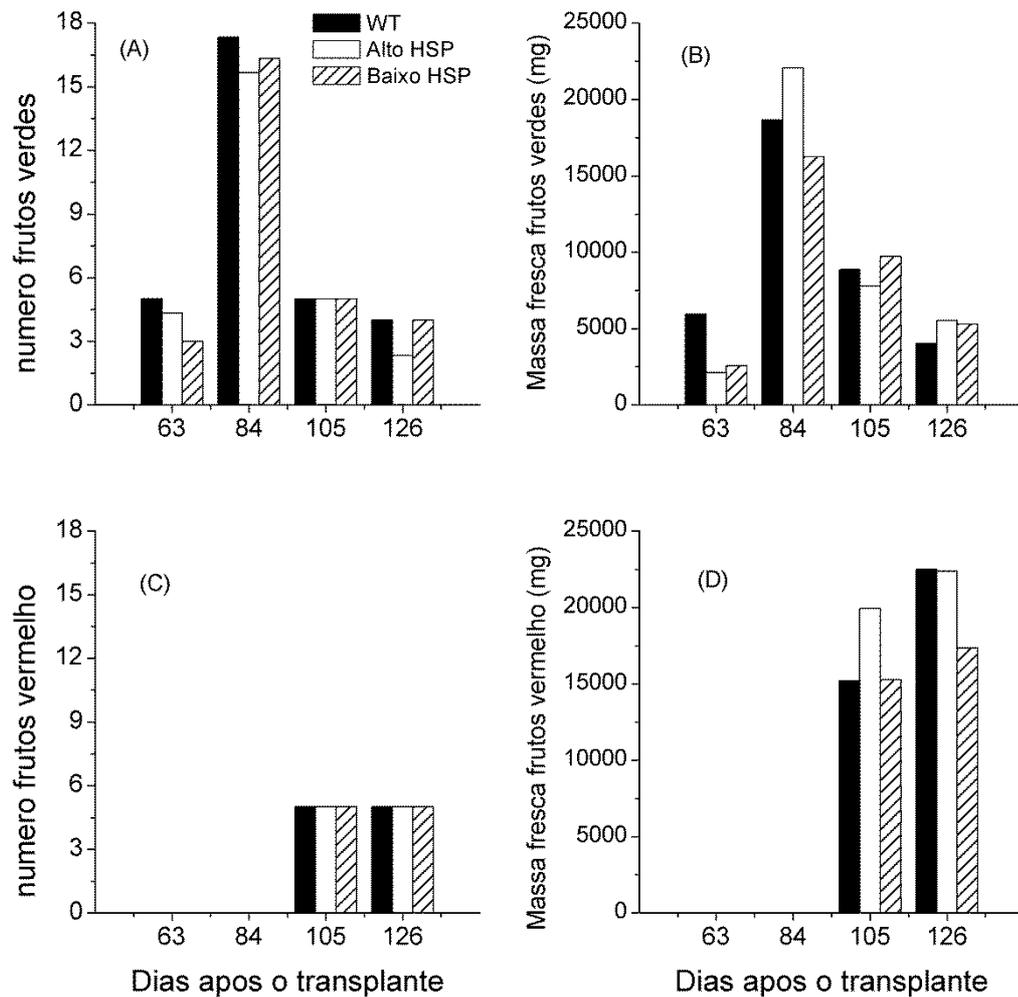


Figura 4 - Número de frutos verde (A), massa fresca de frutos verde, expressa em mg planta^{-1} (B), número de frutos vermelhos (C) e massa fresca de frutos vermelhos, expressa em mg planta^{-1} de plantas de tomate 'Micro-Tom' transformadas com superexpressão da MT-sHSP23.6 (Alto HSP) com silenciamento da MT-sHSP23.6 (Baixo HSP) e não transformada (WT), em função do tempo após o transplante.

CONCLUSÕES

A área foliar dos genótipos transformados foi maior do que as plantas não transformadas e para os componentes de produção, o genótipo mais produtivo, foi o com superexpressão da MT-sHSP23.6, levando em consideração a massa fresca dos frutos.

As plantas transformadas geneticamente do tomateiro 'Micro-Tom', comportaram-se de modo similar para a análise de massa seca total e em relação à partição de assimilados.

CAPÍTULO 2

Radiação UV-C aplicada em plantas transformadas e não transformadas de tomate 'Micro-Tom' com diferentes expressões da sHSP23.6 mitocondrial

Resumo – A radiação ultravioleta juntamente com outras condições ambientais podem facilmente perturbar a transferência de energia, no entanto há pouca informação pormenorizada sobre como a radiação UV-C influencia a capacidade fotossintética em plantas. Estudos experimentais, principalmente com plantas modelo são fundamentais, e a variedade de tomate Micro-Tom vem sendo utilizada como planta modelo. Diferentes transformações para a expressão de proteínas HSPs (*heat shock proteins*), são alvo constantes de pesquisas, pois essas são expressas tanto de forma constitutiva quanto em situações de estresse. Neste experimento utilizaram-se dois genótipos transformados para diferentes níveis de HSPs mitocondrial (MT-sHSP23.6). Um genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 e, outro silenciado, além do não transformado. Essas plantas de tomateiro Micro-Tom foram cultivadas em casa de vegetação, com temperatura e umidade controlados. O experimento foi conduzido em dois ensaios, no primeiro a aplicação da radiação UV-C foi realizado apenas uma vez quando as plantas encontravam-se em estágio vegetativo pleno e no segundo ensaio a aplicação da radiação UV-C foi efetuada no início do estágio reprodutivo, sendo que as plantas foram submetidas a uma segunda dose de radiação UV-C 10 dias após a primeira aplicação. Cada aplicação de radiação durou dois minutos e com uma dose de $0,5 \text{ kJ.m}^{-2}$. Foi avaliado o índice de clorofila, fluorescência transientes das clorofilas e trocas gasosas após a aplicação da radiação UV-C. No primeiro ensaio as avaliações foram realizadas após 16, 64, 168 e 336 horas após a aplicação da radiação UV-C. Para o segundo ensaio as avaliações foram realizadas após 16, 64 e 168 horas após a primeira aplicação de UV-C e 16, 64 e 168 horas após a segunda aplicação. Por meio da interpretação dos resultados pode-se verificar que nas condições deste experimento, para as análises de fluorescência transiente, em cada ensaio, os genótipos apresentaram comportamentos distintos entre si, mas analisando em conjunto os dois ensaios, obtiveram desempenho próximo aos do primeiro ensaio. No entanto observou-se que a segunda aplicação da radiação acarretou maiores danos principalmente em relação à taxa assimilatória líquida. Desta forma, observou-se que em ambos os ensaios, a superexpressão dessa proteína não contribuiu de maneira significativa para proporcionar melhor desempenho diante da exposição à radiação UV-C, e o silenciamento da MT-sHSP23.6 não culminou em maiores danos as atividades fotossintéticas.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* Mill, radiação ultravioleta, estresse abiótico.

UV-C Radiation applied to transformed and non-transformed ‘Micro-Tom’ tomato plants with different expressions of mitochondrial sHSP23.6

Abstract: Ultraviolet radiation along with other environmental conditions can easily disrupt the transfer of energy, however, there is little detailed information on how UV-C radiation influence on photosynthetic capacity in plants. Experimental studies, mainly with model plants, are fundamental and ‘Micro-Tom’ variety has been used as a model plant. Different transformations for the expression of HSPs proteins (heat shock proteins) have been constant target of research, because they express both in constitutive form and in stressful situations. In this experiment we used two genotypes transformed for different levels of mitochondrial HSPs (MT-sHSP23.6), a genotype with over-expression of MT-sHSP23.6 and a silenced one, besides that non-transformed. These ‘Micro-Tom’ tomato plants were grown in a greenhouse, under conditions of controlled temperature and humidity. Two trials were conducted during the experiment, in the first the application of UV-C radiation was only performed once, when the plants were in plain vegetative stage; in the second trial the application of UV-C radiation was performed at the beginning of the reproductive stage; the plants were submitted to a second dose of radiation UV ten days after the first application. Each application lasted two minutes, at a dose of 0.5 kJ m^{-2} . Chlorophyll index, chlorophyll transient fluorescence, and gas exchanges were evaluated after application of UV-C radiation. In the first trial, we did evaluations at 16, 64, 168, and 336 hours after application of UV-C radiation. In the second trial evaluations were done at 16, 64, 168 hours after the first application of UV-C and at 16, 64, 168 hours after the second application. From interpreting the results we could verify that in this experiment conditions, for the analysis of transient fluorescence in each trial, the genotypes showed different behavior between them, but analyzing both trials together they showed a performance close the first trial. However it was observed that the second application of radiation caused major damage, especially to net assimilation rate. We noticed that in both trials the over-expression of this protein did not contribute significantly to provide a better performance before exposure to UV-C, and the silencing of MT-sHSP23.6 did not result in major damage to the photosynthetic activities.

Key words: *Solanum lycopersicum* Mill, ultraviolet radiation, abiotic stress.

INTRODUÇÃO

A manutenção e amplificação do rendimento das culturas cada vez mais vêm sendo o alvo de pesquisas, em virtude do crescente aumento da população humana, visando com isso proporcionar o fornecimento de suprimentos alimentícios (MISHRA et al., 2012).

Fatores ambientais são frequentemente associados à diminuição dos rendimentos das culturas, pois dependendo do fator estressante e do tempo de exposição, pode afetar ao extremo o crescimento e desenvolvimento dos vegetais (WALTERS, 2005; TAKEDA e

MATSUOKA, 2008; AHUJA et al., 2010; PEGORARO et al., 2011; VOGAN e SAGE, 2011; XUE et al., 2014).

Considerando que as plantas são sésseis, essas elas sofrem forte pressão seletiva para se adaptar ao seu ambiente (FISCHER et al., 2011). Desta forma, as plantas estão constantemente evoluindo para responder às mudanças ambientais (WALTERS, 2005; OSBORNE, 2013). A evolução e adaptação das plantas a condições adversas vão desde processos de desenvolvimento em longo prazo, que ocorrem em nível de toda a planta ou pequenos ajustes em estruturas individuais, que podem variar de segundos a horas (WALTERS, 2005).

Existe uma série de fatores que podem afetar a produção de culturas agrícolas, dentre estes fatores a radiação ultravioleta (UV) (DE MENEZES SILVA et al., 2011), que corresponde a 5% da radiação solar (BALOGH et al., 2011). A radiação ultravioleta é convencionalmente dividida em três comprimentos de onda (UV-A, UV-B e UV-C), sendo que a radiação UV-C na faixa compreendida entre 200-280 nm é extremamente nociva para os organismos vivos (RAHIMZADEH et al., 2011). A radiação UV-C é absorvida na estratosfera da Terra, durante o processo de formação das moléculas de ozônio, reduzindo assim, o seu acesso na superfície terrestre (DANON e GALLOIS, 1998; DALOSO et al., 2009).

Atualmente uma das preocupações ambientais é a redução na espessura da camada de ozônio (redução no ozônio atmosférico), que serve de filtro natural ao planeta que resulta no bloqueio da maior incidência de radiação ultravioleta na superfície terrestre. Isso fez surgir na comunidade científica preocupações quanto a um possível aumento na intensidade da radiação ultravioleta sobre a superfície terrestre (KIRCHHOFF et al., 2000; KOVÁCS e KERESZTES, 2002; GILBERT et al., 2004).

Nas plantas a radiação UV interage de forma complexa, apresentando efeitos prejudiciais (inibitórios) ou de regulação (fotomorfogênese) (GILBERT et al., 2004). A radiação UV-C, no comprimento de onda de 254 nm em baixas doses, vem sendo utilizada experimentalmente para reduzir a incidência de doenças em produtos vegetais, por possuir ação “germicida” (BASSETTO et al., 2007; TIECHER et al., 2010a). Porém, é possível que atue como estressor abiótico, ativando mecanismos de defesa dos tecidos vegetais, que é resultado da indução do metabolismo secundário, especialmente síntese de compostos fenólicos e carotenóides, envolvidos na proteção ao estresse oxidativo (TIECHER, 2010b). Rai et al., (2011) sugerem que a radiação UV-C é mais prejudicial que a radiação UV-B para as plantas, por possuir um potencial toxicológico a curto prazo. Estes autores também

observam uma alteração nas respostas de crescimento e biomassa, bem como no conteúdo de pigmentos, impulsiona a atividade de enzimas antioxidantes, entretanto aumenta a produção de metabólitos secundários. Em relação à fotossíntese, Rahimzadeh et al., (2011) destacam que a radiação UV provoca uma redução da capacidade fotossintética, causando fotoinibição, danos no fotossistema II, além de alterações nos níveis de pigmentos e redução no crescimento.

Quando a planta é exposta a radiação ultravioleta, sinaliza que há muita luz, potencializando o surgimento de manchas nas folhas, que pode variar entre as cores violeta e tons arroxeados, entretanto a quantidade e proporção dos danos causados pela radiação UV é dependente da duração e intensidade da exposição (BURGER e EDWARDS, 1996). No entanto, a sensibilidade das culturas à radiação UV-B ou UV-C varia de acordo com os estádios de desenvolvimento das culturas (RAI et al., 2011).

Deste modo, as variações nos níveis de luz, como a radiação UV, podem juntamente com outras condições ambientais facilmente perturbar a transferência de energia nos fotossistemas (OU et al., 2012). A lesão direta nas folhas causada por UV possui grande impacto na assimilação dos recursos ambientais (THWE et al., 2013), sendo que o complexo de evolução do oxigênio (CEO) no fotossistema II é o local mais sensível em plantas de tomate e cevada quando expostos a radiação UV-B (GILBERT et al., 2004; 2009).

Em condições estressantes, uma adaptação importante para garantir possível tolerância é a expressão de certas proteínas que podem interagir com outras proteínas de forma adequada, visto que em condições de estresse a desordem de um sistema ou em compartimentos celulares aumenta gradativamente com o decorrer dos estresses (FEDER e HOFMANN, 1999; WATERS e VIERLING, 1999; PEGORARO et al., 2011). Essas proteínas denominadas de HSPs possuem várias funções que ainda não são conhecidas (HU et al., 2009; WATERS, 2013; XUE et al., 2014).

A maioria das HSPs é codificada por genes nucleares, mas sua localização pode ser em diferentes compartimentos da célula (PEGORARO et al., 2011). Além disso, é provável que os papéis específicos destas sejam determinados pela sua localização, podendo inclusive desempenhar ação sinérgica com as demais HSP de diferentes massas moleculares (LENNE e DOUCE, 1994; LENNE et al., 1995; BROCCHERI e KARLIN, 2000; SULE et al., 2004). As HSPs são expressas em certos estádios de desenvolvimento, sendo constitutivamente expressas e alguns tipos de HSPs são intensamente expressos somente quando o organismo enfrenta agressões ambientais (VIERLING, 1991; LENNE et al., 1995; WATERS, 2013).

Sendo assim, o uso de mutantes e, ou plantas transgênicas que apresentem diferenças na quantidades dessas proteínas ou uma proteína específica da classe destas HSPs, tem

contribuído muito para aumentar o conhecimento a respeito das bases fisiológicas relacionadas aos estresses ambientais em plantas (LENNE e DOUCE, 1994; LENNE et al., 1995; HONG e VIERLING, 2000; QUIETSCH et al., 2000; KATIYAR-AGARWAL et al., 2003; GAO et al., 2008, HUTHER et al., 2013).

Como o mitocôndrio é alvo importante e regulador de respostas ao estresse, torna-se evidente que uma variedade de genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais, respondama uma ampla gama de condições de estresses (van AKEN et al., 2009; MILLAR et al., 2011; JACOBY et al., 2012). Noguchi e Yoshida (2008) fundamentam baseados em avanços recentes na compreensão sobre a interação metabólica entre cloroplastos e mitocôndrias, porém mais estudos são necessários para compreender a relação entre os movimentos dinâmicos e interações metabólicas, visto que essas organelas são frequentemente localizadas de forma adjacentes (van AKEN et al., 2009; SAGE e SAGE, 2009; LIERE et al., 2011, MILLAR et al., 2011; SCHWARZLÄNDER et al., 2011; BUSCH e SAGE, 2013).

Atualmente técnicas de análises de trocas gasosas e da cinética de emissão da fluorescência de clorofila são metodologias que constituem ferramentas fundamentais para prever e avaliar a resposta do aparato fotossintético a determinados estresses (MISHRA et al., 2012). Podendo avaliar vários aspectos como as mudanças na fase fotoquímica e em processos não fotoquímicos, associando ao transporte de elétrons, dissipação de calor e a fixação de CO₂ (OUKARROUM et al., 2007; GUIDI e CALATAYUD, 2014). Ou et al., (2012), citam que há poucas informações detalhadas sobre como a radiação UV-C influencia a capacidade fotossintética, evidenciando a importância de técnicas não-destrutivas em estudos sobre o comportamento de plantas sob condições sub-ótimas de vida.

O objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos que a radiação UV-C apresenta sobre a atividade fotossintética, nos estádios vegetativo e reprodutivo em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill.), da variedade Micro-Tom, selvagem e com diferentes níveis de expressão da MT-sHSP23.6.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill), da variedade Micro-Tom não transformadas e transformadas geneticamente para diferentes níveis de expressão de MT-sHSP23.6 mitocondrial, conforme descrito em Huther et al., (2013).

Sementes dos três genótipos foram semeadas em caixas tipo Gerbox®, e após 7 dias quando as plântulas estavam desenvolvidas, foram transplantadas para vasos plásticos de 500 mm³ tendo como substrato composto orgânico. As plântulas foram colocadas em casa de vegetação com temperatura controlada em aproximadamente 20±3°C e irrigação. A irrigação sendo realizada diariamente e, três vezes por semana, foi aplicada solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950).

O experimento foi conduzido em dois ensaios, no primeiro a aplicação da radiação UV-C foi realizada apenas uma vez quando as plantas apresentavam-se no estágio vegetativo pleno (56 dias após a semeadura - DAS). No segundo ensaio a aplicação da radiação UV-C foi efetuada no início do estágio reprodutivo (64 DAS), sendo que as plantas foram submetidas a uma segunda dose de radiação UV-C 10 dias após a primeira aplicação. O tratamento controle foi considerado aquele em que as plantas permaneceram sem aplicação da radiação UV-C.

A aplicação da radiação UV-C foi realizada em câmara de cor escura contendo no seu interior quatro lâmpadas germicidas (Phillips® 30W), com comprimento de onda de 254 nm, sendo realizadas ao entardecer ou após as 18 horas. A densidade de fluxo de radiação emitida foi mensurada com medidor de luz ultravioleta digital (RS-232 Modelo MRUR-203, Instrutherm®). As plantas foram dispostas aleatoriamente no interior da câmara e mantidas durante 2 minutos, sendo expostas a uma dose de 0,50 kJm⁻². A parte área das plantas permaneceu a uma distância de aproximadamente 250mm das lâmpadas, e após a aplicação da radiação as plantas retornaram à casa de vegetação.

O índice de clorofila, fluorescência transiente das clorofilas e trocas gasosas foram avaliados após a aplicação da radiação UV-C. No primeiro ensaio as avaliações foram realizadas após 16, 64, 168 e 336 horas após aplicação da radiação UV-C. Para o segundo ensaio as avaliações foram realizadas análises após 16, 64, 168 horas após a primeira aplicação de UV-C e 16, 64, 168 horas após a segunda aplicação.

Os teores de clorofila foram determinados, utilizando-se um medidor portátil de clorofila (CL-01 Hansatech Instruments Ltda., King's Lynn Norfolk, UK), conforme descrito por Cassol et al., (2008), e expressos pelo índice de clorofila e as folhas utilizadas foram às mesmas da medida da fluorescência da clorofila *a*.

A fluorescência transiente OJIP foi medida nas primeiras folhas jovens completamente expandidas não destacadas, previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos utilizando um fluorômetro portátil (Modelo Handy PEA, Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK); após o período de escuro um flash de $3.400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi aplicado para a indução da fluorescência transiente OJIP. As intensidades de fluorescência transiente foram medidas entre $50 \mu\text{s}$ (fluorescência inicial - F_0) e 1 s; obtidos os valores da fluorescência transiente foram calculados os parâmetros do Teste JIP proposto por Strasser e colaboradores (STRASSER e STRASSER, 1995; TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2008).

Para as trocas gasosas foram usadas sempre as mesmas folhas durante todo as avaliações, sendo utilizadas as folhas expandidas imediatamente abaixo das folhas em que foram realizadas as medidas de fluorescência. Para esta análise utilizou-se um analisador portátil a infravermelho de CO_2 (modelo LI-6400XT LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA), com densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo de $1.200,0 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração de CO_2 no interior da câmara de $380 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$, as medidas foram realizadas entre as 09:30 e 11:00 horas. As variáveis medidas foram: taxa assimilatória líquida de CO_2 (A , $\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$); condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$); e concentração intercelular de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, cinco repetições por tratamento para as trocas gasosas e 10 repetições por tratamento para o índice de clorofila. As médias dos parâmetros de trocas gasosas e índice de clorofila foram comparadas pelo Teste Tukey ($p < 0,05$). Quando ocorreu interação significativa entre os fatores (aplicação de UV-C e intervalo de tempo após a aplicação) foi realizado o desdobramento para avaliar o efeito da radiação UV-C em cada período ou intervalo de tempo depois da aplicação da radiação. Para as determinações de fluorescência da clorofila *a* foram utilizadas 10 repetições por tratamento, utilizando duas medidas por planta, totalizando 20 medidas por tratamento.

RESULTADOS

Ensaio 1–Efeito da aplicação da radiação UV-C durante o estágio vegetativo sobre características fotossintética em plantas transformadas e não transformadas de tomate ‘Micro-Tom’ com diferentes expressões da sHSP23.6 mitocondrial

Índice de clorofila

Os valores do índice de clorofila das plantas dos genótipos de tomate ‘Micro-Tom’ no estágio vegetativo estão representados na Tabela 1. Não foi observada interação significativa entre os genótipos e o tempo após aplicação do estresse.

Nos genótipos com silenciamento da MT-sHSP23.6 e no genótipo selvagem o tratamento com aplicação de UV-C diminuiu o índice de clorofila em relação ao controle, em 11,22% e 18,73% respectivamente. Entretanto, o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 foi insensível ao tratamento UV-C. Assim, o tratamento com radiação UV-C, nas condições experimentais acima descritas interferiu no índice de clorofila apenas nos genótipos com silenciamento da MT-sHSP23.6 e no selvagem.

Tabela 1 - Índice de clorofila, unidade relativa, de plantas de tomate ‘Micro-Tom’, tipo selvagem, com superexpressão da MT-sHSP23.6 e com silenciamento da MT-sHSP23.6, submetidas a uma dose de radiação UV-C no estágio vegetativo

Genótipo	Estresses	Tempo após aplicação do estresse				Média fator estresse
		16h	64h	168h	336h	
Selvagem	Controle	10,16 a*	12,06 a	11,18 a	12,09 a	11,37 A
	UV-C	9,48 a	9,44 a	8,79 a	9,21 a	9,24 B
	Média fator tempo	9,78 a	10,6 a	9,91 a	10,65 a	
Genótipo com superexpressão da MT- sHSP23.6	Controle	8,26 a	7,54 a	7,82 a	8,14 a	7,94 A
	UV-C	8,09 a	9,23 a	7,72 a	8,64 a	8,42 A
	Média fator tempo	8,18 a	8,38 a	7,77 a	8,39 a	
Genótipo com silenciamento da MT- sHSP23.6	Controle	9,91 a	9,64 a	11,54 a	10,85 a	10,42 A
	UV-C	9,78 a	9,06 a	9,2 a	8,96 a	9,25 B
	Média fator tempo	9,84 a	9,35 a	10,24 a	9,85 a	

* Médias comparadas dentro de cada genótipo e seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% (n=10). Letras minúsculas comparações na linha, e maiúsculas na coluna.

Fluorescência transiente da clorofila a

Em todas as plantas, a intensidade de fluorescência da clorofila *a* mostrou uma típica curva em função do tempo, e a partir das intensidades de fluorescência medidas foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP. A lista de alguns parâmetros encontra-se na Tabela 2.

O efeito da radiação UV-C aplicada sobre os genótipos de tomate da variedade Micro-Tom no estágio vegetativo, sobre parâmetros de fluorescência da clorofila *a* estão na Figura 5. Nesta figura estão alguns dados dos parâmetros biofísicos derivados das curvas de fluorescência transiente OJIP e alguns parâmetros do Teste JIP (STRASSER e STRASSER, 1995; STRASSER e STIRBET 1998; 2001; STRASSER et al., 2004;), sendo que todos os dados foram normalizados para os respectivos controles.

Tabela 2 - Resumo dos parâmetros, fórmulas e sua descrição com dados extraídos de fluorescência da clorofila *a* OJIP

Parâmetros da fluorescência	Descrição
Parâmetros extraídos	
F_t	Intensidade de fluorescência no tempo t após início da iluminação actínica
$F_{50 \mu s}$	Intensidade de fluorescência mínima a 50 μs
$F_{100 \mu s}$ e $F_{300 \mu s}$	Intensidade de fluorescência a 100 e 300 μs , respectivamente
F_J e F_I	Intensidade de fluorescência no passo J (2 ms) e no passo I (30 ms), respectivamente
$F_P (= F_M)$	Fluorescência máxima no passo P
Area	Área complementar total entre a indução da curva de fluorescência e F_m
Parâmetros Derivados e Parâmetros OJIP	
$F_0 \cong F_{50 \mu s}$	Fluorescência mínima quando todos os centros de reação do FSII estão abertos
$F_M = F_P$	Fluorescência máxima quando todos os centros de reação do FSII estão fechados
$V_J = (F_{2 ms} - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescência variável relativa no passo J (2 ms)
$V_I = (F_{30 ms} - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescência variável relativa no passo I (30 ms)
$M_0 = 4 (F_{300 \mu s} - F_0)/(F_M - F_0)$	Declividade inicial (em ms^{-1}) da fluorescência transiente $V = f(t)$
$N = S_m * (M_0/V_J)$	Número de giros de redução, oxidação e re-redução de Q_A no tempo entre a luz ser ligada até atingir F_M
$S_m = EC_0/RC = Area/(F_m - F_0)$	Área complementar total normalizada acima da curva OJIP
$S_s = V_J/M_0$	Área complementar total normalizada acima da curva transiente entre os passos O e J
Rendimentos e razões de fluxo	
$\phi_{P_0} = TR_0/ABS = 1 - F_0/F_M = F_v/F_M$	Rendimento quântico máximo fotoquímico primário em $t = 0$
$\phi_{E_0} = \phi_{P_0} * \psi_0 = 1 - (F_J/F_M) = ET_0/ABS$	Rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons
$\psi_{E_0} = ET_0/TR_0 = 1 - V_J$	Probabilidade (no tempo 0) que um exciton capturado em mover um elétron na cadeia de transporte de elétrons após Q_A^-
$\delta_{R_0} = RE_0/ET_0 = (1 - V_I)/(1 - V_J)$	Eficiência com que um elétron pode mover dos aceptores de elétrons do intersistema reduzidos para os aceptores finais do FSI
$\phi_{R_0} = RE_0/ABS = \phi_{P_0} * \psi_{E_0} * \delta_{R_0}$	Rendimento quântico de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI por fóton absorvido
Fluxos específicos ou atividades expressas por centro de reação (RC)	
$ABS/RC = M_0 * (1/V_J) * (1/\phi_{P_0})$	Fluxo de absorção por RC
$TR_0/RC = M_0/V_J$	Fluxo de energia capturado por RC em $t = 0$
$ET_0/RC = (M_0/V_J) * \psi_{E_0} = (M_0/V_J) * (1 - V_J)$	Fluxo de transporte de elétrons por RC em $t = 0$
$RE_0/RC = (RE_0/ET_0) * (ET_0/CR)$	Redução dos aceptores finais do lado acceptor de elétrons do FSI no por CR em $t = 0$
Índice de Performance	
$PI_{abs} = (RC/ABS) * (\phi_{P_0}/(1 - \phi_{P_0})) * (\psi_{E_0}/(1 - \psi_{E_0}))$	Índice de performance total
$PI_{total} = (RC/ABS) * (\phi_{P_0}/(1 - \phi_{P_0})) * (\psi_{E_0}/(1 - \psi_{E_0})) * (\delta_{R_0}/(1 - \delta_{R_0}))$	Índice de performance total, medindo a performance até os aceptores finais de elétrons do FSI

Nas plantas do genótipo selvagem (Figura 5A) quando submetidas à radiação UV-C praticamente todos os parâmetros tiveram valores similares ao do controle, somente foi identificada pequena elevação para DI_0/RC (razão de dissipação total de energia de excitação não capturada do total de RC) no período de 16, 64 e 168 horas, e retornando a níveis de controle após duas semanas da aplicação da radiação. Neste mesmo período houve decréscimo, nos índices de performance PI_{abs} (índice de performance) e PI_{total} (índice de performance total). Contudo, após duas semanas da exposição das plantas a radiação, ocorreu recuperação para esse genótipo, levando em conta esses últimos parâmetros.

Nesse ensaio, os genótipos transformados, se comportaram de forma desigual. Para o parâmetro F_0/F_M , que indica a produção quântica basal do processo não-fotoquímico no fotossistema II (FSII), que é amplamente utilizado como indicativo de estresse, o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 (Figura 5B), em alguns períodos foi similar aos níveis de controle e em outros momentos de maneira elevada. Enquanto, o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 (Figura 5C), teve pequena decaída nesse parâmetro, para o período de 64 e 168 horas após a exposição da radiação. Entretanto, na última análise foi superior ao controle, o mesmo evidenciado no genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6, nos períodos de 16 e 336 horas, ou seja, essas plantas estavam em condições estressantes.

O parâmetro F_V/F_0 , que é indicador da eficiência máxima do processo fotoquímico no FSII, e como relatado na literatura, quando este parâmetro apresenta reduções é porque diminuiu a eficiência máxima do processo fotoquímico. No presente ensaio a radiação afetou, em todos os períodos analisados, as plantas do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6, enquanto que no genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 houve acréscimo nos períodos de 16, 64 e 168 horas com breve redução no último período.

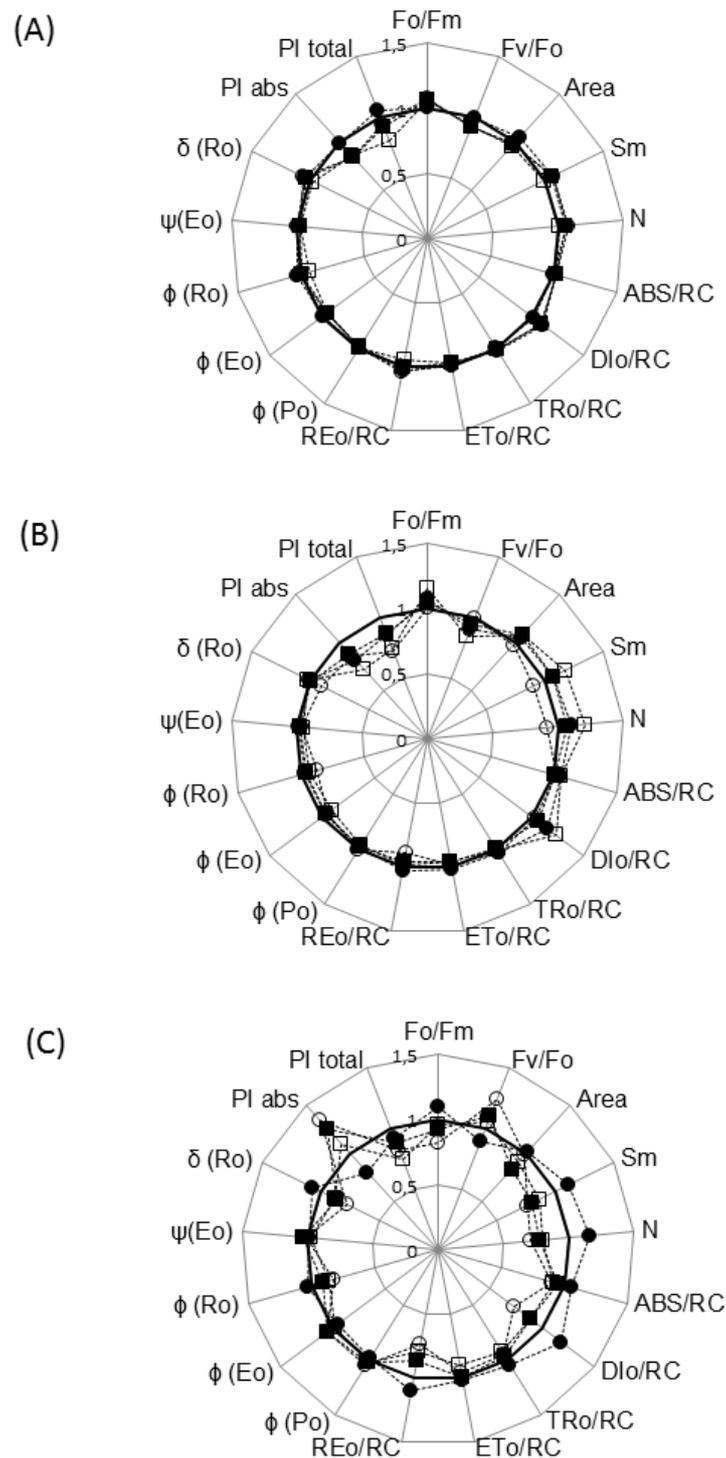


Figura 5 - Parâmetros do Teste JIP, em relação ao respectivo controle, obtidos a partir da fluorescência transiente OJIP das clorofilas de plantas de tomate ‘Micro-Tom’ submetidas a uma dose de radiação UV-C no estágio vegetativo. (A) genótipo selvagem, (B) genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 (C) genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 (—) controle, (---□---) 16h (---■---) 64h (---○---) 168h (---●---) 336h após a aplicação da radiação UV-C.

A área complementar total entre a curva de indução de fluorescência e F_M (área) foi reduzida para as plantas do genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 nos períodos de 16 e 64 horas, mantendo-se similar ao controle nos demais períodos, enquanto as plantas do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 a área foi praticamente similar ao controle.

Nas plantas do genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 a aplicação da radiação UV-C provocou redução nos parâmetros: i: na área complementar total acima da curva OJIP (S_m); ii: o número de giros de oxidação e re-oxidação de Q_A no tempo entre a luz ser ligada até atingir $F_M(N)$, nos períodos de 16, 64 e 168 horas. Entretanto, nas plantas do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 ocorreu apenas redução nestes parâmetros uma semana após a exposição das plantas à radiação e nas demais coletas um pequeno acréscimo em relação às plantas controle.

Para as plantas do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6, somente ocorreu acréscimo em relação ao controle no parâmetro (DI_0/RC), nos períodos de 16 e 336 horas e no parâmetro (RE_0/RC) um pequeno decréscimo após uma semana da aplicação da radiação UV-C, ou seja não apresentou grandes alterações em relação aos fluxos específicos ou atividades expressas por centro de reação: i: ao fluxo de absorção por centro de reação (ABS/RC); ii: razão de dissipação total de energia de excitação não capturada do total de centro de reação (DI_0/RC); iii: máxima taxa pela qual um éxciton é capturado pelo centro de reação resultando em uma redução de Q_A (TR_0/RC); iv: re-oxidação de Q_A^- via transporte de elétrons em um centro de reação ativo (ET_0/RC) e v: redução dos aceptores finais do lado receptor de elétrons do FSI por centro de reação.

Observou-se para as plantas do mesmo genótipo que os parâmetros que descrevem os rendimentos e eficiências, pouca alteração em relação ao genótipo selvagem. Destacando pequena redução na eficiência com que um elétron pode mover dos aceptores de elétrons do intersistema reduzidos para os aceptores finais do FSI (δ_{R_0}) para o período de 168 horas (uma semana) após a exposição das plantas à radiação. Porém, no genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 no parâmetro δ_{R_0} e no parâmetro que descreve o rendimento quântico de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI por fóton absorvido (ϕ_{R_0}) ocorreu maiores decréscimos nos períodos de 16, 64 e 168 horas.

Por intermédio dos índices de performance, PI_{abs} e PI_{total} , pode-se perceber que o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 exibiu redução em todos os períodos, para esses dois parâmetros, demonstrando que ocorreu uma diminuição na capacidade de conservação de energia.

Nogenótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 somente o PI_{total} houve redução. Todavia, após duas semanas, esse último genótipo, começou a retornar próximo aos níveis do controle. Entretanto, esse genótipo, o PI_{abs} , manteve-se elevado para os períodos de 16, 64 e 168 horas após a exposição à radiação e somente na última análise decresceu em relação ao controle.

Trocas gasosas

Ataxa assimilatória líquida de CO_2 (A , $\mu\text{mol } CO_2\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol } H_2O \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e concentração intercelular de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol } CO_2\text{mol}^{-1}$) para todos os genótipos das plantas de tomate da variedade Micro-Tom com a aplicação da radiação UV-C no estágio vegetativo (56 DAS) estão representados na Tabela 3, 4 e 5, respectivamente.

Nas plantas do genótipo selvagem verificou-se interação entre a aplicação da radiação UV-C e o tempo após a aplicação do estresse para a taxa assimilatória líquida. Na Tabela 3 observa-se que a taxa assimilatória líquida de CO_2 foi maior nas plantas controle. A exceção da coleta correspondente ao período de 168 horas após a aplicação do estresse, onde as A foram similares.

Os resultados da taxa assimilatória líquida de CO_2 para as plantas do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 não apresentaram interação entre os fatores analisados. Contudo, em relação aos fatores principais observou-se que a aplicação da radiação UV-C provocou um média de A menor do que as plantas controle. Contudo, apesar de não significativamente diferentes, as taxa assimilatória líquida de CO_2 nas plantas tratadas com UV-C foram ligeiramente menores do que as plantas controle, principalmente logo após a aplicação do estresse. Em relação as plantas com silenciamento da MT-sHSP23.6, não foi observado efeito dos fatores analisados.

Tabela 3 - Taxa assimilatória líquida de CO₂ (A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de plantas de tomate 'Micro-Tom', tipo selvagem, com superexpressão da MT-sHSP23.6 e com silenciamento da MT-sHSP23.6, submetidas a uma dose de radiação UV-C no estágio vegetativo

Genótipo	Estresses	Tempo após aplicação do estresse				Média fator estresse
		16h	64h	168h	336h	
Selvagem	Controle	12,757 a*	13,941 a	12,055 a	11,312 a	12,541 A
	UV-C	8,278 b	11,574 b	16,196 a	11,530 b	11,668 A
	Média fator tempo	10,518 b	12,758 ab	14,125 a	11,421 b	
Genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6	Controle	11,023a	11,920a	9,864a	13,634 a	11,610 A
	UV-C	7,451a	10,855a	7,593 a	11,968a	9,494 B
	Média fator tempo	9,237 bc	11,447 ab	8,855 c	12,801 a	
Genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6	Controle	11,174 a	12,100 a	13,026 a	13,373 a	12,386 A
	UV-C	9,276 a	12,031 a	12,401 a	11,204 a	11,166 A
	Média fator tempo	10,225 a	12,065 a	12,714 a	12,289 a	

* Médias comparadas dentro de cada genótipo e seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% (n=5). Letras minúsculas comparações na linha, e maiúsculas na coluna.

Nas plantas do genótipo selvagem verificou-se interação entre a aplicação da radiação UV-C e o tempo após a aplicação do estresse para a condutância estomática. Na Tabela 4 observa-se que nas plantas controle a condutância estomática não variou significativamente em função do tempo. Contudo, para as plantas deste genótipo que foram tratadas com a radiação UV-C os menores valores de condutância estomática foram obtidos 16 horas após a aplicação da radiação UV-C. Em relação ao fator aplicação do estresse não foram observadas diferenças significativas entre as plantas controle e as que foram submetidas a aplicação da radiação UV-C.

Para as plantas do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 houve diferença entre as médias dos tratamentos, sendo que as plantas que foram submetidas à aplicação da radiação UV-C apresentaram uma redução de aproximadamente 16% na condutância estomática em relação ao controle. Neste genótipo também ocorreu uma variação nas médias em relação aos períodos das análises após a aplicação da radiação, ou seja, o fator tempo. Essa variação entre o menor valor e o maior correspondeu a uma diminuição de 48%, para este genótipo. Para as plantas do genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 não houve diferença quando considera-se o fator aplicação da radiação, somente em relação ao período de análise, sendo que os menores valores foram obtidos as 16 horas após a aplicação do estresse.

Tabela 4 - Condutância estomática ($gs, mol H_2O m^{-2} s^{-1}$) de plantas de tomate ‘Micro-Tom’, tipo selvagem, com superexpressão da MT-sHSP23.6 e com silenciamento da MT-sHSP23.6, submetidas a uma dose de radiação UV-C no estágio vegetativo.

Genótipo	Estresses	Tempo após aplicação do estresse				Média fator estresse
		16h	64h	168h	336h	
Selvagem	Controle	0,285 a *	0,248 a	0,218 a	0,287 a	0,262 A
	UV-C	0,152 b	0,211 ab	0,335 a	0,253 ab	0,233 A
	Média fator tempo	0,219 a	0,229 a	0,277 a	0,270 a	
Genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6	Controle	0,272 a	0,233 a	0,184 a	0,332 a	0,255 A
	UV-C	0,147 a	0,240 a	0,143 a	0,309 a	0,212 B
	Média fator tempo	0,209 b	0,236 ab	0,166 b	0,320 a	
Genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6	Controle	0,234 a	0,211 a	0,222 a	0,326 a	0,250 A
	UV-C	0,177 a	0,215 a	0,242 a	0,26 a	0,222 A
	Média fator tempo	0,205 b	0,211 ab	0,232 ab	0,293 a	

* Médias comparadas dentro de cada genótipo e seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% (n=5). Letras minúsculas comparações na linha, e maiúsculas na coluna.

Em relação à concentração intercelular de CO_2 ($C_i, \mu mol CO_2 mol^{-1}$) (Tabela 5), esta foi insensível ao tratamento por UV-C, em todos os genótipos, sendo que somente genótipos transformados apresentaram diferenças entre os períodos após a aplicação da radiação UV-C. Nas plantas que possuem a superexpressão da MT-sHSP23.6 os menores valores de C_i foram determinados entre 64 e 168 horas após a aplicação da radiação UV-C, diferentemente da plantas com silenciamento da MT-sHSP23.6 que os menores valores da concentração interna de CO_2 foram obtidos entre as 16 e 168 horas.

Tabela 5 - Concentração intercelular de CO₂ (C_i, μmolCO₂mol⁻¹) de plantas de tomate 'Micro-Tom', tipo selvagem, com elevada expressão da MT-sHSP23.6 e com baixa expressão da MT-sHSP23.6, submetidas a uma dose de radiação UV-C no estágio vegetativo

Genótipo	Estresses	Tempo após aplicação do estresse				Média fator estresse
		16h	64h	168h	336h	
Selvagem	Controle	288,7 a *	268,8 a	266,1 a	293,0 a	279,8 A
	UV-C	276,1 a	268,6 a	278,9 a	285,7 a	277,2 A
	Média fator tempo	282,4 a	268,7 a	272,5 a	289,3 a	
Genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6	Controle	296,1 a	277,7 a	263,5 a	295,1 a	283,1 A
	UV-C	282,9 a	285,4 a	260,8 a	300,6 a	283,5 A
	Média fator tempo	289,5 ab	281,1 bc	262,3 c	297,9 a	
Genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6	Controle	283,4 a	268,8 a	256,6 a	297,7 a	277,7 A
	UV-C	280,7 a	268,2 a	269,9 a	289,8 a	277,5 A
	Média fator tempo	282,0 ab	268,5 b	263,3 b	293,7 a	

*Médias comparadas dentro de cada genótipo e seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% (n=5). Letras minúsculas comparações na linha, e maiúsculas na coluna.

Ensaio 2 - Efeito da aplicação da radiação UV-C durante o estágio reprodutivo sobre características fotossintética em plantas transformadas e não transformadas de tomate 'Micro-Tom' com diferentes expressões da sHSP23.6 mitocondrial

Índice de clorofila

Os dados do índice de clorofila para os genótipos das plantas de tomate da variedade Micro-Tom com aplicação de radiação UV-C realizada no início do estágio reprodutivo (64 DAS) e com nova aplicação após 10 dias estão contido na Tabela 6.

Para as plantas do genótipo selvagem não foi observada interação significativa entre os fatores analisados. Contudo, a aplicação da radiação UV-C provocou redução dos valores médios do índice de clorofila (Tabela 6). Em relação ao período de tempo após a aplicação da radiação, os menores índices de clorofilas foram medidos após a segunda aplicação da radiação. Nas plantas genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 foi identificada diferença significativa para o fator tempo, onde o menor índice de clorofila foi medido a 168 horas após a segunda aplicação do estresse, diferindo apenas do período de 64 horas após a primeira aplicação de UV-C. Contudo deve-se ser destacado que as plantas deste genótipo apresentaram os menores índices de clorofila quando comparados com as plantas dos demais genótipos.

Tabela 6 - Índice de clorofila, unidade relativa, de plantas de tomate 'Micro-Tom', tipo selvagem, com superexpressão da MT-sHSP23.6 e com silenciamento da MT-sHSP23.6, submetidas a duas doses de radiação UV-C no estágio reprodutivo

Genótipo	Estresses	Tempo após aplicação do estresse						Média fator estresse
		Primeira aplicação UV-C			Segunda aplicação UV-C			
		16h	64h	168h	16h	64h	168h	
Selvagem	Controle	13,48 a *	13,33 a	13,17 a	12,92 a	12,49 a	11,7 a	12,85 A
	UV-C	14,34 a	13,09 a	11,84 a	11,17 a	10,99 a	9,25 a	11,78 B
	Média fator tempo	13,91 a	13,21 ab	12,51 ab	12,05 bc	11,74 bc	10,47 c	
Genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6	Controle	8,9 a	9,38 a	9,24 a	9,56 a	9,31 a	8,39 a	9,13 A
	UV-C	10,15 a	10,4 a	9,28 a	8,55 a	8,13 a	7,87 a	9,06 A
	Média fator tempo	9,52 ab	9,89 a	9,26 ab	9,06 ab	8,72 ab	8,13 b	
Genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6	Controle	11,79 a	12,36 a	11,46 a	12,81 a	12,57 a	11,22 a	12,03 A
	UV-C	13,21 a	12,11 a	11,27 ab	11,44 a	9,87 ab	8,56 b	11,09 B
	Média fator tempo	12,50 a	12,24 a	11,36 ab	12,20 a	11,37 ab	9,89 b	

* Médias comparadas dentro de cada genótipo e seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% (n=10). Letras minúsculas comparações na linha, e maiúsculas na coluna.

Foi verificado efeito significativo entre a aplicação da radiação UV-C e tempos após a aplicação para o índice de clorofila nas plantas do genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 (Tabela 6). Devendo ser destacado que as plantas deste genótipo apresentaram menores valores de índice de clorofila quando submetidas a radiação UV-C, principalmente após a segunda aplicação da radiação.

Fluorescência transiente da clorofila a

A razão F_0/F_M , que indica a produção quântica basal do processo não-fotoquímico no FSII, sendo utilizado com indicativo de estresse, manteve-se um pouco acima do controle para as plantas do genótipo selvagem (Figura 6A) e com superexpressão da MT-sHSP23.6 (Figura 6B), indicando o efeito estressante da aplicação da radiação UV-C, consideram apenas este parâmetro.

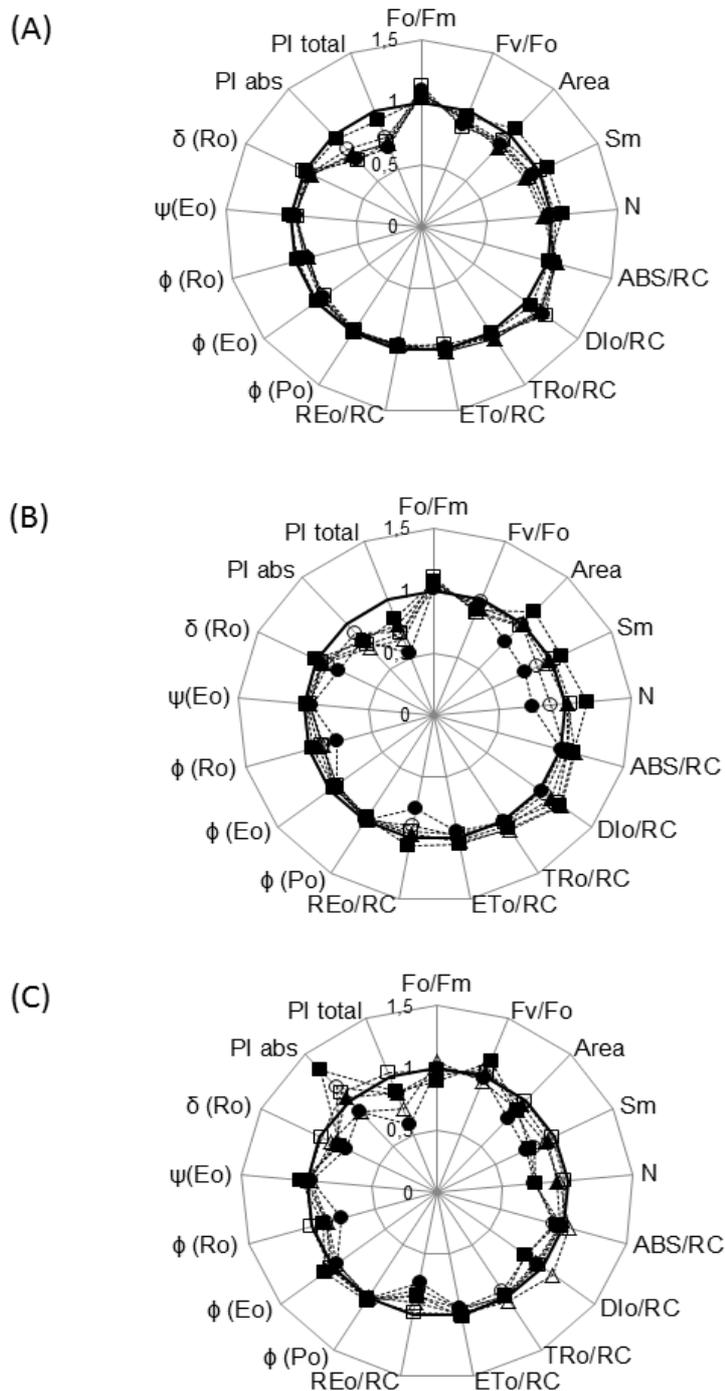


Figura 6 - Parâmetros do Teste JIP, em relação ao respectivo controle, obtidos a partir da fluorescência transiente OJIP das clorofilas de plantas de tomate 'Micro-Tom' submetidas a duas doses de radiação UV-C no estágio reprodutivo. (A) genótipo selvagem, (B) genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6, (C) genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 (—) controle, (---□---) 16h após 1ª aplicação, (---■---) 64h após 1ª aplicação, (---○---) 168h após 1ª aplicação, (---●---) 16h após 2ª aplicação, (---△---) 64h após 2ª aplicação, (---▲---) 168h após 2ª aplicação de radiação UV-C.

A razão F_v/F_0 foi ligeiramente inferior para as plantas tratadas com radiação UV-C quando comparadas com as controle para estes dois genótipos. Entretanto, as plantas do genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 (Figura 6C) apresentaram comportamento inverso ao observado para os demais genótipos quando se compara estes dois parâmetros.

A área complementar total entre a curva de indução de fluorescência e F_M , a área complementar total normalizada acima da curva OJIP (S_m), e o número de giros de redução, oxidação e re-redução de Q_A , no tempo entre a luz ser ligada até atingir F_M (N), aumentaram nas plantas dos genótipos selvagem (Figura 6A) e do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 (Figura 6B) no período de 64 horas após a primeira aplicação da radiação e uma redução progressiva para os dois genótipos transformados no período de 168 horas após a 1ª radiação e 16 horas após a segunda aplicação da radiação. Sendo que no último dia de análise, o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 retornou aos níveis das plantas controle, em relação a esses parâmetros.

Em relação aos fluxos específicos ou atividades expressas por centro de reação (RC), para o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 (Figura 6B), esses parâmetros comportaram-se de maneira similar aos encontrados no ensaio 1. Aumento nos parâmetros DI_0/RC (razão de dissipação total de energia de excitação não capturada do total de centro de reação), ABS/RC (fluxo de absorção por RC) e RE_0/RC (redução do acceptor final de elétrons no lado acceptor de elétrons do FSI por RC, no tempo = 0), somente para 64 horas da 1ª radiação, seguido de acentuado decréscimo no parâmetro RE_0/RC após 16 horas da 2ª aplicação da radiação e retornando a níveis de controle no final. As plantas do genótipo selvagem (Figura 6A) apresentaram maior elevação no parâmetro DI_0/RC , provavelmente pela tentativa de dissipação de energia em excesso na forma de calor.

As plantas do genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 (Figura 6C), demonstraram um aumento em ABS/RC e DI_0/RC , no período de 64 horas após a 2ª aplicação da radiação. Nesses parâmetros também ocorreu nos períodos de 64 e 168 horas após a 1ª aplicação um decréscimo. O parâmetro que descreve a redução do acceptor final de elétrons no lado do acceptor de elétrons do FSI por RC no tempo = 0 (RE_0/RC), mostrou decréscimo a partir do período de 64 horas após a primeira exposição das plantas.

Para os parâmetros que descrevem os rendimentos e razões de fluxos, as plantas do genótipo selvagem (Figura 6A) novamente apresentaram respostas similares as obtidas no ensaio 1, com pequenas alterações em relação ao controle. Nos genótipos transformados, os parâmetros que mais tiveram oscilações em relação ao controle foram ϕ_{R_0} e $e\delta_{R_0}$, que explicam o rendimento quântico de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI por fóton absorvido,

e eficiência com que um elétron pode mover dos aceptores de elétrons do intersistema reduzidos para os aceptores finais do FSI, respectivamente e, sendo que o período em que apresentou maior declínio foi 16 horas após a 2ª aplicação da radiação, ou seja, a ação de duas aplicações foi mais prejudicial que somente uma, como no ensaio 1.

Considerando os índices de performance, PI_{abs} e PI_{total} , verificou-se principalmente que após a segunda aplicação da radiação UV-C, até o final das análises, ocorreu um acentuado decréscimo nesses índices de performance nos genótipos com superexpressão da MT-sHSP23.6 (Figura 6B) e no selvagem (Figura 6A). Entretanto, no genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 (Figura 6C) também houve reduções no PI_{total} , onde somente permaneceu em níveis de controle após as 16 horas do primeiro estresse, porém após esse período até o final do experimento houve um decréscimo acentuado para o PI_{total} , demonstrando resposta similar a aplicação da radiação no estágio vegetativo. No parâmetro PI_{abs} o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 reduziu nos períodos de 16 e 168 horas da primeira aplicação e 16 e 64 horas após a segunda aplicação, no entanto uma semana após a segunda aplicação, se encontrava em níveis de controle.

Trocas gasosas

Os dados das trocas gasosas: taxa assimilatória líquida de CO_2 (A , $\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$), condutância estomática (g_s , $mol H_2O m^{-2} s^{-1}$) e concentração intercelular de CO_2 (C_i , $\mu mol CO_2 mol^{-1}$) estão representados na Tabela 7, 8 e 9, respectivamente.

A taxa assimilatória líquida de CO_2 (A) (Tabela 7), nas plantas do genótipo selvagem, apresentaram diferença entre as plantas que foram submetidas a aplicação da radiação UV-C e as controle. Porém, também ocorreram reduções na taxa assimilatória líquida do tratamento controle. Contudo não se observou interferindo na média de A . Entretanto as médias do fator tempo foram menores entre os períodos de 16 e 168 horas após a segunda aplicação da radiação UV-C.

Para as plantas do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6, os resultados da taxa assimilatória líquida de CO_2 não apresentaram interação entre os fatores analisados. Contudo, observou-se que a aplicação da radiação UV-C provocou um média de A menor (29%) do que as plantas controle. Entretanto, apesar de não significativamente diferentes, as taxa assimilatória líquida de CO_2 nas plantas tratadas com UV-C foram ligeiramente menores do que as plantas controle.

Em relação às plantas com silenciamento da MT-sHSP23.6, não foi observado diferença entre os tratamentos. Contudo, observou-se que a aplicação da radiação UV-C

reduziu a taxa fotossintética em 22% em relação as plantas controle e as médias do fator tempo foram menores nos períodos entre 64 horas após a primeira aplicação e 168 horas após a segunda aplicação.

Tabela 7 -Taxa assimilatória líquida de CO₂ (A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de plantas de tomate ‘Micro-Tom’, tipo selvagem, com superexpressão da MT-sHSP23.6 e com silenciamento da MT-sHSP23.6, submetidas a duas doses de radiação UV-C no estágio reprodutivo

Genótipo	Estresses	Tempo após aplicação do estresse						Média fator estresse
		Primeira aplicação UV-C			Segunda aplicação UV-C			
		16h	64h	168h	16h	64h	168h	
Selvagem	Controle	13,70 a*	12,05 ab	11,31 ab	11,00 ab	10,16 b	10,86 ab	11,42 A
	UV-C	10,50 b	16,19 a	11,13 b	7,87 c	10,13 b	11,25 b	11,14 A
	Média fator tempo	12,10 ab	14,12 a	11,22 b	9,61 c	10,14 bc	11,06 bc	
Genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6	Controle	14,796 a	9,864 a	13,634 a	12,406 a	11,296 a	9,449 a	11,908 A
	UV-C	9,686 a	7,593 a	10,144 a	6,72 a	8,553 a	7,872 a	8,411 B
	Média fator tempo	12,525 a	8,855 c	12,083 ab	9,879 bc	9,925 bc	8,660 c	
Genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6	Controle	16,982 a	14,827 a	13,373 a	14,467 a	13,266 a	12,819 a	14,303 A
	UV-C	12,236 a	12,401 a	12,957 a	8,592 a	10,103 a	9,641 a	11,130 B
	Média fator tempo	14,609 a	13,441 ab	13,165 ab	11,856 b	11,685 b	11,457 b	

* Médias comparadas dentro de cada genótipo e seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukeya 5% (n=5). Letras minúsculas comparações na linha, e maiúsculas na coluna.

Em relação à condutância estomática (g_s) (Tabela 8), todos os genótipos apresentaram interação entre os fatores analisados, ou seja foram sensíveis ao tratamento por UV-C. Dessa forma, o genótipo selvagem, com superexpressão da MT-sHSP23.6 e com silenciamento da MT-sHSP23.6 apresentaram reduções no tratamento por UV-C, em relação as médias dos tratamentos de 12%, 22% e 25% respectivamente.

Também se verificou interação entre a aplicação da radiação UV-C e o tempo após a aplicação do estresse para a condutância estomática. Contudo, observa-se que nas plantas controle a condutância estomática também variou significativamente em função do tempo.

Para o genótipo selvagem a variação nas médias em relação aos períodos das análises após a aplicação da radiação, ou seja, o fator tempo, a condutância estomática foi menor entre os períodos de 16 horas após a primeira aplicação e 16 horas da segunda aplicação da

radiação UV-C. No genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 essa interação foi menor nos períodos de 64 horas após a primeira aplicação e 16 horas após a segunda aplicação, e no genótipo de com silenciamento da MT-sHSP23.6 as menores médias dessa interação foram entre os períodos de 64 horas após a primeira aplicação e 16 horas após a segunda aplicação.

Tabela 8 - Condutância estomática ($gs, mol H_2O m^{-2} s^{-1}$) de plantas de tomate 'Micro-Tom', tipo selvagem, superexpressão da MT-sHSP23.6 e com silenciamento da MT-sHSP23.6, submetidas a duas doses de radiação UV-C no estágio reprodutivo

Genótipo	Estresses	Tempo após aplicação do estresse						Média fator estresse
		Primeira aplicação UV-C			Segunda aplicação UV-C			
		16h	64h	168h	16h	64h	168h	
Selvagem	Controle	0,351 a*	0,218 b	0,287 ab	0,298 ab	0,371 a	0,362 a	0,317 A
	UV-C	0,213 b	0,335 ab	0,251 b	0,125 c	0,369 a	0,33 a	0,276 B
	Média fator tempo	0,282 bc	0,277 bc	0,269 c	0,221 c	0,370 a	0,348 ab	
Genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6	Controle	0,439 a	0,184 c	0,332 b	0,321 b	0,343 ab	0,305 b	0,321 A
	UV-C	0,233 b	0,143 c	0,270 ab	0,124 c	0,330 a	0,354 a	0,250 B
	Média fator tempo	0,347 a	0,166 b	0,304 a	0,233 b	0,336 a	0,329 a	
Genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6	Controle	0,457 a	0,264 c	0,326 b	0,307 b	0,388 a	0,396 a	0,362 A
	UV-C	0,251 a	0,242 a	0,289 a	0,158 b	0,362 a	0,307 a	0,270 B
	Média fator tempo	0,354 a	0,251 b	0,308 ab	0,241 b	0,375 a	0,358 a	

* Médias comparadas dentro de cada genótipo e seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% (n=5). Letras minúsculas comparações na linha, e maiúsculas na coluna.

Em relação à concentração intercelular de CO_2 ($C_i \mu mol CO_2 mol^{-1}$) (Tabela 9), não houve diferença entre os tratamentos, para nenhum genótipo. Entretanto todos os genótipos apresentaram diferenças entre os períodos após a aplicação da radiação UV-C. Os menores valores de C_i foram determinados nas plantas que possuem superexpressão da MT-sHSP23.6 e som silenciamento da MT-sHSP23.6, entre os períodos de 64 horas da primeira aplicação e 16 horas da segunda aplicação da radiação UV-C. Para o genótipo selvagem, os menores valores foram obtidos entre os períodos de 16 horas da primeira aplicação e 16 horas após a segunda aplicação da radiação UV-C.

Tabela 9 - Concentração intercelular de CO₂ (C_i, μmolCO₂ mol⁻¹) de plantas de tomate 'Micro-Tom', tipo selvagem, com superexpressão da MT-sHSP23.6 e com silenciamento da MT-sHSP23.6, submetidas a duas doses de radiação UV-C no estágio reprodutivo

Genótipo	Estresses	Tempo após aplicação do estresse						Média fator estresse
		Primeira aplicação UV-C			Segunda aplicação UV-C			
		16h	64h	168h	16h	64h	168h	
Selvagem	Controle	298,9 a *	266,1 b	293,0 a	302,6 a	321,4 a	313,4 a	300,5 A
	UV-C	284,6 b	278,9 b	289,6 b	264,2 c	321,7 a	306,9 ab	292,7 A
	Média fator tempo	291,8 bc	272,5 c	291,3 bc	285,6 bc	321,6 a	310,2 ab	
Genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6	Controle	305,9 a	263,5 a	295,1 a	298,6 a	311,2 a	311,9 a	297,7 A
	UV-C	295,7 a	260,8 a	302,5 a	276,3 a	324,9 a	327,4 a	300,1 A
	Média fator tempo	301,3 b	262,3 c	298,4 bc	288,7 bc	318,0 ab	319,7 a	
Genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6	Controle	298,6 a	262,9 a	297,7 a	283,5 a	307,8 a	304,3 a	294,2 A
	UV-C	283,5 a	269,9 a	290,9 a	273,8 a	320,6 a	310,4 a	291,6 A
	Média fator tempo	291,1 bc	266,9 c	294,3 bc	279,2 c	314,2 a	306,9 ab	

* Médias comparadas dentro de cada genótipo e seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% (n=5). Letras minúsculas comparações na linha, e maiúsculas na coluna.

DISCUSSÃO

Muitos trabalhos relatam sobre o uso da radiação UV-C para reduzir a incidência e severidade de doenças na pós-colheita dos frutos e retardar o amadurecimento dos frutos (NIGRO et al., 1998; GONZALEZ-AGUILAR et al., 2004; LIU et al., 2012; LU et al., 2013; TIECHER et al., 2013), entre outras aplicações. Contudo, muito pouco é abordado em relação aos efeitos fisiológicos no metabolismo primário, como a fotossíntese. Daloso et al., (2009), enfatizam que investigações científicas a cerca dos efeitos da radiação UV-C são importantes pelas semelhanças das respostas biológicas ao espectro da radiação UV biologicamente ativa (UV-B). Bolige et al., (2005) corroboram com esta informação, que organismos fotossintéticos não podem escapar da radiação solar, pois necessitam da energia solar para o transporte de elétrons da fotossíntese.

É comum, em situações de estresse, ocorrer alterações no índice de clorofila (ADAMSKI et al., 2011; HUTHER, 2011; LARRÉ et al., 2013). No entanto, nesse experimento, tanto para o ensaio 1 quanto no 2, não houve influencia do estresse por radiação

UV-C no índice de clorofila para o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6. Contudo, para as plantas dos genótipos selvagem e com silenciamento da MT-sHSP23.6 estes apresentaram tanto no ensaio 1 quanto no segundo, reduções, sendo que no ensaio 2, principalmente após a segunda aplicação de UV-C.

Essa redução no índice de clorofila pode ser devido à foto-oxidação das clorofilas, pois segundo Engel e Poggiani (1991), em casos de alta densidade luminosa a velocidade de decomposição dessas moléculas pode ser elevada, e, ou, em virtude da sobreposição de outros pigmentos, sobre as clorofilas, interferindo na análise. Este fato pode estar relacionado aos carotenoides, bem como aos flavonoides, que possuem várias funções, além da atuação na pigmentação da planta e na proteção contra a radiação UV, de forma a atenuar os efeitos de comprimento de onda curto, evitando a produção de radicais livres (KOLB et al., 2001; HUBER e RODRIGUES-AMAYA, 2008; AGATI e TATTINI, 2010). No presente experimento foi verificado que algumas colorações arroxeadas, em algumas folhas, em ambos os ensaios. Isso condiz com o que foi verificado por Rai et al., (2011) que analisando os pigmentos fotossintéticos após a exposição das plantas *A. annua* a radiação UV-C e B, identificam um declínio no teor de clorofila total de 35,2% para UV-C enquanto que no teor de carotenoides aumento em 55,5% para o tratamento com UV-C, além de maior incremento de flavonoides.

Klein (2014), afirma que há maior teor de flavonoides em plantas do gênero *Alternanthera* quando expostas à radiação UV-C, e que tanto radiações UV-B e C atuam como elicitores desse metabólito. O mesmo encontrado por Reis (2013), com plantas do mesmo gênero, e diferentes qualidades de luz, concluindo que o maior incremento de flavonoides é na luz azul. Meng et al., (2004), relata que a luz azul promove a expressão de genes da rota dos flavonoides, que são ativados pelo recebimento de luz nas folhas, iniciando a sinalização e os fotorreceptores como fitocromo, criptocromo, sendo que Tevini e Teramura (1989) consideram que a radiação ultravioleta atua na fotorregulação desses compostos.

Em estudos sobre a biossíntese de flavonoides e sua relação com estresses, observou-se que as plantas em condições de estresse geralmente aumentam a produção de compostos do metabolismo secundário, com aumento na produção de pigmentos e flavonoides (WINKEL-SHIRLEY, 2002). Estes pigmentos possuem a capacidade de absorver luz na região ultravioleta, e que o acúmulo de flavonoides são respostas desse estresse em plantas.

No presente experimento, também, ocorreu desenvolvimento de clorose na nervura principal, e com o transcorrer do experimento essas se encontravam nas nervuras secundárias, o que pode ter ocasionado algumas reduções no IC, corroborando com o encontrado por Rai

et al., (2011). Além disso, pode ter contribuído para a indução da senescência, principalmente, nas folhas mais velhas. Dessa maneira, pode-se supor que a radiação UV-C, além de causar fotodanos, pode ter proporcionado a estimulação da biossíntese do etileno, pois Gonzalez-Aguilar et al., (2004) e Tiecher et al., (2013), relatam que em frutos de pêssigo e tomate, quando aplicados radiação UV-C, há o estímulo na produção de etileno em comparação com o controle.

Essas reações desencadeadas pela radiação UV-C, afetam também a eficiência fotoquímica da fotossíntese, pois essa também depende do comprimento de onda, ou seja, essa eficiência diminui com a redução do comprimento de onda (MAUZERRAL, 2013). Através da análise da fluorescência da clorofila é possível estimar o comportamento de um vegetal em condições estressantes, sem que ainda demonstre sintomas, identificando os possíveis efeitos do estresse sobre o fluxo energético na cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese. No presente experimento, por meio das análises de fluorescência da clorofila *a*, foi possível perceber que a fase fotoquímica, em determinados períodos tolerou e relutou à ação dessa radiação, mas isso não foi evidenciado em todos os genótipos.

Esses dados desuniformes em relação aos genótipos podem ser devido a doses excessivas de radiação ultravioleta, que afetam a estrutura dos cloroplastos, podendo inclusive ocasionar desorganização e ruptura da membrana dos tilacóides (HE et al., 1994; KOVÁCS e KERESZTE, 2002). Isso se torna coerente, pois os fotossistemas estão inseridos nessas membranas. Além disso, Costa et al., (2006) enfatizam, que isso poderia libertar clorofilas dos complexos proteína-pigmento, ou seja, pode ocorrer desencadeamento de uma distribuição anormal de clorofilas nas folhas, interferindo, também, nas propriedades de absorção.

De modo geral, o genótipo selvagem, foi o que menos demonstrou sintomas, e quando presentes em menor intensidade, nos dois ensaios. Desta forma, ao final do ensaio 1 evidenciou-se uma recuperação nas plantas deste genótipo. Assim, sugerindo que se no estágio reprodutivo, também fosse aplicada só uma vez a radiação, esse genótipo se comportaria de maneira similar ao ensaio 1.

Em geral, para os dois ensaios, as plantas do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 apresentaram comportamento similar, ou seja apresentaram reduções tanto no PI_{abs} como no PI_{total} . Isso também foi verificado por Huther (2011), para o mesmo genótipo quando expostas ao estresse por alagamento. Entretanto, esse genótipo quando submetidos a temperaturas elevadas apresenta acréscimos nos índices de performance ao longo do tratamento (HUTHER et al., 2013).

Nos dois ensaios, o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 mostrou redução mais drástica nos índices de performanceas 16 horas após a segunda aplicação da radiação. Tal fato demonstra que, para o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6, o intervalo de dez dias entre uma aplicação e outra, foi pequeno para a planta recuperar do primeiro estresse. Contudo, após uma semana do segundo estresse, a maioria dos parâmetros analisados estavam próximos aos obtidos nas plantas controle, sugerindo que poderia haver uma recuperação por completo dos danos ocasionados pela radiação UV-C ao aparato fotossintético desse genótipo, demonstrando assim uma possível correlação com a superexpressão proteína sHSP23.6, nesse genótipo.

Em síntese, para as plantas dos genótipos selvagem e com superexpressão da MT-sHSP23.6, nos dois ensaios, ocorreu correlação entre alguns parâmetros obtidos a partir da fluorescência da clorofila, de forma que quando o PI_{abs} diminuiu ocorreu redução na eficiência fotoquímica de transporte de elétrons e aumento de DI_o/RC . Nesses genótipos também ocorreu maior fluxo de absorção por centro de reação (ABS/RC), principalmente para o segundo ensaio, após o período de 64 horas das aplicações das radiações. Mas o aumento em ABS/RC, também pode representar que o fotossistema teve incremento aparente do seu complexo-antena, para poder compensar a elevada dissipação de energia, ou perda de energia fotoquímica (CHRISTEN et al., 2007), na tentativa de manter uma atividade mais próxima do normal.

Em relação ao genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6, este foi o que mais demonstrou alterações nas análises de fluorescência das clorofilas, e dependendo do período e do ensaio, este apresentava oscilações, o que pode ter sido ocasionado pela clorose na nervura principal, e pela indução da senescência. Porém, houve oscilações no rendimento quântico efetivo da conversão da energia fotoquímica (F_v/F_o) ao final do ensaio 1, ocorrendo redução nesse rendimento, e ao final do ensaio 2 este estava em níveis de controle.

Essa redução no rendimento quântico também foi verificada por Kulandaivelu e Noorudeen (1983), quando realizaram um estudo comparativo da ação da radiação UV-C e UV-B no transporte de elétrons fotossintéticos, em cloroplastos isolados de *Amaranthus* e ambas radiações afetam o rendimento quântico.

Mesmo que em alguns períodos, no início do ensaio 1, o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 tenha aumentado o rendimento quântico efetivo de conversão de energia fotoquímica, não foi possível incrementar o número de giros de redução, oxidação e re-redução de Q_A no tempo entre a luz ser ligada até atingir F_M e a área complementar total normalizada acima da curva OJIP, ou seja, diminuiu a energia para reduzir o FSI. Além disso,

não conseguiu dissipar nem reduzir os aceptores finais de elétrons, isto é, a eficiência fotoquímica diminuiu nos períodos iniciais, mas o fluxo de transporte de elétrons (ET_0/RC) e o rendimento quântico de transporte de elétrons (ϕ_{E_0}), permaneceram a níveis de controle.

Adamski et al., (2011), ainda abordam que, mesmo chegando os elétrons no FSI, nem todos os elétrons atingem a proteína ferredoxina após a passagem pelo FSI, o que não resulta na formação de NADPH. Isto é, quando o FSI, e, ou os aceptores finais de elétrons não estão atuando de forma coordenada com a cadeia de elétrons da fotossíntese, esses elétrons podem ter dois destinos: fluxo cíclico ou pseudocíclico (HAUPT-HERTING e FOCK, 2002; MUNEKAGE e SHINAKAI, 2005).

Sendo que estes dois destinos podem ter sido para os elétrons, desta forma os parâmetros que descrevem os fluxos de energia capturada por RC (TR_0/RC) e fluxo de transporte de elétrons por RC (ET_0/RC) não apresentaram grandes alterações no transcorrer das análises. Nos dois ensaios, apesar do fluxo de absorção por RC estar na maioria dos períodos, abaixo do valor verificado nas plantas controle, Ruban et al., (2012) abordam que a exposição a diferentes intensidades luminosas, pode ocasionar diferenças nas taxas de absorção de energia, transferência para os centros de reação, bem como no subsequente transporte de elétrons.

No ensaio 2 foi possível verificar que após a segunda aplicação de UV-C, houve maiores danos ao aparato fotossintético, nas plantas do genótipo silenciamento da MT-sHSP23.6. Isso pode ser evidenciado por meio do índice de performance total (PI_{total}), pois este foi o período que parâmetros mais reduziu em relação ao controle. Entretanto, quando o PI_{abs} aumentou em virtude, principalmente, a um incremento na eficiência fotoquímica primária e eficiência fotoquímica no transporte de elétrons associado com uma diminuição de DI_0/RC , ou seja, a melhor eficiência do FSII.

Entretanto ao final, esse genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 foi mais eficiente em relação ao FSI, conforme demonstra os valores de PI_{total} , devido a maior dissipação de energia e maior redução dos aceptores finais de elétrons (DI_0/RC e RE_0/RC), respectivamente.

Strasser et al., (2000) descrevem o fluxo DI_0/RC como a perda de parte da energia absorvida pelo FSII, por meio de calor, emissão de fluorescência ou ainda, transferência de energia para outros sistemas. Isso representa a dissipação não-fotoquímica da energia absorvida pelos fótons, e segundo Kulandaivelu e Noorudeen (1983), essas perdas de energia ao longo do processo fotoquímico, está relacionada com o tempo de exposição a radiação UV-C e UV-B.

Sendo assim, quando o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6, nos dois ensaios, apresentou diminuição no PI_{total} , foi também devido a influências das reações de oxirredução (δ_{R0}), onde ocorreram reduções consideráveis.

De forma geral, para todos os genótipos, o FSII, apresentou maiores alterações e mudanças na atividade do FSI, devido principalmente a cooperatividade entre os fotossistemas. Isso corrobora com o evidenciado em cloroplastos isolados, onde Kulandaivelu e Noorudeen (1983) verificaram que a radiação UV-C não ocasiona maiores danos ao FSI, ou seja, a diminuição dos produtos formados, não é devida à diminuição na capacidade de redução do FSI, mas em virtude do atraso no fluxo de elétrons oriundos do FSII, de forma que a radiação UV-C atua principalmente na plastoquinona, no complexo de evolução do oxigênio, e nos receptores de elétrons do FSII. Porém, é relatado que a radiação UV-B inativa especificamente o centro de reação do FSII, gerando danos ao FSII (VASS, 1997, GILBERT et al., 2009).

Supõem-se então que a radiação UV-C possa ter diminuído o acúmulo de Q_A reduzida, e que isso pode ter ocorrido em função da: inibição da transferência de elétrons da água para o centro de reação do FSII; inativação das reações sequenciais que reoxidam Q_A^- , além da própria distribuição da plastoquinona, o que sugeriam Kulandaivelu e Noorudeen (1983).

Tendo em vista que fatores estressantes podem diminuir a taxa fotossintética, devido a grande quantidade de centros de reação inativos (TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER 2008), e que essa interligação entre reações fotoquímicas e bioquímicas é fundamental, pois há a necessidade dos produtos gerados pela fase fotoquímica para ocorrer à fase bioquímica da fotossíntese (MISHRA et al., 2012; MURCHIE e LAWSON et al., 2013), uma vez que qualquer processo que limite a disponibilidade de NADPH e ATP, tende a reduzir diretamente a capacidade de assimilação do carbono (DRIEVER e KROMDIJK, 2013).

Isso foi verificado para a maioria dos genótipos, no ensaio 2, em que o tratamento por UV-C ocasionou alterações também nas reações bioquímicas da fotossíntese, conforme dados referentes às trocas gasosas, mas com intensidades diferentes.

No ensaio 1, essas alterações nas trocas gasosas, não foi verificado para o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 e para o selvagem. Desse modo, para esse genótipo pode-se sugerir que o silenciamento desse gene, para essa proteína, nessas condições ambientais, não representou qualquer influência ou efeito prejudicial sobre essas plantas. No entanto, apesar do silenciamento da MT-sHSP23.6, muitos resquícios dessa proteína ainda podem estar presentes nesse genótipo (FERNANDEZ et al., 2009). Além disso, há também a expressão de outras proteínas, dentre elas HSP70 e HSP17.6, conforme verificado por

Scarpeci et al.,(2012) em estresse por UV. Ferullo et al., (2004), também salientam que em aplicações de diferentes doses da radiação gama, proporciona o aparecimento de transcritos para algumas proteínas, e uma redução para outras. Dessa forma, no presente trabalho a aplicação da radiação UV-C também pode ter induzido a síntese de outras proteínas de choque térmico, o que pode ter contribuído para manter essas atividades normais, mesmo em situações estressantes, tanto para o genótipo selvagem como para o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6. Os dados acima relatados não são condizentes com o ensaio 2, pois houve alterações nas trocas gasosas para esse genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6, o que vem corroborar com Rahvi e Kovalchuk (2013), que avaliaram diferentes alterações transgeracionais em *Arabidopsis thaliana*, em resposta a fatores estressantes, como a radiação UV-C, em diferentes níveis e momentos do desenvolvimento, onde ocorrem distintos graus de resposta, principalmente quando as plantas são expostas de modo moderado, especialmente no início do desenvolvimento, onde proporciona respostas positivas, enquanto, que respostas negativas na forma de tolerância podem ser observadas quando as plantas são expostas a situações mais severas, e em período de desenvolvimento mais avançado, condizendo ao evidenciado nesses ensaios.

Para as plantas do genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6, no ensaio 2, ocorreu uma relação entre a condutância estomática e a taxa fotossintética líquida, pois o tratamento por UV-C afetou ambas, o mesmo evidenciado por Jansen e van den Noort (2000), usando radiação UV-B. No entanto nesse ensaio, a concentração intercelular de CO₂ não foi afetada. Isso também foi evidenciado no genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 assim como também no ensaio 1 para este último genótipo. Desta forma, como não ocorreu alteração na concentração intercelular de CO₂, pode-se argumentar que a taxa assimilatória líquida não foi influenciada pela indisponibilidade de CO₂, mas esse pode não ter sido utilizado, devido a possíveis diminuições na atividade da Rubisco, como relatado por Allen et al., (1997) com a radiação UV-B e sugerido por Rahimzadeh et al., (2011) com radiação UV-C.

Tal fato pode ter diminuído a atividade da Rubisco na forma de carboxilação, e conseqüentemente, aumentado proporção de oxigenação da Rubisco, intensificando dessa forma a fotorrespiração para dissipar o excesso de energia, bem como auxiliar esses genótipos com tratamento UV-C, na manutenção do equilíbrio energético dentro das células como um todo (WINGLER et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2007; DRIEVER e KROMDIJK, 2013). Com o transcorrer do estresse, as limitações estomáticas podem restringir a utilização dos adenilatos e do poder redutor da parte fotoquímica, ocasionando assim, uma regulação na

cadeia de transporte de elétrons, de maneira a reduzir a produção desses compostos (MARTINAZZO et al., 2013) e, ou, ainda, serem acionados mecanismos de regulação da absorção da energia pelos fotossistemas ou do fluxo de elétrons na cadeia de transporte de elétrons (MURCHIE e LAWSON, 2013).

Vale ressaltar que as taxas assimilatórias líquidas, para os genótipos que apresentaram diferença em relação ao tratamento com UV-C, provavelmente foram afetadas pelos danos causados nas folhas, pela aplicação da radiação UV-C, e também outro fator poderia estar interferindo nessa análise, como por exemplo, um fator climático. Além disso, foi evidenciada uma pequena aceleração no ciclo, para as plantas expostas à radiação UV-C.

No ensaio 2, principalmente após a segunda dose de radiação, os tratamentos controles ainda, apresentavam botões florais, os demais além de apresentar botões florais, também tinham frutos verdes, enquanto que no ensaio 1, até o término das análises os do tratamento UV-C também apresentavam aparentemente maior número de botões florais abertos, enquanto que o controle estava apenas com a presença do botão floral formado. Em situações de florescimento e/ou produção de frutos, a maior parte dos fotoassimilados são destinados para essas regiões das plantas, entretanto essas translocações podem ter sido afetadas naquelas plantas que continham danos nas nervuras principais, pois essas contêm células especializadas para o transporte da seiva (VIDAL e VIDAL, 2003).

CONCLUSÕES

As respostas dos genótipos estudados permitiram verificar que a aplicação da radiação UV-C causou alterações fisiológicas, e as respostas são dependentes da sensibilidade de cada genótipo para essa radiação.

Não é evidenciada uma relação positiva, para uma possível tolerância, em relação ao nível de expressão desse gene que expressa a MT-sHSP23.6 frente a esse estresse, nessas condições experimentais.

Nesse sentido, é necessário mais pesquisas que vissem avaliar o comportamento do metabolismo primário frente a essa situação de estresse, e, em situações variadas, tendo em vista que a maior parte dos estudos é voltada para a radiação UV-B. E quando ocorrem estudos com UV-C, são principalmente relacionados ao metabolismo secundário, pois muito se sabe sobre radiação UV-C na pós-colheita de frutos, mas muito pouco sobre o comportamento em folhas.

CAPÍTULO 3

Déficit hídrico em plantas transformadas e não transformadas de tomate ‘Micro-Tom’ com diferentes expressões da sHSP23.6 mitocondrial

Resumo – A seca é o principal fator limitante da produção agrícola mundial, e os estresses abióticos costumam causar inúmeras perturbações nos processos metabólicos, bem como causar disfunção das proteínas. No entanto as proteínas de choque térmico ‘heat shock proteins’ (HSPs) são particularmente importantes para a sobrevivência das células sob tensão, pois além de serem proteínas constitutivas, pode ocorrer também aumento na síntese de algumas dessas proteínas. Então para examinar os possíveis papéis dessas proteínas na tolerância à seca, foi testado em plantas de tomate da variedade ‘Micro-Tom’, transformadas para diferentes níveis de HSPs mitocondrial (MT-sHSP23.6). Plantas de três genótipos de tomate ‘Micro-Tom’ (não transformadas, transformadas com superexpressão e com silenciamento) foram cultivadas em condições controladas de temperatura, fotoperíodo e densidade de fluxo de fótons. Quando as plantas encontravam-se com 44 dias após a semeadura, em período de indução floral, quinze plantas de cada genótipo foram mantidas em déficit hídrico por 5 dias. As análises de trocas gasosas, índice de clorofila e fluorescência transiente da clorofila *a*, foram realizadas no primeiro, terceiro e quinto dia após o início do déficit hídrico e somente ao final, no quinto dia também foram efetuadas medições simultâneas da decaída da fluorescência com a reflexão modulada a 820 nm. Ainda foi quantificado o teor de prolina nas folhas e alguns parâmetros de crescimento ao final do experimento. Baseado na interpretação dos resultados, desempenho fotoquímico em plantas com superexpressão da MT-sHSP23.6 foi mais eficiente que nos demais genótipos. Entretanto nas reações bioquímicas essa possível relação não foi evidenciada, ou seja, não contribuiu de maneira significativa para proporcionar um melhor desempenho diante do estresse, a fim de manter todo o processo fotossintético em funcionamento.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* Mill, seca, M-Pea.

Water deficit in transformed and non-transformed ‘Micro-Tom’ tomato plants with different expressions of mitochondrial sHSP23.6

Abstract: Drought is the main limiting factor in agricultural production worldwide; abiotic stresses usually cause several disturbances in the metabolic processes, as well as proteins dysfunction. Heat shock proteins (HSPs) are particularly important to cells survival under stress, because, besides being constitutive proteins, an increase in the synthesis of some of them can also occur. To examine the possible roles of these proteins in drought tolerance, we worked with ‘Micro-Tom’ tomato variety, transformed for different levels of mitochondrial

HSPs (MT-sHSP23.6). Tomato plants ‘Micro-Tom’ variety, of three genotypes (non-transformed, transformed with over-expression of sHSP23.6, and silencing sHSP23.6) were grown under controlled conditions of temperature, photoperiod, and photon flow density. Forty-four days after sowing, in floral induction period, fifteen plants of each genotype were kept in water deficit during five days. Gas exchange, chlorophyll index, and chlorophyll *a* fluorescence transient were analyzed at first, third, and fifth days after the onset of water deficit. At fifth day, simultaneous measurements of fluorescence decrease and 820-nm (MR) were made. Proline content and some parameters of growth were still measured at the end of the experiment. Based on the interpretation of the results, the photochemical performance in plants with over-expression MT-sHSP23.6 was more efficient than the other genotypes. However, in the chemical reactions this possible relationship was not observed, *i.e.*, did not contribute significantly to provide a better performance on stress, to keep the whole photosynthetic process in operation.

Key words: *Solanum lycopersicum* Mill, drought, M-Pea.

INTRODUÇÃO

O estresse hídrico é um dos fatores ambientais mais antigos que pode limitar a produtividade das culturas em todo o mundo (MISHRA et al., 2012; MONNEVEUX et al., 2013). Ao mesmo tempo é um dos fatores ambientais muito estudado (CHRISTEN et al., 2007; OUKARROUM et al., 2007; MASSACCI et al., 2008; WHALLEY et al., 2013), devido ao fato que este estresse afeta grande quantidade de áreas agriculturáveis em todo o mundo.

Atualmente as pesquisas estão em busca de cultivares mais tolerantes a seca (De RONDE et al., 2004; OUKARROUM et al., 2007; SAINT PIERRE et al., 2012), de forma a manterelevada produção das variedades cultivadas. Estudos que focam na possibilidade das plantas em tolerar por um maior período o estresse por seca são descritos, além de melhorar a produtividade das culturas, também se busca a exploração de terras cultiváveis que tenham quantidades limitadas de água (MISHRA et al., 2012)

Desta forma, a maioria dos estudos está sendo realizada com o objetivo de aumentar a eficiência no uso da água pelas plantas, focando em conjunto com a regulação estomática e possíveis mecanismos que possam aumentar a concentração de CO₂ no mesofilo mesmo em condições em que o estômato esteja quase que completamente fechado (CHRISTEN et al., 2007; KOCACINAR et al., 2008; SAGE e ZHU, 2011; SAGE et al., 2012).

O déficit hídrico geralmente está associado a altas temperaturas, e como a capacidade de termorregulação é altamente dependente da disponibilidade de água e tendo em vista

que, as plantas são organismos sésseis, as mesmas necessitam utilizar todos os seus recursos para encontrar a água disponível (HONG e VIERLING, 2000).

A resposta do vegetal ao déficit hídrico é fortemente influenciada pelo tempo, intensidade, duração e frequência do estresse, além das diversas interações planta-solo-atmosfera e das condições climáticas (SAINT PIERRE et al., 2012; DRIEVER e KROMDIJK, 2013). No entanto as respostas ao déficit hídrico podem variar quando ocorre em diferentes fases de crescimento das plantas (BÜRLING et al., 2013), além de que é conhecido que o estresse por déficit hídrico provoca alterações em diversas características fisiológicas, morfológicas e bioquímicas, de modo que também promove a síntese de solutos osmoprotetores, como a prolina, entre outros (MISHRA et al., 2012).

A fim de tolerar ou evitar o estresse hídrico, as plantas desenvolveram uma série de estratégias para manter o nível de água, quer seja pela absorção mais eficiente de água pelas raízes ou pela redução da evapotranspiração das partes aéreas. Deste modo, plantas mais tolerantes à seca possuem maior capacidade de manter o turgor e continuar exercendo o metabolismo mesmo em baixo potencial de água (MISHRA et al., 2012).

Assim, pesquisas de melhoramento genético e de progressos em genômica visam criar novas formas adaptativas para as plantas, de modo que possam suportar por maior período a falta de água no solo, baseando-se na seleção e cultivo de genótipos mais tolerantes ao estresse e em conjunto conseguir manter elevados padrões de produtividade, mesmo em menores quantidades de água (TAKEDA e MATSUOKA, 2008; FISCHER et al., 2011; BÜRLING et al., 2013; DRIEVER e KROMDIJK, 2013; MONNEVEUX et al., 2013; RAHAVI e KOVALCHUK, 2013).

Um grande número de genes que estão envolvidos na resposta ao estresse hídrico são descritos e caracterizados, dentre os relacionados com a produção das proteínas de choque térmico (do termo em inglês *Heat Shock Protein*) (BOSTON et al., 1996; FEDER e HOFMANN, 1999; LEE et al., 2000; NEPOMUCENO et al., 2002; WANG et al., 2004; NGAMHUI et al., 2012).

Anteriormente há relatos do envolvimento dessas proteínas na termotolerância, mas recentes estudos com plantas modelo têm revelado que várias condições de estresses ativam um subconjunto de genes sHSP, que geram os produtos gênicos denominados de proteínas de choque térmico (HSPs) (PRECZEWSKI et al., 2000; DESIKAN et al., 2001; SCARPECI et al., 2008; PEGORARO et al., 2011). As HSPs, que são induzidas em resposta a temperatura, também proporcionam proteção cruzada contra a seca e, ou deficiência d'água, o que confere

certo grau de sinergia na ação dessas proteínas (IQBAL et al., 2010), pois essas proteínas são normalmente encontradas em plantas submetidas ao déficit hídrico (VIERLING, 1991).

No entanto, há muito que examinar e elucidar em relação as suas funções, principalmente em questões de intercâmbios de organelas, pois essas estão localizadas em vários locais nas células, além da interação dessas com as demais proteínas de sua classe, mas de maior massa, pois essas não agem sozinhas ou de forma isolada, trabalhando em conjunto com as demais classes de HSPs (LIU e SHONO, 1999; SANMIYA et al., 2004; NAUTIYAL et al., 2005; NAUTIYAL e SHONO, 2010).

O uso de genótipos que apresentam diferenças quantitativas na expressão gênica de determinadas proteínas, quando submetidos a um fator estressante, podem ser usados para estudar os mecanismos de tolerância, por exemplo, à seca. Consequentemente, identificar e compreender os mecanismos de tolerância ao estresse por água é fundamental para o desenvolvimento de novas cultivares (NEPOMUCENO et al., 2002), não só para o tomate, mas também em outras espécies.

O objetivo do presente trabalho foi comparar os efeitos que o déficit hídrico apresenta no período de indução floral, sobre a atividade fotossintética de plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill.), da variedade Micro-Tom, selvagem e com diferentes níveis de expressão da MT-sHSP23.6.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.), da variedade Micro-Tom não transformada e transformada geneticamente para diferentes níveis de expressão de MT-sHSP23.6 mitocondrial, conforme descrito em Huther et al., (2013).

Sementes dos três genótipos foram semeadas em caixas tipo Gerbox®, e após sete dias, quando as plântulas estavam desenvolvidas, foram transplantadas para vasos plásticos de 500 mL tendo como substrato composto orgânico.

Essas plantas foram colocadas em câmaras de crescimento com condições controladas: densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo na altura central das copas das plantas em torno de $200 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 13 horas, e temperatura de $21 \pm 3^\circ\text{C}$. A irrigação foi realizada diariamente e, três vezes por semana foi aplicada solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950).

Depois de 44 dias após a semeadura (DAS), no período de indução floral, 15 plantas de cada genótipo foram mantidas em déficit hídrico por cinco dias. Também, não foi disponibilizada solução nutritiva para as plantas do controle e nem para as plantas estressadas, durante esse período. O tratamento controle foi considerado aquele em que as plantas permaneceram com irrigação diária.

Medidas do índice de clorofila, fluorescência transiente das clorofilas OJIP e trocas gasosas foram determinadas com intervalo de tempo após o estresse. As análises foram realizadas após o primeiro, terceiro e quinto dia de déficit hídrico.

Os teores de clorofila foram determinados, utilizando medidor portátil de clorofila (CL-01 Hansatech Instruments Ltda., King's Lynn Norfolk, UK, conforme metodologia descrita por Cassol et al., (2008), e expressos pelo índice de clorofila e as folhas utilizadas foram às mesmas da medida da fluorescência da clorofila *a*.

A fluorescência transiente OJIP foi medida na quarta folha de baixo para cima, sendo folhas jovens completamente expandidas e não destacadas. As folhas foram previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos utilizando um fluorômetro portátil (Modelo Handy PEA, Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK); após o período de escuro um flash de $3.400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi aplicado para a indução da fluorescência transiente OJIP. As intensidades de fluorescência transiente foram medidas entre $50 \mu\text{s}$ (fluorescência inicial - F_0) e 1 s; obtidos os valores da fluorescência transiente foram calculados os parâmetros do Teste JIP proposto por Strasser e colaboradores (STRASSER e STRASSER, 1995; TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2008).

Para as trocas gasosas foram utilizadas sempre as mesmas folhas durante todas as avaliações, sendo utilizadas as folhas expandidas imediatamente abaixo das folhas em que foram realizadas as medidas de fluorescência (3ª folha de baixo para cima). Para esta análise utilizou-se um analisador portátil a infravermelho de CO_2 (modelo LI-6400XT LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA), com densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo de $1.000,0 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração de CO_2 no interior da câmara de $380 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$, as medidas foram realizadas entre as 09:00 e 11:00hs. As variáveis medidas foram: taxa assimilatória líquida de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e concentração intercelular de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$).

No último dia de análises, foram realizadas medições simultâneas da cinética da decaída da fluorescência (DF) e a reflexão modulada a 820 nm (MR_{820}) (STRASSER et al., 2010). Primeiramente as folhas foram adaptadas ao escuro por 30 minutos, tempo necessário para a oxidação completa de todos os centros de reação (CR ou RC). Para realizar a medida

foi utilizado um fluorômetro Multifunctional Plant Efficiency Analyser –M-PEA (Hansatech Instrument Ltd. Lynn, Norkolk, PE3040NE, UK).

O pulso de luz saturante com densidade luminosa emitida pelo aparelho foi de $5.000 \mu\text{mol m}^{-2}$, durante 60 segundos. A aquisição dos dados para a reflexão modulada (MR) é na presença de luz, e a decaída de fluorescência (DF) é no escuro, ou seja, quando a luz é desligada.

A luz estando ligada, automaticamente está sendo medido a fluorescência transiente (dados não usados), que desaparece em nanosegundos, e os dados da DF são registrados quando a luz actínica é desligada, podendo ser detectados em milisegundos a horas. Esses sinais registrados no escuro, para a DF ocorrem após os $300 \mu\text{s}$, ou seja, com intervalos a cada $10 \mu\text{s}$, posteriormente $100 \mu\text{s}$, 1ms , 10ms , 100ms e 1s . Nesses intervalos é realizado as aquisições de dados equivalentes para cada faixa, do tempo total decorrido de $300 \mu\text{s}$, 3 , 30 , 300ms , 3 e 30s , e o número de pontos registrados em cada faixa varia, pois com o passar do tempo vai aumentando o intervalo de escuro.

Esses pontos de registro apresentam diferentes picos, como descritos por Strasser et al.,(2010), Goltsev et al., (2012), Gao et al., (2013), Oukarroum et al., (2013), Krasteva et al.,(2013), com um aumento rápido para o pico I_1 (a 7ms), com imediato declínio, pico I_2 (aproximadamente em 100ms), seguido de um extenso período de duração (entre $0,5$ a 10s), para o I_3 .

Conforme o manual do aparelho e alguns autores (STRASSER et al., 2010; GAO et al., 2013; OUKARROUN et al., 2013) a funcionalidade desse instrumento, o M-PEA, pode ser em diferentes faixas de comprimento de onda, pois possui diferentes diodos, e detectores distribuídos pela periferia da unidade, além de filtros para remover densidades indesejadas da luz visível. Dessa maneira filtros de alta qualidade óptica foram usados para proteção dos detectores da DF ($735\pm 15 \text{nm}$) e reflexão modulada ($820\pm 20 \text{nm}$), com fotodiodo altamente sensível para monitorar a absorção do FSI durante as medições simultâneas, sem perturbar o FSII. Desta forma, torna o método conveniente e confiável para medir também a reflexão modulada do FSI e da Plastocianina.

Desta maneira, a partir do sinal de reflexão modulada à 820nm (MR_{820} ou MR), pode-se calcular a razão MR/MR_0 , onde MR_0 representa o valor do início da iluminação actínica ($0,7 \text{ms}$ ou $70\mu\text{s}$), que é complementar da fração do $(I_{\text{abs}}/I_{\text{inc}})_{820}$ onde I_{inc} (fluxo de luz incidente) e I_{abs} (absorvido) para a amostra a 820nm . Essa razão demonstra as mudanças de estado redox nos centros de reação da plastocianina (PC^+) e do (P700^+) (OUKARROUM et al., 2013).

Ao final do experimento também foram medidas a área foliar (AF), massa seca das folhas (MSF), massa secado caule(MSC) e massa seca das raízes (MSR), permitindo o cálculo posterior da massa seca total das plantas e razão massa seca parte aérea sobre massa seca das raízes. A área foliar foi determinada utilizando um medidor de área foliar (Modelo LI-3100 Li-Cor Inc., Lincoln, NE). Também foi quantificado o teor de prolina nas folhas, expresso em mM prolina⁻¹de massa fresca, conforme metodologia de Bates et al., (1973), com adaptações.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento para: as análises simultâneas da Reflexão Modulada a 820nm e Decaída de Fluorescência, análise dos parâmetros de crescimento e o teor de prolina. Seis repetições por tratamento para as trocas gasosas e 10 repetições para o índice de clorofila. As médias dos parâmetros de trocas gasosas, de crescimento, teor de prolina e índice de clorofila foram comparados pelo Teste Tukey ($p < 0,05$). Para as determinações de fluorescência da clorofila *a* foi utilizado 15 repetições por tratamento.

RESULTADOS

Índice de clorofila

Os dados de índice de clorofila, de acordo com os dias após o início do déficit hídrico para os genótipos das plantas de tomate, da variedade Micro-Tom estão na Figura 7. Para o genótipo selvagem (Figura 7A) as plantas estressadas durante todo o ensaio tiveram maiores valores para o índice de clorofila. Para as plantas com superexpressão da MT-sHSP23.6 (Figura 7B) não houve diferença significativa entre o controle e o déficit hídrico. Contudo para as plantas do genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 (Figura 7C), o déficit hídrico provocou pequena redução nos índices de clorofila em relação ao controle, no 3º dia após o início do déficit hídrico e no 5º dia com diferenças significativas entre o controle e o déficit hídrico.

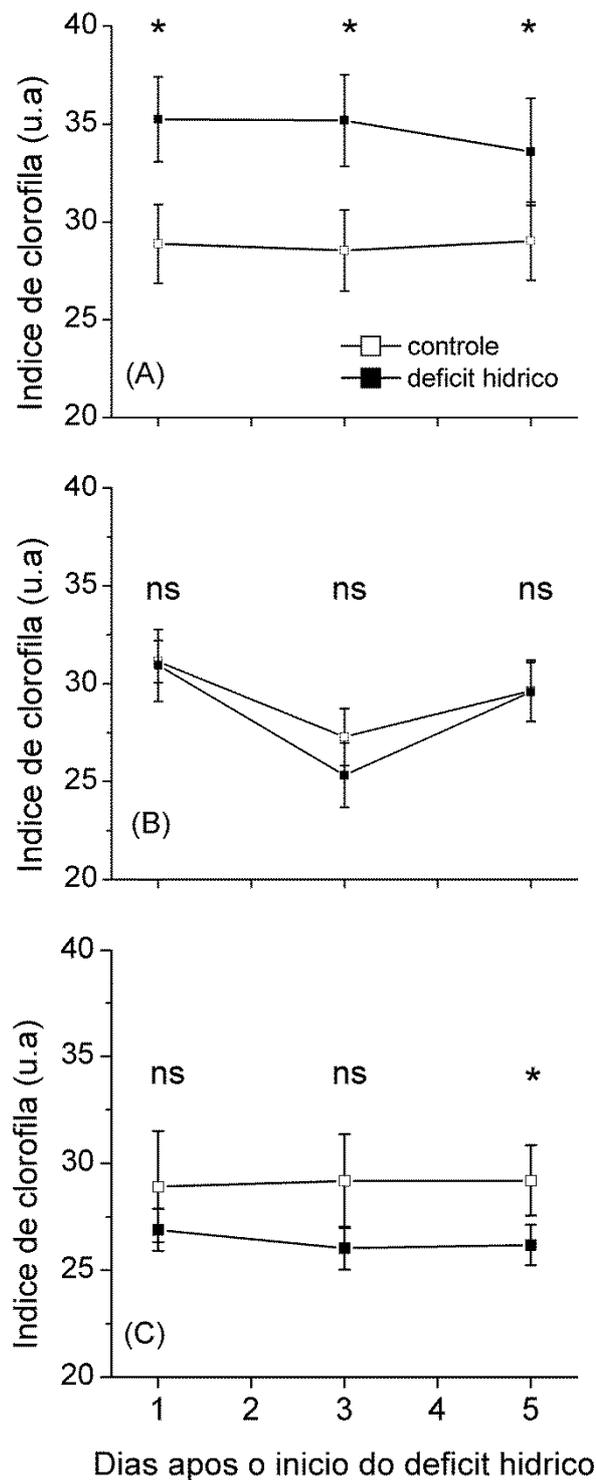


Figura 7 - Índice de clorofila, unidade relativa, de plantas de tomate 'Micro-Tom', cultivadas sob diferentes condições de disponibilidade de água (controle e déficit hídrico) (A) genótipo selvagem, (B) genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 e (C) genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6. (ns) não significativo e (*) diferença estatística pelo Teste Tukey ($p < 0,05$). Barra indica erro padrão da média.

Fluorescência transiente da clorofila a

Os dados para a fluorescência transiente da clorofila *a* em relação aos dias após o início do estresse por déficit hídrico estão contidos na Figura 8. Nas plantas do genótipo selvagem (Figura 8A) pouca alteração na atividade do FSII foi observada, somente apresentando maiores variações nos parâmetros de fluorescência no quinto dia após o início do estresse. Nesse último dia índice de performance (PI_{abs}) e o índice de performance total (PI_{total}) apresentaram uma redução.

Nas plantas do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6a partir do terceiro dia, sofreram algumas alterações, principalmente no tempo para atingir F_M (t_{FM}). Intensificando no quinto dia, o período em que mais alterações ocorreram, o que refletiu nos parâmetros PI_{abs} e PI_{total} , que são parâmetros que descrevem a atividade fotoquímica de forma mais abrangente, como descrito anteriormente (Figura 8B). Do mesmo modo, o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 também apresentou reduções nos dois parâmetros (PI_{abs} e PI_{total}), mas essas reduções começaram a partir do primeiro dia de seca, e de modo mais drástico para o PI_{total} , sendo que esses parâmetros foram decrescendo a medida que as plantas permaneciam em um período mais longo com déficit hídrico (Figura 8C).

O tempo para atingir a fluorescência máxima ($t_{for\ F_M}$) diminuiu em todos os genótipos em relação ao controle. Para os parâmetros técnicos, como: área (área complementar total entre a indução da curva de fluorescência e F_M); N (número de giros de redução, oxidação e re-redução de Q_A no tempo entre a luz ser ligada até atingir F_M); $Sm/t(F_M)$ (expressa o estado redox médio de Q_A no tempo entre zero e t_{FM} (pode ser utilizada para quantificar a atividade de transporte de elétrons), tiveram reduções ao longo das análises, para os três genótipos, mas maior diminuição para as plantas do genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 principalmente ao quinto dia após o início do déficit hídrico, ou seja, ocorrendo diminuição da energia e da manutenção ao longo da cadeia de transporte de elétrons.

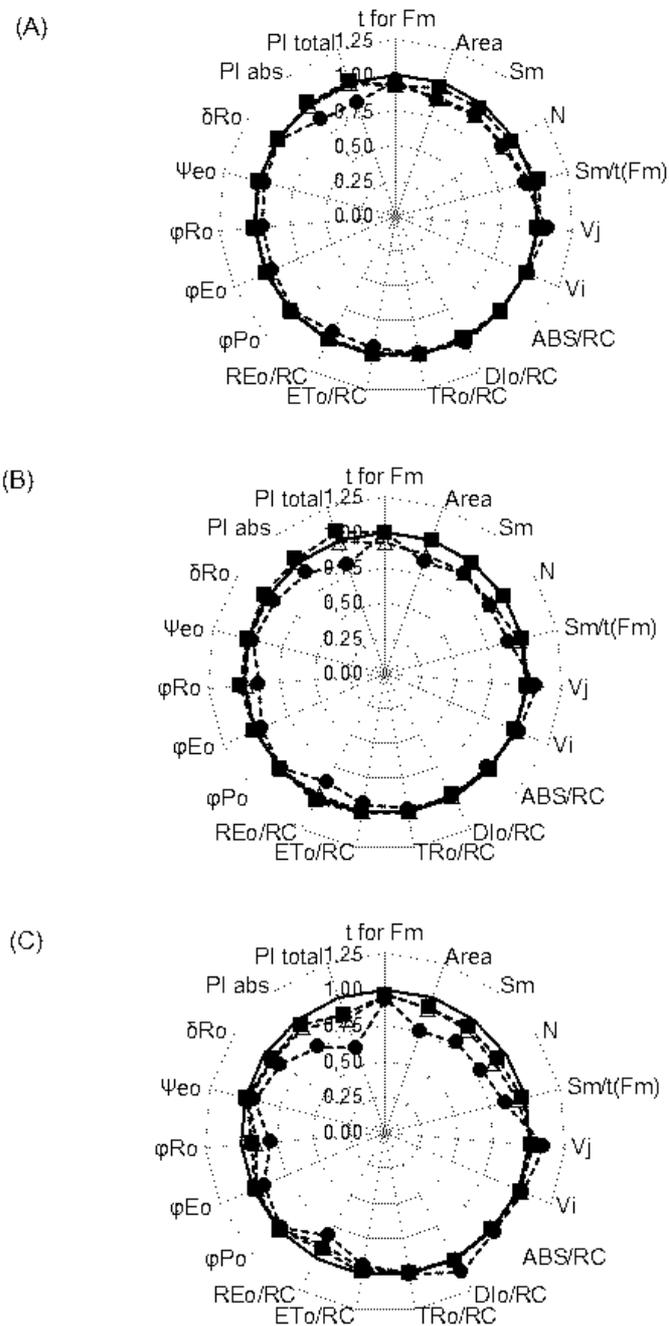


Figura 8 - Parâmetros do Teste JIP, em relação ao respectivo controle, obtidos a partir da fluorescência transiente OJIP das clorofilas de plantas de tomate ‘Micro-Tom’, cultivadas sob diferentes condições de disponibilidade de água (controle e déficit hídrico) (A) genótipo selvagem (B) genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 e (C) genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6. (—) controle, (---■---) 1, (---Δ---) 3 e (---●---), 5 dias após o início do déficit hídrico.

A fluorescência variável relativa no passo J (2ms) (V_J) e a fluorescência variável relativa no passo I (30ms) (V_I) elevaram-se para os três genótipos, mas em maior proporção para o parâmetro V_J , o que indica o reflexo do acúmulo de Q_A^- , ou seja, menor fluxo de elétrons e no passo I, o que permite deduzir o comportamento do fluxo de elétrons que atinge os aceptores finais do FSI, a partir do plastoquinol.

Para os fluxos específicos, as atividades expressas por centro de reação (RC), apenas o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 ocorreu maior dissipação de energia (DI_0/RC), e nos demais genótipos não houve alteração em relação ao controle.

Os parâmetros que descrevem a reoxidação de Q_A^- via transporte de elétrons em um centro de reação ativo (ET_0/RC) e redução do acceptor final de elétrons no lado acceptor de elétrons do FSI por centro de reação no $t=0$ (RE_0/RC), apresentaram redução no 5º dia para os genótipos com silenciamento da MT-sHSP23.6, acarretando assim em menores produtos gerados pela fase fotoquímica da fotossíntese, principalmente para o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6, o que refletiu no PI_{abs} e no PI_{total} para este genótipo.

Em relação aos rendimentos ou taxas de fluxos, que descrevem: o rendimento quântico máximo fotoquímico primário em $t=0$ (ϕ_{P_0}); rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- , para o intersistema de aceptores de elétrons (ϕ_{E_0}); rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o acceptor final de elétrons do FSI (ϕ_{R_0}); probabilidade (no tempo zero) que um éxciton capturado mova elétrons pela cadeia de transporte de elétrons além de Q_A^- (\square_{E_0}) e a eficiência com que um elétron pode mover dos aceptores finais de elétrons do intersistema reduzidos para os aceptores finais do FSI (δ_{R_0}), apenas ϕ_{R_0} decresceu em relação ao controle, principalmente para o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 a partir do primeiro dia de análise e com redução tempo dependente. Entretanto, o parâmetro δ_{R_0} também teve reduções, porém em menor escala que o anterior. Contudo, para esses dois parâmetros, para os demais genótipos somente ao 5º dia apresentaram diminuições.

Trocas gasosas

A taxa assimilatória líquida de CO_2 (A , $\mu mol m^{-2} s^{-1}$), condutância estomática (g_s , $mol H_2O m^{-2} s^{-1}$); e concentração intercelular de CO_2 (C_i , $\mu mol CO_2 mol^{-1}$) para todos os genótipos das plantas de tomate da variedade. Micro-Tom estão representados na Figura 9.

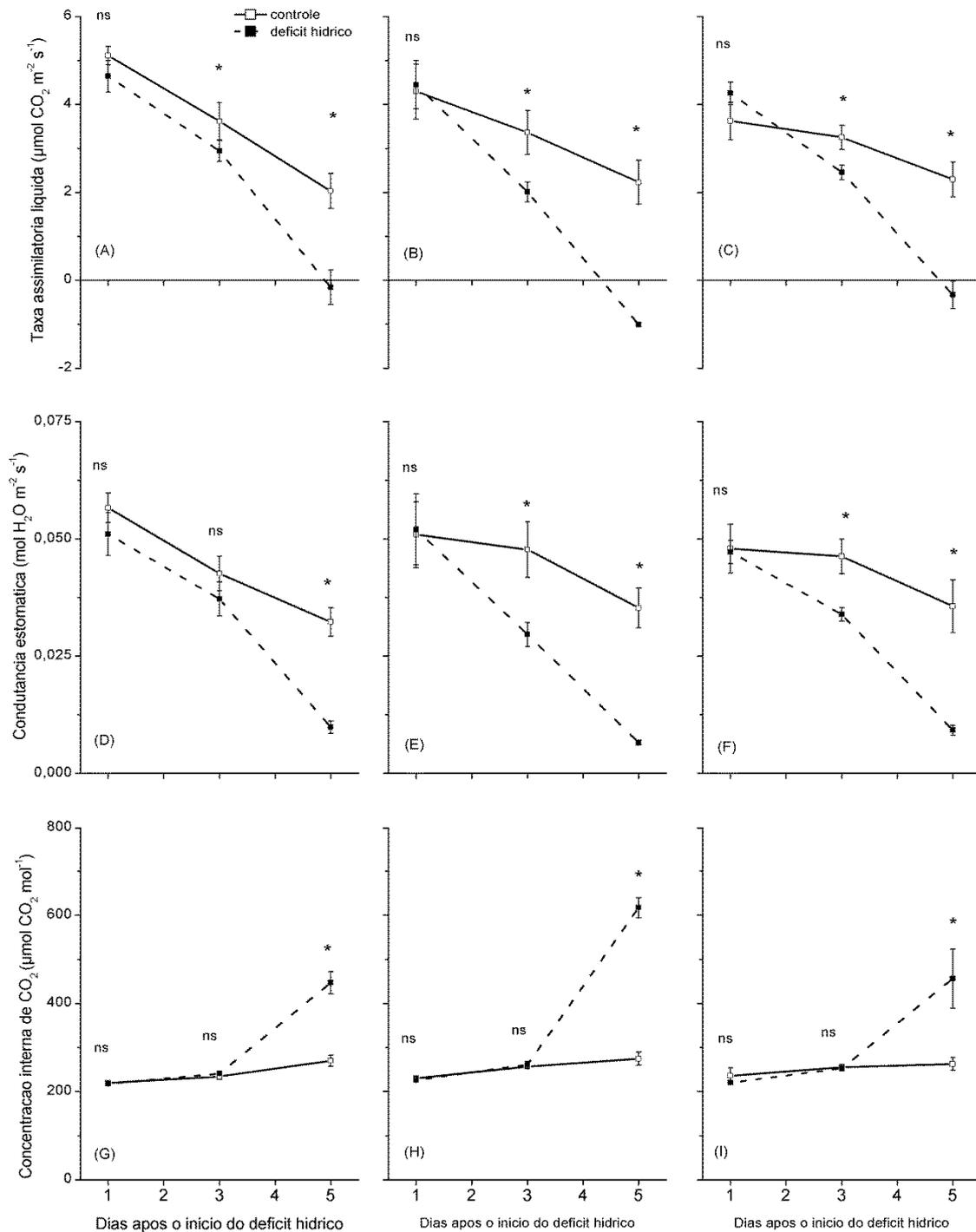


Figura 9 - Taxa assimilatória líquida de CO₂ (A, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A-C); condutância estomática ($\text{gs, mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (D-F); e concentração intercelular de CO₂ ($C_i, \mu\text{mol mol}^{-1}$) (G-H), de plantas de tomate ‘Micro-Tom’, cultivadas sob diferentes condições de disponibilidade de água (controle e déficit hídrico). (A, D e G) genótipo selvagem, (B, E e H) genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 e (C, F e I) genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6.. (ns) não significativo e (*) diferença estatística pelo Teste Tukey ($p < 0,05$). Barra indica erro padrão da média..

No primeiro dia após o início do déficit hídrico, todos os genótipos praticamente se comportaram de maneira similar, em relação aos seus controles, para esses parâmetros analisados.

Ao terceiro dia a taxa assimilatória líquida (Figura 9 A-C), foi reduzida em relação ao primeiro dia, para todos os genótipos, ou seja, diferiram estatisticamente de seus controles. Para o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 e com superexpressão da MT-sHSP23.6, ocorreu uma redução de 59 e 75% respectivamente, para as plantas sob déficit hídrico. Contudo, também houve uma redução para os controles de todos os genótipos para a taxa assimilatória líquida.

Na avaliação realizada ao final do experimento, ou seja, no quinto dia após o início do déficit hídrico, a taxa assimilatória líquida apresentou redução tanto para os controles quanto para os tratamentos com déficit hídrico, mas essa redução foi maior no tratamento por seca, onde diferiram estatisticamente, inclusive com valores negativos. O tratamento por déficit hídrico apresentou reduções de 107, 145 e 114% para o genótipo selvagem, com superexpressão da MT-sHSP23.6 e com silenciamento da MT-sHSP23.6, respectivamente.

Em relação aos dados de condutância estomática (Figura 9 D – F) ao terceiro dia após o início do déficit hídrico houve redução no tratamento por seca em todos os genótipos, entretanto somente o genótipo selvagem não diferiu significativamente do controle. No entanto os genótipos com superexpressão da MT-sHSP23.6 e com silenciamento da MT-sHSP23.6 demonstraram reduções de 62 e 73%, respectivamente.

No quinto dia de análise, a condutância estomática apresentou redução tanto para o controle quanto para o tratamento por déficit hídrico, em todos os genótipos, mas essa redução foi maior no tratamento por seca, ao passo que os genótipos selvagem, com superexpressão da MT-sHSP23.6 e com silenciamento da MT-sHSP23.6 reduziram em torno de 31, 20 e 25%, respectivamente.

Para os dados de concentração interna de CO₂ (Figura 9G - I), no primeiro e terceiro dia, para os três genótipos, não houve alteração em relação aos seus controles. Entretanto, ao final do experimento, no tratamento por déficit hídrico, os três genótipos apresentaram um elevado incremento em relação aos seus controles. Nesse sentido, esse aumento no tratamento por seca, quando comparados aos seus controles foi de 69% para o genótipo selvagem, 124% para o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 e 73% para o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6.

Análise da cinética de Reflexão Modulada a 820 nm (MR/MR_o)

A reflexão modulada a 820 nm, para as plantas dos três genótipos estão na Figura 10. Considerando que a reflexão modulada reflete o estado redox do P₇₀₀⁺ e da plastocianina (PC⁺), quando ocorre a interrupção da luz actínica na decaída da fluorescência, no início, quando não há luminosidade, o P₇₀₀ e a plastocianina (PC) encontravam-se todos reduzidos, devido ao período que permaneceram no escuro (30 minutos), e os elétrons que chegavam, eram oriundos da plastoquinona. Posteriormente há uma queda na amplitude da curva MR/MR_o. Essa fase indica um aumento de I_{abs}/I_{inc} a 820 nm, como abordado anteriormente, ou seja, P₇₀₀ está se oxidando, doando elétrons, o que aumenta a absorbância.

No período de 10 ms pode-se analisar que o potencial máximo do P₇₀₀, de forma isolada, nos genótipos selvagem e com silenciamento da MT-sHSP23.6 houve um comportamento similar, onde os controles apresentaram maior capacidade de oxidação do FSI, quando comparados aos seus tratamentos com déficit hídrico (Figura 10A e C). Entretanto as plantas do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 não apresentou diferença entre os dois tratamentos (Figura 10B).

Posterior a esse período houve aumento na amplitude da curva MR/MR_o, onde ocorre a fase de re-redução de P₇₀₀ e da PC. Essa amplitude foi superior, ou seja, ultrapassou a observada no início, para todos os genótipos, de modo que começavam a chegar novamente os elétrons do FSII ao FSI. Tanto a PC quanto P₇₀₀ estavam em estado muito reduzido, em maiores proporções para o controle do genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6. No genótipo selvagem e com superexpressão da MT-sHSP23.6 foi similar aos seus controles. Somente notou-se que o tempo necessário para atingir a maior amplitude, diferiu de genótipo para genótipo.

Após a fase da amplitude da curva ocorreu nova diminuição pois isto indica que há novamente a re-oxidação da PC e P₇₀₀. O genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 manteve em níveis similares para os dois tratamentos, enquanto, no genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 (Figura 10C), o controle estava em níveis maiores de reflexão pois acredita-se que havia chegado maiores quantidades de elétrons do FSII que no tratamento com déficit hídrico, ou seja, mais oxidado. O mesmo evidenciado para o genótipo selvagem, mas em menor intensidade.

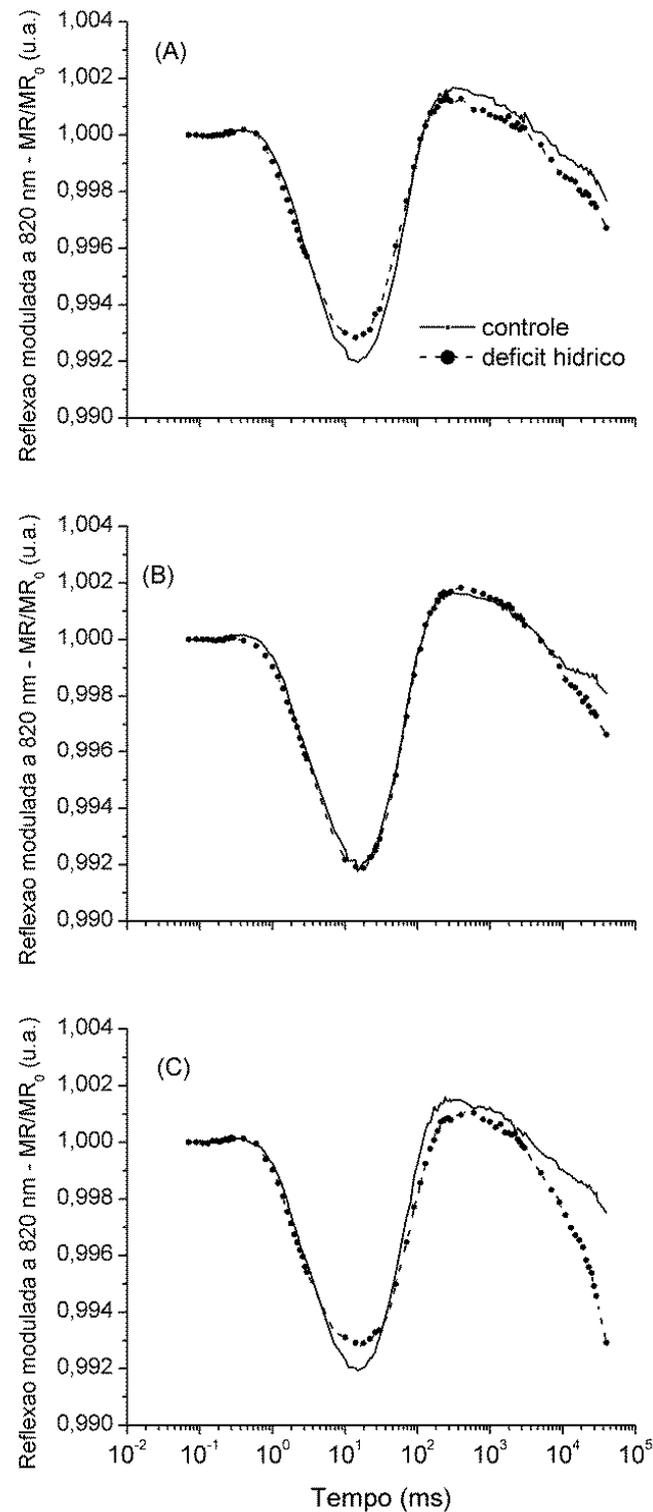


Figura 10 - Reflexão modulada a 820 nm aos cinco dias após o início do déficit hídrico em plantas de tomate 'Micro-Tom', cultivadas sob diferentes condições de disponibilidade de água (controle e déficit hídrico) (A) genótipo selvagem, (B) genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 e (C) genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6. Os sinais de reflexão modulada a 820 nm representados pela razão MR/MR_0 , onde MR_0 é o valor onde começa a iluminação actínica (a 0,7ms).

Análise da cinética da Decaída de Fluorescência (DF)

A intensidade da decaída da fluorescência, medida no tempo de 20 μs ($DF_{20\mu\text{s}}$), depois da interrupção da luz, para os três genótipos estão na Figura 11. Essas curvas de indução da decaída da fluorescência são apresentadas em relação ao tempo JIP, o mesmo tempo da fluorescência transiente.

Os pontos I_1 , I_2 e I_3 , foram determinados conforme proposto por Strasser et al., (2010), nos três genótipos. Entretanto, somente pode ser mais perceptível o ponto I_1 , com maior intensidade, mas em diferente tempo do observado normalmente, conforme relatado por alguns autores (STRASSER et al., 2010; GAO et al., 2013) em que o ponto I_1 ocorre em 7 ms, quando a DF apresenta um aumento rápido, o que gera um pico, após um declínio, até uma pequena amplitude novamente, aproximadamente a 100 ms e posteriormente um terceiro ponto, após um longo período (entre 0,5 a 10 segundos).

Nesse experimento, para os três genótipos houve um aumento para o ponto I_1 , nos primeiros períodos em que a luz foi desligada, no período de aproximadamente 3 ms, ou seja, anterior no período normalmente observado, onde, também, ocorreu uma redução para todos os tratamentos com déficit hídrico. De acordo com Goltsev et al., (2005), este pico representa o aumento do gradiente elétrico transmembrana, formado pelo acúmulo de CR com Q_B semireduzidos ($Z^+P680Q_AQ_B^-$) e pelo FSI quando está na forma oxidada.

No genótipo selvagem o tratamento com déficit hídrico promoveu uma diminuição para o ponto I_1 em relação ao controle de 4,61% (Figura 11A). No genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 redução de 7,93% (Figura 11B) e no genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 decresceu 1,42% (Figura 11C).

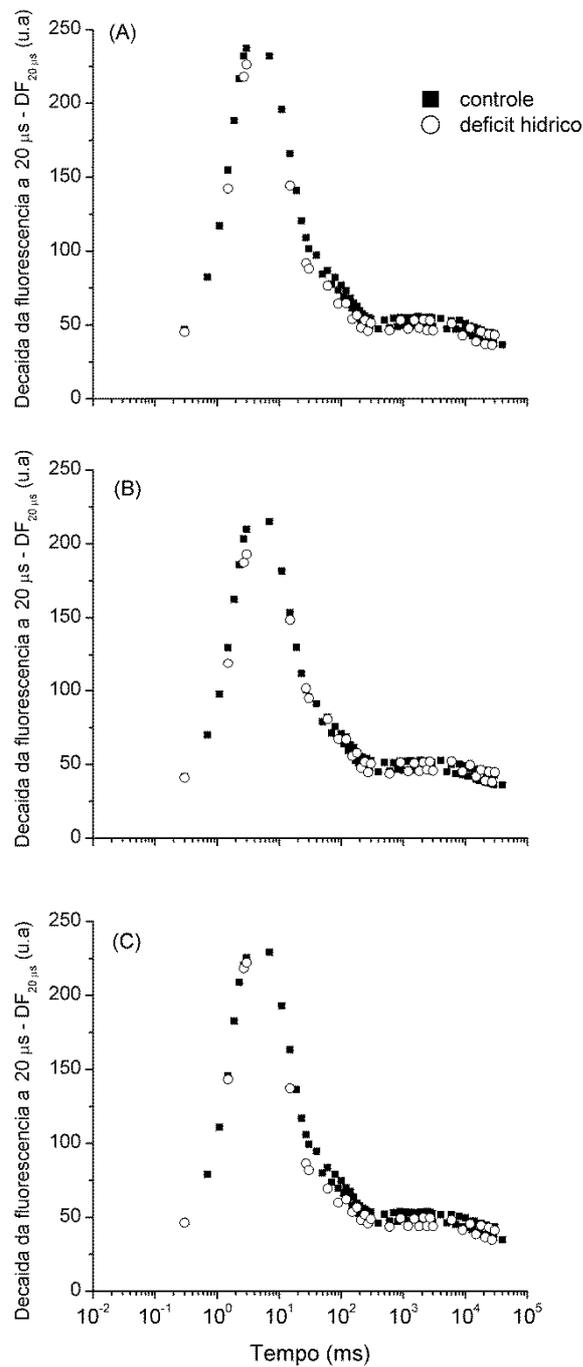


Figura 11 - Intensidade de decaída da fluorescência (DF) induzidas por um pulso saturante de luz actínica vermelha, medida a 20 μ s aos cinco dias após o início do déficit hídrico em plantas de tomate 'Micro-Tom', cultivadas sob diferentes condições de disponibilidade de água (controle e déficit hídrico) (A) genótipo selvagem, (B) genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 e (C) genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6. As curvas de indução de DF (DF vs JIP-tempo) foram construídas a partir da cinética de DF vs. tempo de decaída obtidas durante a interrupção da luz actínica (escuro); cada um deles representa a intensidade de DF a um certo tempo de decaída vs. JIP-tempo em que o intervalo de tempo começou.

O ponto I_2 ocorreu próximo a 30 ms para todos os genótipos, onde o genótipo selvagem e com silenciamento da MT-sHSP23.6 apresentaram comportamento similar, mas com maior amplitude para o controle do genótipo transformado. No mesmo ponto, o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6o tratamento por déficit hídrico não diferiu do controle, sugerindo que esta transformação genética, neste genótipo, e nessas condições experimentais favoreceu a uma proteção maior, mantendo a atividade do intersistema, ou seja, ocorreu menor distúrbio, tendo em vista que este ponto está interligado com a re-abertura do P_{680} e com a transferência de elétrons de forma acelerada pela quinona (Q_B), na forma reduzida, enquanto que o FSI está re-oxidando plastoquinol (PQH_2), antes mesmo da redução completa do *pool* de plastoquinona ($Z^+P680Q_A^-Q_B^-$) (GOLTSEV et al., 2009; STRASSER et al., 2010). O contrário foi verificado para o genótipo selvagem e com baixa expressão da MT-sHSP23.6, em que o controle apresenta maior intensidade, e só modificou a partir do I_2 , quando começa a se distanciar, reduzindo a intensidade. Esse aumento para o controle pode ser devido a um *pool* maior de elétrons na cadeia de transporte de elétrons. O terceiro ponto ou I_3 nesse experimento se observou entre 500 e 600 ms.

Determinação do teor de prolina

Os dados da avaliação do teor de prolina para as plantas dos três genótipos, ao final do experimento, ou seja, cinco dias após o início do déficit hídrico estão apresentados na Figura 12. De maneira geral, todos os genótipos incrementaram o teor de prolina, para o tratamento com déficit hídrico.

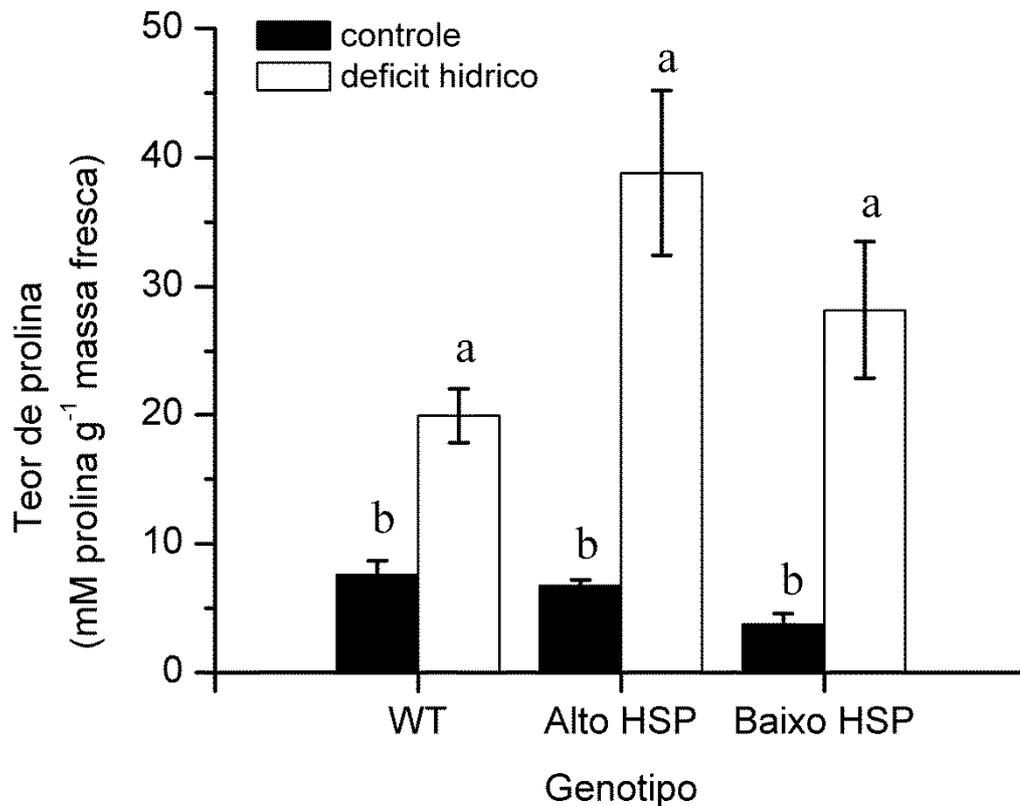


Figura 12 - Teor de Prolina aos cinco dias após o início do déficit hídrico em plantas de tomate 'Micro-Tom', genótipo selvagem (WT), genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 (Alto HSP) e genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 (Baixo HSP), submetidas a condições normais de irrigação e cinco dias de déficit hídrico. Médias comparadas dentro de cada genótipo e seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% (n = 4). Barra indica erro padrão da média.

O acréscimo no teor de prolina para as plantas dos genótipos selvagem, com superexpressão da MT-sHSP23.6 e com silenciamento da MT-sHSP23.6 correspondeu respectivamente a, 163, 478 e 652% nas plantas submetidas ao déficit hídrico em relação aos respectivos controles. Entretanto, levando em conta que a proporção de prolina encontrada no controle do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 foi próxima ao dobro do que encontrada no controle do genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 é evidente que as médias desse genótipo foram maiores.

O acúmulo de prolina para as plantas do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 e o selvagem em condições normais, foram similares, porém em menores níveis para o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6. E quando comparadas as médias dentro

de cada genótipo a maior acumulação de prolina foi para o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6, com 38,8 M prolina g⁻¹ massa fresca.

Análise dos parâmetros de crescimento

Os parâmetros relacionados à análise de crescimento para os três genótipos submetidos ao déficit hídrico e seus respectivos controles estão na Tabela 10. As médias dentro de cada genótipo, foram pouco alteradas nesses parâmetros, somente a área foliar e a massa seca das folhas para o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 que teve uma redução de 13% para o tratamento com déficit hídrico, na massa seca das folhas. Em relação à área foliar, todos os genótipos apresentaram diferença significativa. Dessa maneira, o tratamento por déficit hídrico, apresentou uma redução de 15% para o selvagem, 28% para o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 e 28% para o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6.

Tabela 10 - Variáveis de crescimento, medidas ao quinto dia de déficit hídrico, de plantas de tomate 'Micro-Tom', tipo selvagem, com superexpressão da MT-sHSP23.6 e com silenciamento da MT-sHSP23.6, submetidas a condições normais de irrigação e cinco dias de déficit hídrico

Parâmetros de crescimento	Selvagem		Superexpressão da MT-sHSP23.6		Silenciamento da MT-sHSP23.6	
	Controle	Déficit Hídrico	Controle	Déficit Hídrico	Controle	Déficit Hídrico
Área Foliar (cm ² planta ⁻¹)	138,78 a *	117,57 b	164,56 a	117,05 b	161,84 a	115,42 b
Massa seca raízes (g planta ⁻¹)	0,074 a	0,075 a	0,120 a	0,121 a	0,086 a	0,068 a
Massa seca caule (g planta ⁻¹)	0,260 a	0,268 a	0,273 a	0,271 a	0,300 a	0,265 a
Massa seca folhas (g planta ⁻¹)	0,452 a	0,415 a	0,630 a	0,545 b	0,557 a	0,444 a
Massa seca total (g planta ⁻¹)	0,787 a	0,759 a	1,024 a	0,937 a	0,943 a	0,779 a
Razão massa seca parte aérea/raízes	9,78 a	9,36 a	7,61 a	6,83 a	10,56 a	10,74 a

* Médias comparadas dentro de cada genótipo e seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% (n = 4)

DISCUSSÃO

As plantas ao longo de sua evolução desenvolveram mecanismos para manter o crescimento e desenvolvimento e evitar a maioria dos fatores que viessem a prejudicar a sua homeostase. Para isso dependem da diversidade genômica e arranjos de mecanismos de defesa, para modelar-se durante períodos de mudanças, em situações estressantes, a fim de principalmente manter o desempenho fotossintético, além de otimizá-lo em diferentes situações (TIMPERIO et al., 2008). Entretanto, nem sempre isso é suficiente ou possível, uma vez que dependendo do estresse e da duração, este pode ser letal para o vegetal, pois pode ocasionar várias perturbações e não haver tempo hábil para defesa desse vegetal (FISCHER et al., 2011).

Dentre os fatores ambientais, a seca é o principal fator limitante da produção agrícola mundial (WANG et al., 2013; De RONDE et al., 2004; TAKEDA e MATSUOKA, 2008) e a produtividade nessas condições vai depender das condições do clima e do solo, que influenciam a quantidade total desse recurso, bem como da eficiência do seu uso pelo organismo, pois o déficit hídrico pode ser definido como todo o conteúdo de água de um tecido ou célula situado abaixo do conteúdo de água mais alto exibido no estado de maior hidratação (FICHER et al., 2011), sendo que para ocorrer uma possível aclimatação é imprescindível manter o conteúdo de água na folha (MISHRA et al., 2012).

Vários processos na planta podem ser influenciados pelo estresse hídrico, dentre eles o potencial de água na folha, a resistência estomática, a transpiração, a fotossíntese, a temperatura e o murchamento da folha (MARENCO e LOPES, 2009).

Nesse experimento, pode-se observar, que alguns desses fatores, e, ou sintomas, como por exemplo, o murchamento das folhas, em todos os genótipos, a partir do quarto dia, e em maior intensidade no último dia das análises. Isso refletiu na redução da área foliar, que pode ter sido devido principalmente a diminuição do conteúdo de água e da redução da turgidez da folha.

Essa redução na área foliar também foi relatada por Mishra et al., (2012), em plantas de tomate submetidas ao déficit hídrico, sendo que essas plantas continham um gene de *Arabidopsis* (gene *ATHB-7DTL-20*), que é considerado importante em situações de estresse. Esses autores ainda enfatizam que a redução na área foliar contribui para manter o conteúdo de água na folha. Entretanto, outros pesquisadores sugerem que essa redução na área foliar é um dos mecanismos de adaptação, sendo também uma resposta precoce a esse estresse,

diminuindo assim a superfície transpirante (MARRON et al., 2003; STERCK et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013).

Pode-se sugerir com isso, que esses fatores contribuíram para uma menor taxa de crescimento nas folhas do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6, pois a massa seca das folhas ao final do experimento foi menor para as plantas desse genótipo submetidas a seca. Entretanto, os demais parâmetros relacionados ao crescimento não reduziram. Indicando assim, que não somente as folhas são responsáveis pela produção de fotoassimilados para o crescimento do tomateiro, conforme enfatiza Boamah et al., (2011), que o caule, também pode contribuir significativamente para o crescimento do tomateiro.

Geralmente o déficit hídrico provoca um acentuado crescimento das raízes (WHALLEY et al., 2013), sendo que as cultivares mais tolerantes apresentam sistemas radiculares mais profundos e com maior massa seca (NONNEVEUX et al., 2013). Entretanto, nesses genótipos testados não houve melhoria nas características das raízes, o que poderia proporcionar maior massa seca para o tratamento com déficit hídrico, pois não diferiram do controle. Isso pode ser devido ao pequeno intervalo de tempo que foram submetidas ao déficit hídrico, além de estarem em período de indução floral, sendo um dos períodos mais sensíveis para o tomateiro é o reprodutivo. Dessa forma, os carboidratos tendem a acumular-se nas folhas, em detrimento da futura frutificação, não sendo translocados para as raízes, ocorrendo dessa maneira uma competição e conseqüentemente apresentam um menor crescimento das raízes (CASTRO et al. 2008).

No presente experimento, também não se observou sinais que demonstrassem o princípio de senescência, como alguns autores relatam (RIVERO et al., 2007; WARREN et al., 2011; WANG et al., 2013). Talvez devido ao curto período de exposição ao déficit hídrico, pois na literatura é relatado o aparecimento do amarelecimento, após um período maior de estresse.

Takeda e Matsuoka (2008) alertam que uma característica particularmente relevante, que confere tolerância à seca é o fato de apresentar um atraso na senescência foliar quando submetido ao déficit hídrico. Isso foi verificado principalmente para o genótipo selvagem, pois apresentava maiores índices de clorofila, que seu controle. Além de que senescência induzida pela seca torna as plantas suscetíveis ao estresse oxidativo que influencia severamente o crescimento (WANG et al., 2013).

Outro mecanismo-chave adaptativo em muitas plantas cultivadas sob estresses abióticos, incluindo o déficit hídrico é a acumulação de certos compostos orgânicos de baixa massa molecular, geralmente referido como osmólitos compatíveis como álcoois de açúcares

(sorbitol e manitol), glicina betaína e prolina, que não interferem na atividade das enzimas (HARE et al., 1998; SAKAMOTO e MURATA, 2002). De Ronde et al., (2004), enfatizam que durante estresses a prolina pode ser um regulador osmótico, protetor contra a desnaturação enzimática, reserva de carbono e nitrogênio. Foi verificado nas plantas submetidas ao déficit hídrico maior teor de prolina nas folhas, entretanto para as reações bioquímicas, em nenhum genótipo, essa elevada produção de prolina contribuiu de forma significativa para manter as atividades, pois apresentaram uma redução tempo-dependente tanto para *A*, como para *gs*, o que são frequentemente associadas (SAVVIDES et al., 2012). No entanto, Nonneveux et al., (2013) salientam que a condutância estomática é mais sensível à depleção de água, do que a taxa fotossintética, além de que o fechamento estomático é considerado uma linha de defesa contra a seca, principalmente pela inibição da transpiração.

Todavia a redução da capacidade bioquímica dos genótipos, não foi devido a queda na concentração interna de CO₂ (*C_i*), pois geralmente há uma correlação entre a baixa condutância estomática a baixa concentração interna de CO₂, o que proporciona uma menor taxa assimilatória líquida (SAVVIDES et al., 2012).

Alguns autores, ainda, abordam que o estresse hídrico e o térmico estão intimamente relacionados, pois acarreta um choque térmico em plantas, não havendo a perda de calor por evaporação, e conseqüentemente não diminuindo a temperatura foliar (OUKARROUM et al., 2009). Isso demonstra que a temperatura, também, pode ter contribuído para a baixa atividade bioquímica, em virtude da indisponibilidade do recurso hídrico, conseqüentemente afetando a termorregulação. Pois, isso contribui para que não ocorram mudanças bruscas de temperatura, e dessa forma não haja a desnaturação ou inativação das enzimas essenciais, como as envolvidas na fotossíntese.

Corroborando com isso, o fato de que a concentração interna de CO₂ ter-se mantido constante, sendo que ao final ainda apresentou um elevado incremento, demonstrando que não estava sendo parcialmente assimilado pelas reações bioquímicas da fotossíntese. Além disso, também poderia haver problemas relacionados à difusão desse gás, favorecendo assim a solubilidade do O₂, desencadeando uma limitação da atividade da enzima Rubisco na forma de carboxilação, aumentando a função como oxigenase. Dessa forma, provocando incremento ou aumento na fotorrespiração, gerando assim, desbalanço energético, com o aumento na respiração de manutenção, ou seja, maior necessidade de energia para manter a organização celular (ZISKA et al., 2010; SAGE et al., 2012). Isso, também, foi verificado por Martinazzo (2011) em plantas de pessegueiro submetidas ao déficit hídrico e alagamento, que a redução na atividade fotossintética estava associada com a diminuição da eficiência de carboxilação,

mesmo que as condições impostas pelos estresses não afetassem a concentração interna do gás carbônico.

Dessa forma, a falta de condutância no mesofilo pode ter gerado complicações em relação à difusão e solubilidade dos gases, o que limitou a taxa assimilatória líquida dos genótipos, e conforme Flexas et al., (2012) é um dos fatores que mais impõem limitação à atividade fotossintética, e que além disso, outros fatores também podem afetar a condutância no mesofilo, como características anatômicas (espessura da parede celular e distribuição dos cloroplastos).

Além disso, o tomate sendo uma planta C_3 , não há separação espacial entre a fixação do CO_2 e a redução do composto intermediário de três carbonos, como nas C_4 , induzindo elevada taxa fotorrespiratória, com alto desperdício de CO_2 , o que acarreta em perdas de carbono e energia (BLACKWEL et al., 1990; BAUWE et al., 2010), o que condiz com Massacci et al., (2008) que o aumento na fotorrespiração durante o início do déficit hídrico pode ser visto como um processo de aclimação para evitar a sobre-excitação do FSII, sob condições de seca, quando em situações mais severas. Isso foi verificado, principalmente no genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6e no selvagem, ao 3º dia, pois suas atividades fotoquímicas permaneciam praticamente inalteradas, proporcionando seus produtos finais, enquanto que as reações bioquímicas estavam em defasagem, quando comparadas ao primeiro dia. Isso, também, pode ser percebido pelos resultados da reflexão modulada a 820 nm, em especial para o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6. Visto que, os elétrons oriundos do FSII estavam chegando ao FSI e sendo reduzido, não apresentando variações e ou alterações na atividade do intersistema.

Algumas alterações detectadas para o genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 nas reações fotoquímicas, é que essas reações também são reguladas pelas reações bioquímicas, ou seja, não havia a necessidade de gerar tantos produtos, se as reações seguintes não estavam em plena eficiência (MISHRA et al., 2012; SAVVIDES et al., 2012; MURCHIE e LAWSON, 2013). Também, Oukarroum et al., (2009) relatam que menor geração de produtos da fase fotoquímica, sob condições de estresse hídrico, pode ser devido a uma reduzida atividade do Ciclo de Calvin-Benson, o que leva a um aumento na produção de superóxidos no lado receptor de elétrons do FSI, além de proporcionar incremento da atividade de drenos alternativos de elétrons, tais como reação de Mehler e o transporte cíclico de elétrons (MURCHIE e LAWSON, 2013).

Geralmente, o déficit hídrico produz efeito sobre o rendimento quântico máximo fotoquímico primário, ϕ_{P_0} (F_v/F_M) (TOURNEUX et al., 2003; OUKARROUM et al., 2007;

MISHRA et al., 2012; NONNEVEUX et al., 2013). No entanto no presente experimento, para todos os genótipos, esse parâmetro permaneceu inalterado, provavelmente pela pouca permanência dessas plantas em déficit hídrico. Assim, o déficit hídrico pode ser reversível desde que o ϕ_{P_0} permaneça de forma inalterada (OUKARROUM et al., 2007). O mesmo foi verificado por Mishra et al., (2012) em plantas de tomate, submetidas ao déficit hídrico, onde somente ao final do tratamento, ou seja, 14º dia, é que começaram a apresentar contrastes significativos em relação ao controle.

Oukarroum et al., (2007) relatam que em cultivares de cevada ocorrem alterações nesse parâmetro, ao final dos tratamentos com seca moderada (uma semana), grave (duas semanas) e na recuperação (uma semana após a re-irrigação). Oukarroum et al., (2009), com duas cultivares de cevada (tolerante e sensível), também descrevem que o estresse hídrico interfere no parâmetro F_v/F_M , somente sobre severas condições de seca, tendo pouco efeito sobre o FSII, e maiores problemas ao FSI. Notoriamente visível na fase I-P, o que reflete o detrimento da atividade do FSI. Contudo, esses autores ainda enfatizam que há vários relatos na literatura, em relação à ação desse estresse sobre o FSII.

Como as plantas do genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 em uma visão geral sobre a atividade fotoquímica, não apresentaram, sobretudo grandes elevações no que se refere ao ponto J, pois Oukarroum et al., (2009), e Xin et al., (2013), relatam que alterações no passo J são devido a limitações de doações de elétrons no lado doador de elétrons do FSII. Sendo assim, V_J não aumentou, então não havia acumulação de Q_A reduzida, isto é, os elétrons estavam sendo transferidos de maneira correta na cadeia de transporte de elétrons. Isso significa que para haver as reações de oxi-redução de Q_A , tanto no lado receptor como no lado doador de elétrons do FSII, esses estavam operacionando de modo regular, não havendo limitações e/ou inibições inclusive do lado doador de elétrons do FSII ligado ao complexo de evolução de oxigênio (CEO).

De RONDE et al., (2000; 2001) evidenciam inibição e/ou dissociação do CEO, e este não proporciona mais elétrons para o FSII, ocasionando acúmulo de Q_A^- e, portanto uma alteração na fase O-J, com aumento da fluorescência no ponto J. E como abordado anteriormente esse ponto é geralmente interpretado como evidência de acumulação da fração de Q_A reduzida (STRASSER et al., 1995; LAZÁR e ILÍK, 1997). Entretanto, essa inativação do CEO permite, segundo De Ronde et al., (2004) que um doador alternativo de elétrons, como a prolina doasse elétrons. Conseqüentemente, isso proporciona maior diminuição do ponto J nas plantas com superexpressão da MT-sHSP23.6, após dois dias de estresse, mantendo a regeneração do NADP+, ou seja, sugerindo que no primeiro dia de estresse as

plantas com superexpressão da MT-sHSP23.6 armazenam grande quantidade de prolina, no segundo dia começam a utilizar a prolina para fornecer elétrons. Isso, também, é importante no período de recuperação, pois Oukarroum et al., (2007), enfatizam que na recuperação por déficit hídrico, a dissociação do CEO ainda permanece, por mais tempo, sendo assim importante o papel de osmólitos como a prolina e glicina betaína, para proporcionar uma fonte extra de energia.

Devido a isso, pode-se sugerir que o genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 não demonstrou tantas perturbações na fase fotoquímica, devido a uma possível conexão da ação da prolina e, também, da superexpressão dessa proteína, pois analisando os resultados da fluorescência transiente, juntamente com os demais dados, realizados de modo simultâneo no último dia de análises (decaída de fluorescência e reflexão modulada a 820 nm), esses não alteraram muito, de modo que a decaída da fluorescência demonstrou um retorno mais rápido dos pares iônicos iniciais após a luz ser desligada, levando em conta que a $DF_{20\mu s}$ é a primeira medida de DF confiável, durante intervalos de escuro (GOLTSEV et al., 2005), ou seja, para esse genótipo, esse estresse não afetou de maneira significativa a formação da recombinação de cargas. Além disso, esse genótipo apresentou, dentre os genótipos analisados melhor interligação entre os dois fotossistemas, de modo que as atividades do FSI foram mantidas em elevado potencial.

Em relação ao genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 a grande produção de prolina, no tratamento com déficit hídrico, não contribuiu de forma significativa, pois desde o início das análises mostrou danos, principalmente ao FSII, na fase fotoquímica, o que reduziu tempo dependente, como pode ser notado pelos índices de performances (PI_{abs} e PI_{total}) na análise de fluorescência transiente. Isso provavelmente devido aos elétrons que não tivessem nem saído do FSII, tendo muitos Q_B reduzidos enquanto o FSII poderia estar em forma oxidada.

Isso pode ser observado pelos dados de reflexão modulada a 820 nm ao final, relacionados ao FSI, que não havia muita capacidade de oxidação do P_{700} , enfatizando que o problema iniciava no FSII, pois Oukarroum et al., (2007) relatam que o déficit hídrico pode induzir a perda das proteínas D1 e D2. Além de que neste genótipo com silenciamento da MT-sHSP23.6 também apresentou maior dissipação por calor no último dia, o que pode ser confirmada pelo parâmetro (DI_0/RC). Essa dissipação demonstra a perda de parte da energia absorvida pelo FSII (STRASSER et al., 2000) não sendo utilizada nas reações fotoquímicas.

Baseado no exposto, sugere-se que a ação sinérgica do elevado teor de prolina e a superexpressão dessa proteína, no genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6 pode ter

proporcionado benefícios em relação a esse estresse, nas reações fotoquímicas, com essas condições experimentais. O mesmo verificado por De Ronde et al., (2004), que também possuía genótipos com presença de proteínas HSPs.

Assim, analisando os três genótipos em questão, nessas condições experimentais, e em relação às avaliações dos parâmetros de fluorescência, postula-se que o silenciamento do gene da proteína sHSP23.6 pode ter intensificado, desde o início do experimento, os maiores danos ao aparato fotossintético. No entanto, o genótipo não transformado apenas demonstrou redução no PI_{abs} e no PI_{total} , somente ao final, ou seja, este começou a apresentar problemas somente no 5º dia, e o alto teor de prolina também para esse genótipo, pode ter contribuído para esses resultados. Strasser et al., (2010) salientam que, para haver reduções no parâmetro PI_{abs} é necessário mudanças de um, dois ou três parâmetros que denotam rápida redução da eficiência da reação redox na cadeia de transporte de elétrons, e que o PI_{total} essa redução não se deve só a perda da atividade do FSII, mas também de danos na estrutura e função do FSI.

Portanto, o déficit hídrico ao mesmo tempo em que altera ou ativa mecanismos importantes, rotas metabólicas, estimula a expressão gênica. Dentre essas, algumas proteínas de choque térmico também são expressas, sendo osmoticamente induzidas, que podem proteger proteínas ou recuperar a forma nativa de proteínas inativas por dessecação (TAKEDA e MATSUOKA, 2008).

No entanto no presente trabalho já havia a transformação das plantas de tomate com diferentes níveis da respectiva proteína HSP, de localização mitocondrial, e, juntamente com as demais proteínas dessa classe, que provavelmente, também, foram expressas, no genótipo com superexpressão da MT-sHSP23.6, podem ter contribuído para maior estabilidade nas reações fotoquímicas.

Além de que neste trabalho, a proteína sHSP23.6 é de localização mitocondrial, ressaltando ainda mais a importância de estudos voltados à interação dessas organelas, tendo em vista que ultimamente as pesquisas estão focadas no reaproveitamento do carbono fotorrespirado, ou seja, procurando inserir a Rubisco próximos aos locais de liberação desse CO_2 a fim de evitar a sua difusão, pois a maioria das culturas de interesse agrícola apresentam metabolismo C_3 , o que contribuiria para aumentar a atividade bioquímica.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os genótipos testados demonstraram comportamentos distintos em resposta ao déficit hídrico.

As plantas com superexpressão da MT-sHSP23.6 são capazes de tolerar mais ao déficit hídrico considerando os fotoquímicos da fotossíntese em detrimento dos processos de fixação do dióxido de carbono.

A atividade fotossintética das plantas com silenciamento da MT-sHSP pode ter sido afetada pela perda da função do gene, acarretando em maiores danos nas reações fotoquímicas, o que culminou em defasagem nas reações bioquímicas.

Desta forma, mais estudos são necessários para entender a função dessas proteínas e suas interações com déficit hídrico, a fim de possivelmente proporcionar uma direção para a melhoria das culturas, ainda mais que esse estresse é um dos fatores que mais afeta a produção das culturas no mundo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio das análises, é possível visualizar a performance do tomateiro Micro-Tom, e seus genótipos transformados, citados nesse trabalho, sob diferentes situações estressantes, bem como seus padrões de crescimento em condições normais.

Sendo assim, em algumas situações neste trabalho, não se evidenciou uma relação positiva e efetiva entre a tolerância a determinado estresse com o nível de expressão das sHSP23.6 mitocondrial.

Isso demonstra que uma transformação, em apenas um item na planta, não proporcionará sempre respostas positivas, frente a diferentes fatores estressantes que esta poderá enfrentar.

Assim, os conhecimentos oriundos deste trabalho podem contribuir significativamente para melhor compreensão da atividade dessa proteína, a sua influência no processo fotossintético, bem como seu comportamento em diferentes níveis. Estudos mais aprofundados são necessários com esses genótipos, a fim de compreender a influência dessa proteína nas reações de carboxilação. Estes conhecimentos poderão contribuir substancialmente para a biologia de plantas e, conseqüentemente, para a agricultura e nutrição humana, visto que o tomateiro pode ser usado em programas de melhoramento vegetal visando a obtenção de uma variedade tolerante em ambientes adversos ao seu cultivo.

REFERÊNCIAS

- ADAMS I. W.W., DEMMIG-ADAMS, B., Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment. In: PAPAGEORGIOU, G.C., GOVINDJEE (Eds.), **Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis**, Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Springer, Dordrecht, NL, p. 583–60, 2004.
- ADAMSKI, J. M.; PETERS, J. A.; DANIELOSZKIC, R.; BACARIN, M. A. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 2056–2062, 2011.
- AGATI, G.; TATTINI, M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. **New Phytologist Trust**, v.186, p. 786–793, 2010.
- AHUJA, I.; VOS, R.C.H.; BONES, A. M.; HALL, R. D. Plant molecular stress responses face climate change. **Trends in Plant Science**, v. 15, p.664-680, 2010.
- ALBUQUERQUE NETO, A.A.R.; PEIL, R.M.N. Produtividade biológica de genótipos de tomateiro em sistema hidropônico no outono/inverno. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 613-619, 2012.
- ALLEN, D.J.; MCKEE, I.F.; FARAGE, P.K.; BAKER, N.R. Analysis of limitations to CO₂ assimilation on exposure of leaves of two *Brassica napus* cultivars to UV-B. **Plant Cell Environment**, v.20, p. 633–640, 1997.
- ALMEIDA, V. S. **Sistema Viçosa: nova proposta para o cultivo do tomateiro**. 2012. 46f. Dissertação (Mestrado). – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- ALVARENGA, M.A.R. **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, 400p. 2004.
- AOKI, K.; YANO, K.; SUZUKI, A.; KAWAMURA, S. Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. **BioMedCentral-BMC Genomics**, v.11, p. 210, 2010.
- BALOGH, T.S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C.A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, p. 732-742, 2011.
- BARSAN, C.; SANCHEZ-BEL, P.; ROMBALDI, C.; EGEE, I.; ROSSIGNOL, M.; KUNTZ, M.; ZOUINE, M.; LATSCH, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J-C. Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 2413–2431, 2010.
- BASSEL G.W.; MULLEN R.T.; BEWLEY J.D. *Procera* is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. **Journal of Experimental Botany**, v.59, p.585–593, 2008.

BASSETTO, E.; AMORIM, L.; BENATO, E.A.; GONÇALVES, F.P.; LOURENÇO, S.A. Efeito da irradiação UV-C no controle da podridão parda (*Monilinia fructicola*) e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em pós-colheita de pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.393-399, 2007.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205–207, 1973.

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

BECKLES, D. Factors affecting the postharvest soluble solids and sugar content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 63, p. 129–140, 2012.

BEZERRA NETO, E.; NOGUEIRA, R. J. M. C. Estudo comparativo do crescimento de plantas de tomate e milho sob condições de salinidade. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v.42, p.471-475, 1999.

BLACKWELL, R. D.; MURRAY, A.J.S.; LEA, P. J. Photorespiratory Mutants of the Mitochondrial. Conversion of Glycine to Serine. **Plant Physiology**, v.94, p.1316-1322, 1990.

BOAMAH, P.O.; OWUSU-SEKYERE, L.K; SAM-AMOAH; ANDERSON, B. Effect of Irrigation Interval on Chlorophyll Fluorescence of Tomatoes under Sprinkler. **Asian Journal of Agricultural Research**, v.5, p.83-89, 2011.

BOLIGE, A.; KIYOTA, M.; GOTO, K. Circadian rhythms of resistance to UV-C and UV-B radiation in *Euglena* as related to escape from light and resistance to light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 81, p.43–54, 2005.

BOSTON, R.S.; VIITANEN, P.V.; VIERLING, E. Molecular chaperones and protein folding in plants. **Plant Molecular Biology**, v.32, p.191–222, 1996.

BROCCHIERI L, KARLIN S. Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution. **Protein Science**, v. 9, p.476–486, 2000.

BURGER, J.; EDWARDS, G.E. Photosynthetic Efficiency, and Photodamage by UV and Visible Radiation, in Red versus Green Leaf Coleus Varieties. **Plant Cell Physiology**, v.37, p. 395-399, 1996.

BÜRLING, K.; CEROVIC, Z. G.; CORNIC, G.; DUCRUET, J-M.; NOGA, G.; HUNSCHE, M. Fluorescence-based sensing of drought-induced stress in the vegetative phase of four contrasting wheat genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, v.89, p. 51–59, 2013.

BUSCH, F.A.; SAGE, T.L.; COUSINS, A.B.; SAGE, R.F. C3 plants enhance rates of photosynthesis by reassimilating photorespired and respired CO₂. **Plant, Cell and Environment**, v.36, p.200–212, 2013.

BYRDIN, M.; RIMKE, I.; SCHLODDER, E.; STEHLIK, D.; ROELOFS, T.A. Decay kinetics and quantum yields of fluorescence in photosystem I from *Synechococcus elongates* with P700 in the reduced and oxidized state: are the kinetics of excited state decay trap-limited or transfer-limited? **Biophysical Journal**, v.79, p.992–100, 2000.

CALIMAN, F. R. B. **Enriquecimento com CO₂ por meio decompostagem para a cultura do tomateiro em ambiente protegido**. 2008. 79f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

CARVALHO, R.F.; CAMPOS, M.L.; PERES, L.E.P. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, v.7, p.1-18, 2011.

CARVALHO, R.F.; QUECINI, V.; PERES L.E.P. Hormonal modulation of photomorphogenesis-controlled anthocyanin accumulation in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) hypocotyls: physiological and genetic studies. **Plant Science**, v.178, p.258-264, 2010.

CASSOL, D.; SILVA, F.S.P.; FALQUETO, A.R.; BACARIN, M. A. An evaluation of non-destructive methods to estimate total chlorophyll content. **Photosynthetica**, v. 46. p. 634-636, 2008.

CASTRO, P. R.; KLUGE, R. A.; SESTARI I. **Manual de Fisiologia vegetal: fisiologia de cultivos / São Paulo, Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2008.**

CHAVES, A.L.; ROMBALDI, C.V.; ARAUJO, P.J.; BALAGUÉ, C.; PECH, J-C.; AYUB, R.A. Ciclo de maturação e produção de etileno de tomates (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) transgênicos. **Food Science and Technology**, v.18, p.116-120, 1998.

CHETTY, V.J.; CEBALLOS, N.; GARCIA, D.; NARVÁEZ-VÁSQUESZ, J.; LOPEZ, W.; OROZCO-CÁRDENAS, M.L. Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. **Plant Cell Reports**, v. 32, p. 239-247, 2013.

CHIRINOS-TORRES, D.; CHIRINOS-TORRES, L.; MARÍN, M.; ROMÁN- URBINA, Z.; VIELMA-BAPTISTA, J.; CASTRO, C. Dinámica de acumulación de materia seca em la planta de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller), cv. Río Grande, em la zona noroccidental del estado Zulia, Venezuela. **Revista Facultad Agronomía Maracaibo**, v. 16, p. 141-151, 1999.

CHO, E. K.; HONG, C.B. Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, v.25, p. 349–358, 2006.

CHRISTEN, D.; SCHÖNMANN, S.; JERMINI, M.; STRASSER, R.J.; DÉFAGO, G. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 504-514, 2007.

CORNIC, G.; GHASHGHAIE, J.; GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M. Leaf photosynthesis is resistant to a mild drought stress. **Photosynthetica**, v.27, p.295-309, 1992.

COSTA, L.; VICENTE, A.R.; CIVELLO, P.M.; CHAVES, A.R. MARTÍNEZ, G.A. UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, p.204-210, 2006.

DALOSO, D.M.; HOLSBACK-MENEGUCCI, Z.R.; SANTIAGO, E.F. Efeitos da radiação ultravioleta-C sobre a simetria e morfoanatomia foliar *Rapanea ferruginea* (Ruiz et. Pav) Mez. (Myrsinaceae) **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v.31, p.165-172, 2009.

DANON, A.; GALLOIS, P. UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, v.437, p.131-136, 1998.

De RONDE, J. A.; CRESS, W. A.; KRÜGER, G. H. J.; STRASSER, R. J.; VAN STADEN, J. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing na *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1211–1224, 2004.

DE MENEZES SILVA, P.E.; SANTIAGO, E.F.; SILVA, E.M.; SÚAREZ, Y.R.; DALOSO, D.M. Fluorescência da clorofila-a e variação da simetria como ferramentas de investigação de plantas sob estresse. **Idesia**, v. 29, p. 45-52, 2011.

De RONDE, J.A.; CRESS, W.A.; Van der Mescht. A. agrobacterium-mediated transformation of soybean seed with the GUS-INT maker gene. **South African Journal Science**, v.97, p. 421-424, 2001.

De RONDE, J.A.; SPREETH, M.H.; CRESS, W.A. Effect of antisense L-D1-pyrroline-5-carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stress. **Plant Growth Regulation**, v.32, p. 32-13, 2000.

DESIKAN, R.; MACKERNESS S.A.H.; HANCOCK JT, NEILL S.J. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiology**. v. 127, p. 159-172, 2001.

DRIEVER, S. M.; KRORMDIJK, J. Will C₃ crops enhanced with the C₄ CO₂-concentrating mechanism live up to their full potential (yield)? **Journal of Experimental Botany**, v.64 p.3925-3935, 2013.

EDWARDS, D.; JOLLIFFE, P.; EHRET, D. Canopy profiles of starch and leaf mass per area in greenhouse tomato and the relationship with leaf area and fruit growth. **Scientia Horticulturae**, v.125, p. 637–647, 2010.

ENGEL, V.L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v.3, p. 39-45, 1991.

FARIAS, M. E. **Efeito de inibidores da cadeia de transporte de elétrons fotossintético em folhas destacadas de ervilha**. Universidade Federal de Pelotas. 2014.60f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FARINHA, T. B.; ZSÖGÖN, A.; PERES, L. E. P. Breeding the Tomato Micro-Tom Model System for Ornamental Value. **Acta Horticulturae**, v. 836, p. 215-220 2009.

FAYAD, J. A.; FONTES, P. C. R.; CARDOSO, A. A.; FINGER, L. F.; FERREIRA, F.A. Crescimento e produção do tomateiro cultivado sob condições de campo e de ambiente protegido. **Horticultura brasileira**, v. 19, p. 232-237, 2001.

FAYAD, J.A.; FONTES, P.C.R.; CARDOSO, A.A.; FINGER, F.L.; FERREIRA, F.A. Absorção de nutrientes pelo tomateiro cultivado sob condições de campo e de ambiente protegido. **Horticultura brasileira**, v. 20, p. 90-94, 2002.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 243-282, 1999.

FERNANDEZ, A.I.; VIRON, N.; ALHAGDOW, M.; KARIMI, M.; JONES, M.; AMSELLEM, Z.; SICARD, A.; CZEREDNIK, A.; ANGENENT, G.; GRIERSON, D.; MAY, S.; SEYMOUR, G.; ESHED, Y.; LEMAIRE-CHAMLEY, M.; ROTHAN, C.; HILSON, P. Flexible Tools for Gene Expression and Silencing in Tomato. **Plant Physiology**, v. 151, p. 1729-1740, 2009.

FERULLO, J-M.; NESPOULOUS, L.; TRIANTAPHYLIDES, C. Gamma-ray-induced changes in the synthesis of tomato pericarp protein. **Plant, Cell & Environment**, v.17, p.901-911, 1994.

FISCHER, I.; CAMUS-KULANDDAIVELU, L.; ALLA, F.; STEPHAN, W. Adaptation to drought in two wild tomato species: the evolution of the Asr gene family. **New Phytologist**, v. 190, p.1032–1044, 2011.

FLEXAS, J.; BARBOUR, M.M.; BRENDEL, O.; CABRERA, M.; CARRIQUÍ, M.; DIAZ-ESPEJO, A.; DOUTHE, C.; DREYER, E.; FERRIO, J. P.; GAGO, J.; GALLÉ, A.; GALMÉS, J.; KODAMA, N.; MEDRANO, H.; NIINEMETS, Ü.; PEGUERO-PINA, J.J.; POU, A.; RIBAS-CARBÓ, M.; TOMÁS, M.; TOSENS, T.; WARREN, C. Mesophyll diffusion conductance to CO₂: an unappreciated central player in photosynthesis. **Plant Science**, v.193, p. 70–84, 2012.

GAO JP, CHAO DY, LIN HX. Toward understanding molecular mechanisms of abiotic stress responses in rice. **Rice**, v. 1, p. 36-51, 2008.

GAO, J.; LI, P.; MA, F.; GOLTSEV, V. Photosynthetic performance during leaf expansion in *Malus micromalus* probed by chlorophyll a fluorescence and modulated 820nm reflection. **Journal Photochemistry Photobiology. B. Biology**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.12.005>, 2013.

GAO, Z.; SAGI, M.; LIPS, S.H. Carbohydrate metabolism in leaves and assimilate partitioning in fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) as affected by salinity. **Plant Science**, v. 135, p. 149-159, 1998.

GILBERT, M.; PÖRS, Y.; GROVER, K.; WEINGART, I.; SKOTNICA, J.; GRIMM, B.; SEIDLITZ, H. K.; LANGEBARTELS, C.; WILHELM, C. Intra and interspecific differences

of 10 barley and 10 tomato cultivars in response to short-time UV-B radiation: A study analysing thermoluminescence, fluorescence, gas-exchange and biochemical parameters. **Environmental Pollution**, v.157, p.1603–1612, 2009.

GILBERT, M.; SKOTNICA, J.; WEINGART, I.; WILHELM, C. Effects of UV irradiation on barley and tomato leaves: thermoluminescence as a method to screen the impact of UV radiation on crop plants. **Functional Plant Biology**, v.31, p. 825 – 845, 2004.

GOLTSEV V.; ZAHARIEVA I.; CHERNEV P.; KOUZMANOVA M.; KALAJI M.H.; YORDANOV I.; KRASTEVA V.; ALEXANDROV V.; STEFANOV D.; ALLAKVERDIEV S.; STRASSER R.J. Drought-induced modifications of photosynthetic electron transport in intact leaves: Analysis and use of neural networks as a tool for a rapid non-invasive estimation. **Biochim.Biophys.Acta – Bioenergetics**, v.1817, p. 1490-1498, 2012.

GOLTSEV, V.; CHERNEV, P.; ZAHARIEVA, I.; LAMBREV, P.; STRASSER. R.J. Kinetics of delayed chlorophyll a fluorescence registered in milliseconds time range. **Photosynthesis Research**, v.84, p. 209–215, 2005.

GOLTSEV, V.; ZAHARIEVA, I.; CHERNEV, P.; STRASSER, R.J. Delayed fluorescence in photosynthesis, **Photosynthesis Research**, v. 101, p.217–232, 2009.

GONZALEZ-AGUILAR, G.; WANG, C.Y.; BUTA, G.J. UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p.415-422, 2004.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; PERES, L.E.P.; AZEVEDO, R.A. The Isolation of Antioxidant Enzymes from Mature Tomato (cv. Micro-Tom) Plants. **Horscience**, v.43, p. 1608-1610, 2008.

GUIDI, L.; CALATAYUD, A. Non-invasive tools to estimate stress-induced changes in photosynthetic performance in plants inhabiting Mediterranean areas. **Environmental and Experimental Botany**, v.103, p.42-52, 2014.

GURLEY, W.B. HSP 101 a key component for the acquisition of thermotolerance in plants. **Plant Cell**. v.12, p. 457–460, 2000.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN STADEN. J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant, Cell and Environment**, v.21, p.535–553, 1998.

HAUPT-HERTING, S.; FOCK, H.P. Oxygen exchange in relation to carbon assimilation in water-stressed leaves during photosynthesis. **Annals of Botany**, v. 89, p. 851–859, 2002.

HE, J.; HUANG, L-K.; WHITECROSS, M.I. Chloroplast ultrastructure changes in *Pisum sativum* associated with supplementary ultraviolet (UV-B) radiation. **Plant Cell & Environment**, v.17, p.771-775, 1994.

HEUVELINK, E. Effect of fruit load on dry matter partitioning in tomato. **Sientia Horticulturae**, v. 69, p.51-59, 1997.

HOAGLAND, D.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station Circular**, 347p. 1950.

HONG, S.W.; VIERLING, E. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. **Proceedings of National Academy Sciences USA**, v.97, p. 4392-4397, 2000.

HU, W.; HU, G.; HAN, B. Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice. **Plant Science**, v.176, p. 583-590, 2009

HU, Z.; CHEN, L.; ZHANG, J.; LI, T.; TANG, J.; XU, N.; WANG, X. Structure, function, property, and role in neurologic diseases and other diseases of the sHsp22. **Journal of Neuroscience Research**, v.85, p. 2071–2079, 2007.

HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e Flavonas: Fontes Brasileiras e Fatores que Influenciam a Composição em Alimentos. **Alimentos e Nutrição – Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v.19, p. 97-108, 2008.

HUTHER, C. M., RAMM, A., ROMBALDI, C.V., BACARIN, M. A.: Physiological response to heat stress of tomato ‘Micro-Tom’ plants expressing high and low levels of mitochondrial sHSP23.6 protein. - **Plant Growth Regulation**. v.70, p. 175–185, 2013.

HUTHER, Cristina Moll. **Estresses abióticos em plantas transformadas e não transformadas de tomate ‘Micro-Tom’ com diferentes expressões da sHSP22 mitocondrial: Efeito do alagamento e de ciclos de alta e baixa temperatura**. 2011. 92f Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

IQBAL, N.; FAROOQ, S.; ARSHAD, R.; HAMEED, A. Differential accumulation of high and low molecular weight heat shock proteins in Basmati rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Genetic Resources Crop Evolution**, v.57, p. 65-70, 2010.

JACOBY, R.P.; LI, L.; HUANG, S.; PONG LEE, C.; MILLAR, A.H.; TAYLOR, N.L. Mitochondrial Composition, Function and Stress Response in Plants. **Journal of Integrative Plant Biology**. v. 54, p. 887-906, 2012.

JANSEN, M.A.K.; van DEN NOORT, R.E. Ultraviolet-B radiation induces complex alterations in stomatal behavior. **Physiologia Plantarum**, v.110, p.189–194, 2000.

KATIYAR-AGARWAL, S.; AGARWAL, M.; GROVER, A. Heat tolerant basmati rice engineered by overexpression of Hsp101 gene. **Plant Molecular Biology**, v.51, p. 677-686, 2003.

KATSUMATA, M.; KOIKE, T.; NISHIKAWA, M.; KAZUMURA, K.; TSUCHIYA, H. Rapid ecotoxicological bioassay using delayed fluorescence in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Water Research**, v. 40, p. 3393–3400, 2006.

KHUONG, T.T.H.; CRÉTÉ, P.; ROBAGLIA, C.; CAFFARRI, S. Optimisation of tomato Micro-tom regeneration and selection on glufosinate/Basta and dependency of gene silencing on transgene copy number. **Plant Cell Reports**, v.32, p.1441-54, 2013.

KIMURA, S.; SINHA, N. Tomato (*Solanum lycopersicum*): a Model Fruit-Bearing. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2008.

KIRCHHOFF, V. W. J. H.; ECHER, E.; LEME, N. P.; SILVA, A. A. A variação sazonal da radiação ultravioleta solar biologicamente ativa. **Brazilian Journal of Geophysics**, v. 18, p. 63-74, 2000.

KLEIN, F. R. S. **Alterações bioquímicas em espécies do gênero Alternanthera quando expostas a radiação UV-B e UV-C**. 2014. 86f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

KOCACINAR, F.; MCKOWN, A. D.; SAGE, T. L.; SAGE, R. F. Photosynthetic pathway influences xylem structure and function in *Flaveria* (Asteraceae). **Plant, Cell & Environment**, v.31, p.1363–1376, 2008.

KOLB, C.A.; KÄSER, M.A.; KOPECKY, J.; ZOTZ, G.; RIEDERER, M.; PFÜNDEL, E. E. Effects of Natural Intensities of Visible and Ultraviolet Radiation on Epidermal Ultraviolet Screening and Photosynthesis in Grape Leaves. **Plant Physiology**, v. 127, p.863-875, 2001.

KOVÁCS, E.; KERESZTES, A. Effect of δ and UV-B/C radiation on plant cell. **Micron**, v.33, p.199-210, 2002.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.313-349, 1991.

KRASTEVA, V.; ALEXANDROV, V; CHEPISHEVA, M.; DAMBOV, S.; STEFANOV, D.; YORDANOV, I.; GOLTSEV, V. Drought induced damages of photosynthesis in bean and plantain plants analyzed in vivo by chlorophyll a fluorescence. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v.19, p.39-44, 2013.

KULANDAIVELU, G.; NOORUDEEN, A. M. Comparative study of the action of UV-C and UV-B on photosynthetic electron transport. **Physiologia Plantarum**, v. 58, p. 389-394, 1983.

LANAHAN M.B.; YEN H.C.; GIOVANNONI J.J.; KLEE H.J. The *Never ripe* mutation blocks ethylene perception in tomato. **Plant Cell**, v. 6, p.521–530, 1994.

LARRÉ, C.F.; FERNANDO, J.A.; MARINI, P.; BACARIN, M.A.; PETERS. Growth and chlorophyll *a* fluorescence in *Erythrina crista-galli* L. plants under flooding conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.35, p.1463-1471, 2013.

LAZÁR, D.; ILÍK, P. High-temperature induced chlorophyll fluorescence changes in barley leaves: comparison of the critical temperatures determined from fluorescence induction and from fluorescence temperature curve. **Plant Science**, v. 124, p. 159–164, 1997.

LEE, B.; WON, S.; LEE, H.; MIYAO, M.; CHUNG, W.; KIM, I.; JO, J. Expression of the chloroplast-localized small heat shock protein by oxidative stress in rice. **Gene**, v. 245, p. 283-290, 2000.

LENNE C, BLOCK MA, GARIN J, DOUCE, R. Sequence and expression of the mRNA encoding HSP22, the mitochondrial small heat-shock protein in pea leaves. **The Biochemical Journal**, v.311, p.05-13, 1995.

LENNE, C.; DOUCE, R. A. Low Molecular Mass Heat-Shock Protein 1s Localized to Higher Plant Mitochondria. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1255-1261, 1994.

LI, Q.; XING, D. Study on the effect of DCMU on photosynthesis of plant by delayed fluorescence method. **Acta Laser Biology Sinica**, v.15, p. 232–235, 2006.

LIERE, K.; WEIHE, A.; BÖRNER, T. The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. **Journal of Plant Physiology**, v.168 p.1345–1360, 2011.

LIMA, J.E., CARVALHO, R.F., TULMANN NETO, A., FIGUEIRA, A., PERES, L.E.P.: Micro-Msk: a tomato genotype miniature size, short life cycle and improved in vitro shoot regeneration. **Plant Science**, v. 167, p.753-757, 2004.

LIN, CY.; ROBERTS, J. K.; KEY, J. L. Acquisition of thermotolerance in soybean seedling, synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. **Plant Physiology**, v.74, p.152-160, 1984.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. The heat shock proteins. **Annual Review Genetics**, v.22, p.631-677, 1988.

LIU, C-H.; CAI, L-Y.; LU, X-Y.; HAN, X-X.; YING, T-J. Effect of Postharvest UV-C Irradiation on Phenolic Compound Content and Antioxidant Activity of Tomato Fruit During Storage. **Journal of Integrative Agriculture**, v.11, p.159-165, 2012.

LIU, J., SHONO, M. Characterization of mitochondria-located small heat shock protein from tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant and Cell Physiology**, v. 40, p. 1297-1304, 1999.

LOPES, W. A. R. **Análise do crescimento de tomate ‘SM-16’ cultivado sob diferentes coberturas de solo**. 2010. 92f. Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Fitotecnia. Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA). Mossoró.

LU, X.; LIU, C.; YING, T. Influence of UV-C irradiation on antioxidant contents and antioxidant capacity of Korla fragrant pear (*Pyrus sinkiangensis* Yu). **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 11. p. 324-327, 2013.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia Vegetal**. 3°. Viçosa: UFV, 2009.

MARRON, N; DREYER, E; BOUDOURESQUE, E; DELAY,D; PETIT, J.M.; DELMOTTE, F.M.; BRIGNOLAS, F., Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus × Canadensis* (Moench) clones, ‘Dorskamp’ and ‘Luisa_Avanzo’. **Tree Physiology**, v.23, p.1225–1235, 2003.

MARTÍ, E.; GISBERT, C.; BISHOP G. J.; DIXONM. S.; GARCÍA-MARTÍNEZ J. L. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p. 2037-2047, 2006.

MARTINAZZO, E. G.; PERBONI, A. T.; OLIVEIRA, P. V. BIANCHI, V. J.; BACARIN, M. A. Atividade fotossintética em plantas de ameixeira submetidas ao déficit hídrico e ao alagamento. **Ciência Rural**, v.43, p. 35-41, 2013.

MARTINAZZO, Emanuela Garbin. **Atividade fotossintética em plantas do gênero Prunus**. 2011.-59f.- Tese (Doutorado). –Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

MARTINS, G.; VASCONCELLOS, E.F.C.; LUCCHESI, A. A. Correlações entre parâmetros da análise de crescimento de cultivares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, v. 42, 1985.

MASSACCI, A.; NABIEV, S.M.; PIETROSANTI, L.; NEMATOV, S.K.; CHERNIKOVA, T.N.; THOR, K.; LEIPNER, J. Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.46, p.189-195, 2008.

MATHEWS, H.; CLENDENNEN, S.K.; CALDWELL, C.G.; LIU, X.L.; CONNORS, K.; MATHEIS, N.; SCHUSTER, D.K.; MENASCO, D.J. WAGONER, W.; LIGHTNER, J.; WAGNER, D.R. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. **The Plant Biotechnology**, Tokyo, v.24, p. 39-44, 2003.

MATSUKURA, C.; AOKI, K.; FUKUDA, N.; MIZOGUCHI, T.; ASAMIZU, E.; SAITO, T.; SHIBATA, D.; EZURA, H. Comprehensive Resources for Tomato Functional Genomics Based on the Miniature Model Tomato Micro-Tom. **Current Genomics**, v. 9, p. 436-443, 2008.

MAUZERALL, D. Thermodynamics of primary photosynthesis. **Photosynthesis Research**, v. 116, p. 363–366, 2013.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **The Plant Journal**, v. 12, p. 1465–1472, 1997.

MELO, H. C.; et al., Características fisiológicas de microtomateiros (*Lycopersicon esculentum* P. Miller) fitocromo-mutantes. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p. 1213-1219, 2009.

MENG, X.C.; XING, T; WANG, X.J. The role of light in the regulation of anthocyanin accumulation in *Gerbera hybrida*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.44, p. 243–250, 2004.

MICHILS, A.; REDIVO, M.; BEYL, V. Z.; MAERTELAER, V.; JACOBOWITZ, D.; ROCMANS, P.; DUCHATEAU, J. Increased expression of high but not low molecular weight heat shock proteins in resectable lung carcinoma. **Lung Cancer**, v.33, p.59–67, 2001.

MILLAR, A.H.; WHELAN, J.; SOOLE, K.L.; DAY, D. A. Organization and Regulation of Mitochondrial Respiration in Plants. **Annual Review Plant Biology**, v.62, p. 79–104, 2011.

MISHRA, B.K.; IANNAcone, R.; PETROZZAB, A.; MISHRA, A.; ARMENTANO, N.; VECCHIA, G.L.; TRTÍLEKD, M.; CELLINI, F.; NEDBAL, L. Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. **Plant Science**, v. 182, p. 79-86, 2012.

MONNEVEUX, P.; RAMÍREZ, D.A.; PINO, M-T. Drought tolerance in potato (*S. tuberosum* L.) Can we learn from drought tolerance research in cereals? **Plant Science**, v.205–206, p.76–86, 2013.

MONTEIRO, C.C.; ROLÃO, M.B.; FRANCO, M.R.; PETERS, L.P.; CIA, M.C.; CAPALDI, F.R.; CARVALHO, R.F.; GRATÃO, P.L.; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; PERES, L.E.P.; AZEVEDO, R.A. Biochemical and histological characterization of tomato mutants. **Anais Academia Brasileira Ciências**,v.84, p. 573-585, 2012.

MUNEKAGE, Y.; SHINAKAI, T. Cyclic electron transport through photosystem I. **Plant Biotechnology**, v.22, p. 361–9, 2005.

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

MURCHIE, E.H.; CHEN, Y.Z.; HUBBART, S.; PENG S.B. HORTON P. Interactions between senescence and leaf orientation determine in situ patterns of photosynthesis and photoinhibition in field-grown rice. **Plant Physiology**, v. 119, p. 553-564, 1999.

NAUTIYAL, P. C.; SHONO, M.; EGAWA, Y. Enhanced thermotolerance of the vegetative part of MT-sHSP transgenic tomato line. **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 393-409, 2005.

NAUTIYAL, P.C.; SHONO, M. Analysis of the role of mitochondrial and endoplasmic reticulum localized small heat shock proteins in tomato. **Plant Biology**, v. 54, p. 715-719, 2010.

NEPOMUCENO, A.L.; OOSTERHUIS, D.; Stewart, J. McD.; TURLEY, R.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.B. Expression of heat shock protein and trehalose-6-phosphate synthase homologues induced during water deficit in cotton. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.14, p. 11-20, 2002.

NGAMHUI, N-O.; AKKASAENG, C.; ZHU, Y.J. TANTISUWICHWONG, N.; Roytrakul, S.; Sansayawichai, T. Differentially expressed proteins in sugarcane leaves in response to water deficit stress. **Plant Omics Journal** , v. 5, p. 365-371, 2012.

NICOLE, L. M.; TANGUAY, R.M. ON the Specificity of Antisense RNA to Arrest in vitro Translation of mRNA Coding for *Drosophila* hsp 23. **Bioscience Reports**, v. 7, 1987.

NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; LIMA, G. Use of UV-C light to reduce Botrytis storage rot of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.13, p.171-181, 1998.

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

OKABE, Y.; ASAMIZU, E.; ARIIZUMI, T.; SHIRASAWA, K.; TABATA, S.; EZURA, H. Availability of Micro-Tom mutant library combined with TILLING in molecular breeding of tomato fruit shelf-life. **Breeding Science**, v.62, p. 202 – 208, 2012.

OLIVEIRA, F. A.; MEDEIROS, J.F.;Oliveira, M.K.T.; SOUZA, A.A.T.; FERREIRA, J. A.; SOUZA, M.S. Interação entre salinidade e bioestimulante na cultura do feijão caupi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**,v.17, p.465–471, 2013.

OSBORNE, C.P. Evolution of physiological processes. **Experimental Botany**, v. 64, p. 4021- 4024, 2013.

OU, H.; GAO, N.; DENG, Y.; QIAO, J.; WANG, H. Immediate and long-term impacts of UV-C irradiation on photosynthetic capacity, survival and microcystin-LR release risk of *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 46, p.1241-1250, 2012.

OUKARROUM, A.; GOLTSEV, V.; STRASSER, R.J. Temperature Effects on Pea Plants Probed by Simultaneous Measurements of the Kinetics of Prompt Fluorescence, Delayed Fluorescence and Modulated 820 nm Reflection. **PLoS ONE** v. 8, e59433, 2013.

OUKARROUM, A.; MADIDI, S. E.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 438–446, 2007.

OUKARROUM, A.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R.J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. **Physiologia Plantarum**. v.137, p. 188–199, 2009.

PAPAGEORGIU, G.; GOVINDJEE. Light induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll *a* in vivo. I. *Anacystis nidulans*, **Biophysical Journal**, v. 8, p. 299 – 1315, 1968.

PAPAGEORGIU, G.; GOVINDJEE. Photosystem II fluorescence: Slow changes – Scaling from the past q. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104, p. 258–270, 2011.

PEGORARO, C.; MERTZ, L. M ; MAIA, L. C.; ROMBALDI, C. V.; OLIVEIRA, A. C. Importance of heat shock proteins in maize. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 14, p. 85-95, 2011.

PETERHANSEL C.; HORST, I; NIESSEN, M; BLUME,C.; KEBEISH, R.; KÜRKCÜOĞLU, S.; KREUZALER, F. Photorespiration. **The Arabidopsis Book** , v.8, e0130, 2010.

PINO, L. E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. P. The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato Micro-Tom model system. **Plant Methods**, v. 6, p. 1-11, 2010.

PINO-NUNES, L. **Obtenção e uso de mutantes, com alterações no balanço auxina/citocinina no estudo da competência organogênica em micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom)**. 2005. 86f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

PIOTTO, F.A. **Explorando a variação genética natural das espécies selvagens relacionadas ao tomateiro no modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom)**. 2007. 58f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

PIVETTA, C.R.; TAZZO, I. F.; MAASS, G.F.; STRECK, N.A.; HELDWEIN, A.B. Emissão e expansão foliar em três genótipos de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Ciência Rural**, v.37, p.1274-1280, 2007.

POORTER, H.; GAMIER, E. Plant growth analysis: an evaluation of experimental design and computational methods. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 1343-1351, 1996.

PRATT, H. K.; WORKMAN, M. Studies on the physiology of tomato fruits. III. The effects of ethylene on respiration and ripening behaviour of fruits stored at 20°C after harvest. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v. 81, p. 467-478, 1962.

PRECZEWSKI, P.J.; HECKATHORN, S.A.; DOWNS, C.A.; COLEMAN, J.S. Photosynthetic thermotolerance is quantitatively and positively correlated with production of specific heat-shock proteins. **Photosynthetica**, v. 38, p.127-134, 2000.

QUEITSCH, C.; HONG, S-W.; LINDQUIST, S. Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 12, p.479-492, 2000.

RAHAVI, S.M.R.; KOVALCHUK, I. Transgenerational changes in Arabidopsis thaliana in response to UV-C, heat and cold. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.2, p. 226–233, 2013.

RAHIMZADEH, P.; HOSSEINI, S.; DILMAGHANI, K. Effects of UV-A and UV-C radiation on some morphological physiological parameters in Savory (*Satureja hortensis* L.). **Scholars Research Library Annals of Biological Research**. v.2, p. 164-171, 2011.

RAI, R.; MEENA, R.P.; SMITA, S.S.; SHUKLA, A.; PANDEY-RAI. UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. – An antimalarial plant. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.105, p. 216–225, 2011.

RAMPINO, P.; MITAB, G.; PATALEOA, S.; PASCALIA, M.; FONZOC, N.; PERROTTA, C. Acquisition of thermotolerance and HSP gene expression in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars. **Environmental and Experimental Botany**, v.66, p. 257–264, 2009.

REIS, A. **Síntese de betalainas induzida pela luz em espécies do gênero Alternanthera**. 2013. 102f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas.

RIBAS, A. F.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Genetic transformation of coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.18, p. 83-94, 2006.

RICHARDS, F.J. The quantitative analysis of growth. In: STEWARD, F.C. (Ed.). **Plant Physiology**. New York: Academic Press, p. 3-76, 1969.

RIVERO, R.M.; KOJIMA, M.; GEPSTIN, A.; SAKAKIBARA, H.; MITTLER, R.; GEPSTEIN, S.; BLUMWALD, E. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNAD**, v. 104, p.19631-19636, 2007.

RUBAN, A.V.; JOHNSON, M. P.; DUFFY, C.D.P. The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1817, p.167–181, 2012.

SAGE, R.F.; SAGE, T.L.; KOCACINAR, F. Photorespiration and the Evolution of C₄ Photosynthesis. **The Annual Review of Plant Biology**, v.63, p.17-29, 2012.

SAGE, R.F.; Zhu, X-G. Exploiting the engine of C₄ photosynthesis. **Journal of Experimental Botany** v.62, p.2989–3000, 2011.

SAGE, T.L.; SAGE, R.F. The Functional Anatomy of Rice Leaves: Implications for Refixation of Photorespiratory CO₂ and Efforts to Engineer C₄ Photosynthesis into Rice. **Plant Cell Physiology**, v. 50, p. 756-772, 2009.

SAINT PIERRE, C.; CROSSA, J. L.; BONNETT, D.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; REYNOLDS, M. Phenotyping transgenic wheat for drought resistance. **Journal Experimental Botany**, v.63, p.1799-1808, 2012.

SAKAMOTO, A.; MURATA, N. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.163-171, 2002.

SANDOVAL-MONTIEL, A.A.; ZENTELLA-DE-PIÑA, M.; VENTURA-GALLEGOS, J.L.; FRÍAS-GONZÁLEZ, S.; LÓPEZ-MACAY, A. HSP-72 Accelerated Expression in Mononuclear Cells Induced *In Vivo* by Acetyl Salicylic Acid Can Be Reproduced *In Vitro* when Combined with H₂O₂. **PLoS ONE**, v. 8, e65449, 2013.

SANMIYA K.; SUZUKI K.; EGAWA Y.; SHONO M. Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants. **FEBS Letters**, v.557, p. 265–268, 2004.

SARKAR, N. K.; YEON, K. K.; GROVER, A. Rice sHsp genes: genomic organization and expression profiling under stress and development. **BioMedCentral-BMC Genomics**, v. 10, p. 393-410, 2009.

SAVVIDES, A.; FANOURLAKIS, D.; VAN IEPEREN, W. Co-ordination of hydraulic and stomatal conductances across light qualities in cucumber leaves. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.1135–1143, 2012.

SCARPECI, T. E.; ZANOR, M.I.; VALLE, E.M. Investigating the role of plant heat shock proteins during oxidative stress. **Plant Signaling & Behavior**, v.3, p. 856-857, 2008.

SCHWARZLÄNDER, M.; KÖNIG, A-C.; SWEETLOVE, L. J.; FINKEMEIER, I. The impact of impaired mitochondrial function on retrograde signalling: a meta-analysis of transcriptomic responses. **Journal Experimental Botany**. v. 63, p. 1735-1750, 2011.

SCOTT, J.W.; HARBAUGH, B. K. Micro-Tom – a miniature *dwarf* tomato. **Florida Agricultural Experiment Station Circular**. Gainesville, v.370, p. 1-6, 1989.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista Nutrição**, v.17, p. 227-236, 2004.

SIDDIQUE, M.; GERNHARD, S.; KOSKULL-DÖRING, P. V.; VIERLING, E.;SCHARF, K. The plant sHSP superfamily: five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties.**Cell Stress Chaperones**, v.13, p. 183–197, 2008.

SORTINO, O.; DIPASQUALE, M.; MONTONERI, E.; TOMASSO, L.; PERRONE, D.; VINDROLA, D.; NEGRE, M.; PICCONE, G. Refuse derived bio-organics enhancing tomato plant growth and productivity. **Waste Management**, v.32, p. 1792-1801, 2012.

STERCK,F.J.; ZWEIFEL, R.; SASS-KLAASSEN, U.; CHOWDHURY, Q., Persisting soil drought reduces leaf specific conductivity in Scots pine (*Pinus sylvestris*) and pubescent oak (*Quercus pubescens*). **Tree Physiology**, v.28, p.529–536, 2008.

STRASSER, R. J.; STIRBET, A. D. Estimation of the energetic connectivity of PS II centres in plants using the fluorescence rise O–J–I–P; fitting of experimental data to three different PS II models, **Mathematics and Computers in Simulation**, v. 56, p. 451– 461, 2001.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Activity and heterogeneity of FSII probed in vivo by the chlorophyll a fluorescence rise O–(K)–J–I–P. In: GARAB, G. (Ed.), **Photosynthesis: Mechanisms and Effects**, Proceedings of the XIth International Congress on Photosynthesis, Budapest, Hungary. Kluwer Academic Publishers, v. 05, p. 4321–4324, 1998.

STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental question: The JIP test. In: MATHIS, P. (Ed.), **Photosynthesis: From Light to Biosphere**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, v. V, p. 977–980, 1995.

STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; GOVINDJEE. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v. 61, p. 32-42, 1995.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; QIANG, S.; GOLTSEV, V. Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during

drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p.1313-1326, 2010.

STRASSER, R. J; STIRBET, A. D., Heterogeneity of Photosystem II probed by the numerically simulated chlorophyll a fluorescence rise (O-J-I-P). **Mathematics and Computers in Simulation**, v. 48, p. 3-9, 1998.

STRASSER, R.J.; GOVINDJEE. The F_0 and the O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae. In: ARGYROUDI-AKOYUNOGLU, J.H. (Ed.), **Regulation of Chloroplast Biogenesis**. New York: Plenum Press, p. 423-426, 1992.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: YUNUS, M.; PATHRE, U.; MOHANTY, P. (Eds.), **Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation**. London: Taylor and Francis Press, p. 445–483, 2000.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the Chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou, C., Govindjee, (Eds.), **Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis**. Dordrecht: Springer - Verlag, p. 321–362, 2004.

SÜLE A, VANROBAEYS F, HAJÓS G, van BEEUMEN J, DEVREESE B. Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots. **Phytochemistry**, v.65, p.1853-1863, 2004.

SUN, H-J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A Highly Efficient Transformation Protocol for Micro-Tom, a Model Cultivar for Tomato Functional Genomics. **Plant Cell Physiology**, v. 47, p. 426-431, 2006.

SUNG DY, KAPLAN F, LEE KJ, GUY CL. Acquired tolerance to temperature extremes. **Trends in Plant Science**, v.8, p. 179-187, 2003.

TAKAHASTTI, S.; BAUWE, H.; BRADGER, M. Impairment of the Photorespiratory Pathway Accelerates Photoinhibition of Photosystem II by Suppression of Repair But Not Acceleration of Damage Processes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.144, p. 487-494, 2007.

TAKEDA, S.; MATSUOKA, M. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. **Nature Reviews Genetics** v.9, p. 444-457, 2008.

TERAO, A.; STEININGER, T.L.; KYDER, K.; APTE-DESHPANDE, A.; DING, J.; RISHIPATHAK, D.; DAVIS, R.W.; HELLER, H. C.; KILDUFF, T. S. Differential increase in the expression of heat shock protein family members during sleep deprivation and during sleep. **Neuroscience** v.116, p. 187–200, 2003.

TEVINI, M.; TERAMURA, A. H. UV-B effects on terrestrial plants. **Photochemistry and Photobiology**, v. 50, p. 479-487, 1989.

THILAKARATHNE C.L.;TAUSZ-POSCH S.;CANE K.; NORTON R.M.; TAUSZ M.;SENEWEERA, S. Intraspecific variation

in growth and yield response to elevated CO₂ in wheat depends on the differences of leaf mass per unit area. **Functional Plant Biology**, v. 40, p.185–194, 2013.

THWE, A.A.; VERCAMBRE, G.; GAUTIER, H.; PAGÈS, L.; JOURDAN, C.; GAY, F.; KASEMSAP, P. Dynamic shoot and root growth at different developmental stages of tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under acute ozone stress. **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 317–325, 2013.

TIECHER, A.; DE PAULA, L.A.; CHAVES, F.C.; ROMBALDI, C.V. UV-C effect on ethylene, polyamines and the regulation of tomato fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 86, p. 230-239, 2013.

TIECHER, A.; PEGORARO, C.; FRANCO, J.J.; BORGES, C.T.; ROMBALDI, C.V.; MANICA-BERTO, R.; AZAMBUJA, R. H. M. Efeito da radiação ultravioleta-C no controle de *Monilinia fructicola*. **Brazilian Journal of Food Technology**. III SSA, novembro 2010a.

TIECHER, Aline. **Efeito da radiação UV-C na expressão gênica e nas respostas bioquímico-fisiológicas em frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.)**. 2010b. 62f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

TIMPERIO, A. M.; EGIDIA, M. G.; ZOLLA, L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). **Journal of Proteomics**, v. 71, p. 391-41, 2008.

TOURNEUX, C.; DEVAUX, A.; CAMACHO, M.R.; MAMANI, P.; LEDENT, J.F. Effects of water shortage on six potato genotypes in the highlands of Bolivia (II): water relations, physiological parameters. **Agronomie**, v.23, p. 180–190, 2003.

TSIMILLI-MICHAEL M, STRASSER RJ. In Vivo Assessment of Stress Impact on Plants' Vitality: Applications in Detecting and Evaluating the Beneficial Role of Mycorrhization on Host Plants. In: Varma A (ed) **Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology**, Eco-Function, Biotechnology, EcoPhysiology, Structure and Systematics, 3rd edition (ISBN: 978-3-540-78824-9), Springer, p. 679-703, 2008.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R.J. The energy flux theory 35 years later: formulations and applications. **Photosynthesis Research**, v. 117, p. 289-320, 2013.

URCHEI, M. A.; RODRIGUES, J. D.; STONE, L. F. Análise de crescimento de duas cultivares de feijoeiro sob irrigação, em plantio direto e preparo convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 497-506, 2000.

van AKEN, O. V.; ZHANG, B. ; CARRI, C.; UGGALLA, V.; PAYNTER, E.; GIRAUD, E.; WHELA, J. Defining the Mitochondrial Stress Response in *Arabidopsis thaliana*. **Oxford Journals Life Sciences Ciências da Vida Molecular Plant Plant Molecular**, v. 2, p. 1310-1324, 2009.

VASS, I. Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus. In:Pessarakli, M. (Ed.), **Handbook of Photosynthesis**, Marcel Dekker, New York, p. 931–949, 1997.

VIERLING, E. The role of heat shock proteins in plants. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 579-620, 1991.

VIDAL, W.N.; VIDAL, M.R.R. **Botânica – organografia**: Quadro sinóticos ilustrados de Fanerógamas. Viçosa: Editora UFV, 2003.

VOGAN, P. J.; SAGE, R.F. Water-use efficiency and nitrogen-use efficiency of C₃-C₄ intermediate species of *Flaveria* Juss. (Asteraceae). **Plant, cell & Environment**, v.34, p.1415-1430, 2011.

VOGG, G.; FISCHER, S.; LEIDE, J.; EMMANUEL, E.; JETTER, R.; LEVY, A.A.; RIEDERER, M. Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-CoA synthase. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1401-1410, 2004.

WAHID, A.; GELANI S.; ASHRAF M.; FOOLAD M.R. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p. 199-223, 2007.

WALTERS, R.G. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p. 435–447, 2005.

WANG, H.; JONES, B.; LI, Z.; FRASSE, P.; DELALANDE, C.; REGAD, F.; CHAABOUNI, S.; LATCHE, A.; PECH, J.C.; BOUZAYEN, M. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. **The Plant Cell**, v.17, p. 2676-2692, 2005.

WANG, P.; SUN, X.; LI, C.; WEI, Z.; LIANG, D.; MA, F. Long-term exogenous application of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple. **Journal of Pineal Research**, v. 54, p.292-302, 2013.

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.

WARREN, J.M.; NORBY, R. J.; WULLSCHLEGER, S.D.; OREN, R. Elevated CO₂ enhances leaf senescence during extreme drought in a temperate forest. **Tree Physiology**, v.31, p.117-130, 2011.

WATANABE, C.; MIZOGUCHI, T.; AOKI, K.; KUBO, Y.; MORI, H.; IMANISHI, S.; YAMAZAKI, Y.; SHIBATA, D.; EZURA, H. Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutante screens. **Plan Biotechnology Journal**, v. 24, p. 33-38, 2007.

WATERS, E.R.; VIERLING, E. The diversification of plant cytosolic small heat shock proteins preceded the divergence of mosses. **Molecular Biology & Evolution**. v.16, p.127-139, 1999.

WATERS, E.R. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. **Journal Experimental Botany**, v.64, p. 391-403, 2013.

WHALLEY, W.R.; OBER, E.S.; JENKINS, M. Measurement of the matric potential of soil water in the rhizosphere. **Journal Experimental Botany**, v. 64, p. 3951-3963, 2013.

WILKINSON J.Q.; LANAHAN M.B.; YEN H.C.; GIOVANNONI J.J.; KLEE H.J. An ethylene-inducible component of signal-transduction encoded by *Never-ripe*. **Science**, v. 270, p.1807–1809, 1995.

WILLETT D.A; BASHA E.; VIERLING E. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a mitochondrion-localized small HSP from *Arabidopsis thaliana*: *AtHsp23.6* (PGR 96–117). **Plant Physiology**, v. 112, p.1399, 1996.

WINGLER, A.; LEA, P.J.; QUICK, W.P.; LEEGOOD, R.C. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Philosophical Transactions of the Royal Society Lond B Biological Sciences**, v.355, p.1517–1529, 2000.

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p.218-223, 2002.

XIN, C-P.; YANG, J.; ZHU,X-G. A model of chlorophyll a fluorescence induction kinetics with explicit description of structural constraints of individual photosystem II units. **Photosynthesis Research**, v. 117, p. 339-354, 2013.

XUE,G-P.; SADAT, S.; DRENTH, J.; MCLNTYRE, C.L. The heat shock factor family from *Triticum aestivum* in response to heat and other major abiotic stresses and their role in regulation of heat shock protein genes. **Journal of Experimental Botany**, v.65, p. 539–557, 2014.

YUAN, J-X.; XIAO L-J.; LU, C-L.; ZHANG, X-S.; LIU, T.; CHEN, M.; HU, Z.Y.; GAO, F.; LIU, Y-X. Increased expression of heat shock protein 105 in rat uterus of early pregnancy and its significance in embryo implantation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p.1-23, 2009.

YUSUF, M.A.; KUMAR, D.; RAJWANSI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N.B. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1797, p.1428-1438, 2010.

ZAHARIEVA, I.; TANEVA, S.G.; GOLTSEV, V. Effect of PSII antennae size on the induction kinetics of prompt and delayed chlorophyll fluorescence. **Bulgarian Journal Plant Physiology**, v.25, p.17–30, 1999.

ZISKA, L. H.;TOMECEK, M.B. ; GEALY, D.R. Competitive interactions between cultivated and red rice as a function of recent and projected increases in atmospheric carbon dioxide. **Agronomy Journal**, v.102, p.118-123, 2010.