

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



Dissertação

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

Cristina Moll Huther

Pelotas, 2011

Cristina Moll Huther

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

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Bacarin

Co-orientador: Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi

Pelotas, 2011

Catálogo na publicação:
Maria Fernanda Monte Borges
CRB10/1011

H979e 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 / Cristina Moll
Huther ; orientador : Marcos Antonio Bacarin ; co-orientador : Cesar Valmor
Rombaldi. - Pelotas, 2011.
92 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas.

1. Proteína. 2. HSP. 3. Teste JIP. 4. Fotossíntese. 5. Estresse. I. Bacarin,
Marcos Antonio, orient. II. Rombaldi, Cesar Valmor, co-orient. III. Título.

CDD 581.1

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Antonio Bacarin

Prof^a. Dr^a. Ilisandra Zanandrea

Prof. Dr. Leonardo Nora

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meus caminhos e permitir que este sonho se tornasse realidade.

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

Ao professor Marcos Antonio Bacarin, pela orientação, ensinamentos, dedicação, confiança, incentivo, paciência e principalmente pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao professor César Valmor Rombaldi, pela co-orientação e instruções esclarecedoras.

Às professoras Rozangela Catarina Chaves Borges e Lurdes Zanchetta da Rosa, pelo carinho, ensinamentos, e incentivo durante todo o período da graduação, o que me fez seguir em busca de novos caminhos.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (PPGFV), pelo convívio e amizade, em especial a Emanuela Martinazzo, Anelise Perboni, Camila Souza, Anderson Schock, Dominique Delias e Lucia Gütschow.

Aos estagiários e bolsistas de iniciação científica, Aline Ramm, Pablo Valadão, Márcio Farias e Henrique Chiarelo pelo auxílio na condução dos experimentos e pela amizade.

Aos professores e funcionários do PPGFV, pelos ensinamentos e apoio recebido.

A todos os meus amigos que sempre estiveram me incentivando, em especial a Daniela De Conti, Letícia Rickes e Gérson de Medeiros, pelo carinho e momentos de descontração.

Aos meus pais Zeno (*in memoriam*) e Ada, pelo carinho, amor, dedicação, apoio, conselhos e acima de tudo pelo exemplo de vida e incentivo durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos André e Ricardo, pelo companheirismo, amizade, e pelas palavras de apoio.

Ao meu namorado Tiago, pelo carinho, compreensão, companhia e dedicação durante a realização deste trabalho.

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

*"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)

RESUMO

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.

Os estresses abióticos geralmente causam disfunções metabólicas que provocam diminuição no crescimento das plantas. Em respostas a estresses pode ocorrer o aumento na síntese de algumas proteínas chamadas proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSPs). O tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Micro-Tom é considerado como um modelo para estudos experimentais, pois ele possui características que o tornam adequado, tais como o tamanho pequeno, tempo de geração curto, e facilidade de transformação. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos estresses por alagamento e por altas e baixas temperatura em plantas transformadas e não transformadas de tomate 'Micro-Tom' com diferentes expressões da sHSP22 mitocondrial (MT-sHSP22). O primeiro experimento foi conduzido em câmaras de crescimento, sob condições controladas. Quando as plantas apresentavam 50 dias foram submetidas a estresse por alagamento por um período de 14 dias, sendo que após 7 dias metade das plantas foram retiradas do alagamento. No segundo ensaio, as plantas foram cultivadas como no primeiro experimento, e quando se apresentavam em estágio vegetativo pleno foram submetidas a estresse térmico por período de 24h a 10°C ou 37°C, a seguir as plantas foram transferidas para as condições iniciais por 24h, após este período foram novamente submetidas a um novo ciclo de estresse e recuperação. Em ambos os experimentos foram avaliados os parâmetros da cinética de emissão da fluorescência da clorofila e trocas gasosas, sendo que no primeiro avaliou-se também o índice de clorofila, e ao final do ensaio a área foliar e massa seca da parte aérea e raiz. O alagamento interferiu nos teores de clorofila de todos os genótipos, sendo que no genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, não foi observada redução da área foliar e em relação a massa seca total. A análise da cinética da fluorescência transiente da clorofila a mostrou efeitos diferenciais do estresse por alagamento nos diferentes locais da maquinaria fotossintética, e apresentou variação de resposta entre os genótipos. Quando as plantas foram submetidas ao estresse por baixa temperatura, observou-se redução na taxa assimilatória líquida de CO₂ imediatamente após o estresse, mas depois da recuperação todos os genótipos retornaram próximos aos controles. Para as plantas submetidas a altas temperaturas do genótipo selvagem e do com elevada expressão da MT-sHSP22 aumentaram a taxa assimilatória líquida em relação ao controle. Os dados de fluorescência das clorofilas indicaram efeitos diferentes na absorção e aproveitamento da energia luminosa entre os genótipos para os dois estresses de temperatura. A interpretação dos parâmetros do Teste JIP possibilitou identificar que os três genótipos apresentam comportamento distinto principalmente sobre estresse de alta temperatura, sendo que as plantas dos genótipos com alta expressão de sHSP22 e não transformado apresentaram elevação nos parâmetros relacionados a atividade

do fotossistema I. Estes resultados sugerem que as plantas com elevada expressão das sHSP22 mitocondrial podem apresentar mecanismos de tolerância frente as estresses aplicados.

Palavras-chave: Proteína, HSP, Teste JIP, fotossíntese, estresses.

ABSTRACT

HUTHER, Cristina Moll. **Abiotic stress in plants transformed and untransformed 'Micro-Tom' tomato with different expressions of mitochondrial sHSP22: effect of flooding and the high and low temperature cycles.** 2011. 92f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The abiotic stress often cause metabolic disorders which cause a decrease in plant growth. In response to stress, an increase in the synthesis of certain proteins called "heat shock proteins" (HSPs), might occur. The tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. Micro-Tom is regarded as a model for experimental studies, and that is because it has features that make it appropriate, such as small size, short development time and easy modification. This study aimed to evaluate the stress effects by flooding and by high and low temperatures in both modified and not modified 'Micro-Tom' tomato plants which have different mitochondrial expressions (MT- sHSP22). The first experiment was conducted in growth chambers under controlled conditions. When the plants were 50 days, they were submitted to stress by flooding during 14 days, and after 7 days, half the plants were removed from the flooding. In the second trial, plants were grown as in the first experiment, and when they presented themselves in a complete vegetative stage, they were submitted to thermal stress for a period of 24 hours of 10 °C or 37 °C, soon after that, the plants were transferred to the initial conditions for 24 hours. After this phase they were again subjected to a new cycle of stress and recovery. On both experiments were evaluated parameters of the kinetic emission of chlorophyll fluorescence and of gas exchange, taking into account that in the first was also evaluated the content of chlorophyll, and, at the end of the test, the leaf area and the dry mass of the upper area and root. The flooding interfered on the the chlorophyll content of all genotypes, and on the genotype with a high expression of MT-sHSP22, a decrease in the leaf area was not identified and neither was in the total dry mass. The kinetics analysis of the transient fluorescence of chlorophyll showed differential effects of stress by flooding in the different parts of the photosynthetic machinery, and showed different responses between genotypes. When plants were submitted to stress by low temperature, a reduction in the liquid CO₂ rate was noticed immediately after the stress, but, after recovery, all genotypes returned close to the controls. For plants submitted to high temperatures of the wild genotype and with high expression of MT-sHSP22 increased the liquid assimilation rate in comparison to control. The chlorophyll fluorescence data indicated different effects on absorption and utilization of light energy between the two genotypes for two of the temperature stress. The interpretation of the JIP test parameters helped to identify that three genotypes exhibit different behavior, mainly on high-temperature stress, and the plants of high expression genotypes of HSP22 and not transformed showed an increase in the parameters related to the photosystem I activity. These results suggest that plants with high doses of mitochondrial sHSP22 may present mechanisms of tolerance against the applied stress.

Keywords: protein, HSP, JIP-test, photosynthesis, stress.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	09
 CAPÍTULO 1 - Estresse abiótico em plantas transformadas e não transformadas de tomate ‘Micro-Tom’ com diferentes expressões da sHSP22 mitocondrial: 1. efeito do alagamento	14
1. Introdução.....	15
2. Material e Métodos	19
3. Resultados.....	24
4. Discussão	41
5. Conclusões.....	47
 CAPÍTULO 2 - Estresse abiótico em plantas transformadas e não transformadas de tomate ‘Micro-Tom’ com diferentes expressão da sHSP22 mitocondrial: 2. Efeito de ciclos de alta e baixa temperatura	49
1. Introdução	50
2. Material e Métodos.....	54
3. Resultados.....	56
4. Discussão.....	73
5. Conclusões.....	81
 REFERÊNCIAS	82
 ANEXOS	92

INTRODUÇÃO

O tomateiro pertence à Família Solanaceae sendo uma hortaliça originária da Cordilheira dos Andes, onde são encontradas várias espécies selvagens, podendo ser de crescimento determinado (variedades anãs) ou indeterminado, que atinge 2,5 m de altura (CAMARGO-FILHO et al. 1994).

A cultivar em miniatura, Micro-Tom (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) foi proposta por Meissner et al. (1997) como um modelo genético, que produz frutos de pequeno porte e sementes viáveis, tendo sido desenvolvida através do cruzamento entre os tomateiros (*Solanum lycopersicum* L. Syn. *Lycopersicum esculentum* Mill.), cultivares Florida Basket e Ohio 4013-3 (FARINHA et al, 2009), para jardinagem doméstica. Difere das cultivares normais de tomate, essencialmente por dois genes recessivos (MEISSNER et al. 1997), sendo seu fenótipo determinante por uma mutação no gene *SP* (FARINHA et al 2009; MARTÍ et al., 2006). Desde o seu desenvolvimento, a cultivar Micro-Tom tem sido utilizada para a mutagênese em grande escala e a introgressão da variação alélica já conhecida em outras cultivares de tomate e outras espécies selvagens.

O tomateiro Micro-Tom é considerado como um modelo de planta da família Solanaceae, pois possui características que o tornam adequado para o estudo experimental, tais como: o tamanho pequeno, cerca de 15 cm de altura, permite o cultivo denso (MEISSNER et al. 1997), o tempo de geração curto, e facilidade de transformação. Esta cultivar é utilizada para a construção de bibliotecas de cDNA completo (AOKI et al, 2010), o que permite estudos de bioengenharia molecular. O pequeno tamanho da Micro-Tom permite experiências em ambientes confinados e em ambientes controlados que cumprem as normas de segurança para os Organismos Geneticamente Modificados (OGM) (WATANABE, et al. 2007). Desta forma, as plantas do tomateiro Micro-Tom estão sendo usadas para pesquisa de

desenvolvimento dos frutos carnosos, formação de micorrizas e a tolerância ao estresse (FARINHA, et al 2009).

Nogueira e Silva Jr. (2001) destacam que variáveis ecofisiológicas exercem grande influência, não somente no comportamento vegetativo das plantas cultivadas, mas sobretudo no seu desempenho em relação às características produtivas.

Plantas, como organismos sésseis, dependem de plasticidade proteômica para remodelar-se durante os períodos de mudança do desenvolvimento, para suportar diversas condições ambientais, e para responder aos estresses bióticos e abióticos. Estes últimos são a principal causa de perda de safra em todo o mundo, reduzindo o rendimento médio para a maioria das plantas cultivadas por mais de 50%. Alguns estresses abióticos, como a seca, salinidade, temperaturas extremas, toxicidade química e o estresse oxidativo são sérias ameaças para a agricultura e podem resultar na deterioração do meio ambiente (TIMPERIO et al, 2008).

Tsimilli-Michael e Strasser (2008) descrevem que qualquer mudança ambiental é um estressor, no sentido que ele perturba as estratégias de otimização e leva o sistema a subotimização, pois o mesmo sofre mudanças de estado, ou seja, mudanças estruturais/conformacionais, em busca de um novo estado ideal. Sendo que Giraud et al. (2008) definem estresse como qualquer condição que impacta negativamente sobre o crescimento e a reprodução de uma planta.

A exposição dos organismos a qualquer estresse ativa um subconjunto de genes que codificam proteínas conservadas, conhecido como proteínas de choque térmico (HSP - *heat shock proteins*), dando início assim a vários esforços na tentativa de enfrentar o estresse.

Embora o papel das HSP na tolerância ao estresse seja muito importante, sendo fundamentais nos processos de proteção membranária, síntese e reparo de proteínas, contribuindo assim para a homeostase celular, existem outros estudos que sugerem que estas proteínas podem ter outras funções ainda desconhecidas. (MORROW, 2000).

As HSPs funcionam como chaperonas moleculares, ou seja, proteínas que interagem com outras proteínas minimizando a probabilidade de interagir de forma inadequada com outras proteínas. As HSPs reconhecem e ligam-se a outras proteínas quando não estão em conformações-nativas, ou seja, por desnaturação de proteínas de estresse ou porque os peptídeos que incluem ainda não foram

totalmente sintetizados, dobrados, montados, ou localizados em um compartimento celular apropriado (FEDER e HOFMANN 1999).

Estas proteínas são geralmente divididas em famílias com base na massa molecular e homologia de sequência (MORROW, 2000; FEDER e HOFMANN, 1999). As sHSP ou smHSP (*small heat shock proteins* – de 16 a 30-kD) compreendem um grupo de proteínas diverso e menos conservado que varia desde as sequências até o seu número dentro das espécies (MORROW, 2000).

Em plantas superiores, seis famílias de genes nucleares para sHSP foram identificados. Cada família de gene codifica proteínas que são encontradas em compartimentos celulares distintos, como citosol, cloroplasto, retículo endoplasmático e mitocôndria. Em geral, as sHSP não são encontradas em tecidos vegetativo normais, mas acumulam-se em altos níveis em resposta ao estresse térmico. Sob estresse de calor, a síntese de algumas de proteínas é reprimida, e as HSP começam a ser sintetizadas. O acúmulo das sHSP mitocondriais (MT-sHSP - *mitochondrial small heat shock proteins*) sob estresse térmico foi recentemente relatado em várias espécies de plantas, mas pouco se sabe sobre as funções celulares do MT-sHSP na tolerância ao calor pelas plantas. Liu (1999) descreve a elevação das MT-sHSP (23,8 kDa) em resposta ao choque térmico em plantas do tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill), sendo o precursor desta proteína com um peso molecular calculado de 23,8 kDa e que foi previsto para atingir mitocôndrias, conforme destaca Shono (2001) a avaliação da transcrição do gene da MT-sHSP em temperaturas variadas, bem como o ensaio da atividade destas proteínas *in vitro*, vem sendo analisada, sendo assim, plantas de tomate cv. Micro-Tom também foram transformadas para diferentes níveis de HSPs mitocondrial (sHSP22).

Como a mitocôndria é um alvo importante e regulador de respostas ao estresse, é evidente que uma variedade de genes nucleares que codifica proteínas mitocondriais respondam a uma ampla gama de condições de estresses. Relativamente pouco é conhecido no âmbito geral da resposta ao estresse mitocondrial, ou seja, quais genes que codificam as proteínas mitocondriais são parte de um amplo esforço de resposta em rede, e qual sua função específica na manutenção da função mitocondrial e celular durante o estresse (AKEN et al 2009).

Como a maioria das proteínas mitocondriais é traduzida no citoplasma e deve ser importada para a mitocôndria, é provável que durante condições de estresse, as taxas de importação mitocondrial sejam alteradas (AKEN et al, 2009).

Türkan et al. (2009) destacam que certas plantas podem aclimatar-se às condições de estresse, mas dependem de ativação das cascatas de redes moleculares envolvidas no esforço de detecção, transdução de sinal e expressão de genes específicos relacionados com o estresse e seus metabólitos. Os processos de adaptação são elaborados e mais de um gene pode ser expresso durante o processo de aclimação.

Além dos efeitos sobre a mitocôndria a fotossíntese é um alvo significativo de diferentes estresses que provocam mudanças na fluorescência transiente OJIP da clorofila *a*, sendo assim importante verificar como se apresenta o fluxo energético do fotossistema II (FSII), na cadeia de transporte de elétrons, chegando ao fotossistema I (FSI), que dará origem ao ATP e ao NADPH₂.

Conforme destacado por Strasser et al (2000) a intensidade de fluorescência de clorofila nas plantas é originada principalmente no FSII, sendo de grande importância para muitos estudos na área de fotossíntese.

Baker e Rosenqvist (2004) salientam a importância do uso de técnicas não-invasivas em estudos de estresses, pois uma característica importante do desenvolvimento da cultura e programas de melhoramento é a avaliação efetiva de crescimento e desempenho das plantas sobre diferentes estresses. Os estudos com a cinética de emissão de fluorescência da clorofila ganharam grande impulso com o desenvolvimento de instrumentos portáteis e mais precisos, que possibilitam medições em plantas intactas que permitem a compreensão de como as mudanças nas características de fluorescência de plantas se relacionam com o desempenho fisiológico. Assim, a análise da fluorescência da clorofila constitui-se em um método sensível, eficiente, rápido e não destrutivo capaz de detectar com segurança e confiabilidade efeitos de estresse e injúrias no processo fotossintético (YUSUF et al., 2010).

As mudanças na cinética de emissão de fluorescência a partir de organismos fotossintéticos são freqüentemente modificações na atividade fotossintética (BAKER e ROSENQVIST, 2004), principalmente quanto a eficiência quântica do transporte de elétrons através do FSII em folhas (GENTY et al., 1989) sendo esta relacionada à assimilação de CO₂ (BAKER e ROSENQVIST, 2004). Permite desta forma o entendimento dos mecanismos da fotossíntese propriamente ditos, bem como a avaliação da capacidade fotossintética alterada por estresses bióticos ou abióticos pelos quais possam acontecer com as plantas.

O uso da fluorescência das clorofilas permite a rápida identificação de injúrias causadas ao aparelho fotossintético, mesmo quando o sintoma ainda não é visível, até a análise detalhada da alteração da capacidade fotossintética da planta, além do fato de ser uma avaliação não destrutiva, sendo possível de se realizar tanto em laboratório quanto em campo (CATUNDA et al, 2005). Zribi et al. (2009) descrevem que a fluorescência da clorofila *a* pode apontar desde a possibilidade de uma planta tolerar estresses ambientais, bem como a medida em que esses estresses têm danificado o aparelho fotossintético, podendo ser excelente ferramenta para estudo de estresses que induzem mudanças no FSII. Yusuf et al., (2010) abordam que o aparelho fotossintético das plantas é muito sensível a estresses ambientais e mesmo pequenas alterações na sua estrutura e no seu funcionamento podem ser facilmente detectadas através da fluorescência da clorofila *a*.

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do estresse por alagamento e por altas e baixas temperaturas em plantas transformadas e não transformadas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cultivar Micro-Tom, com diferentes expressões de sHSP22 mitocondrial (MT-sHSP22), sobre a cinética de emissão da fluorescência transiente da clorofila *a*, as trocas gasosas, o índice de clorofila e os parâmetros de crescimento em plantas de tomate.

CAPITULO 1

ESTRESSE ABIÓTICO EM PLANTAS TRANSFORMADAS E NÃO TRANSFORMADAS DE TOMATE ‘MICRO-TOM’ COM DIFERENTES EXPRESSÕES DA sHSP22 MITOCONDRIAL: 1. EFEITO DO ALAGAMENTO

Abiotic stress in plants transformed and untransformed Micro-Tom tomato with different expressions of mitochondrial sHSP22: 1. Effect of flooding

RESUMO

O alagamento do solo é um estresse ambiental grave para as culturas, e pode afetar o seu desempenho fisiológico e consequentemente prejudicar o seu rendimento. As proteínas denominadas *heat shock proteins* (HSP), agem como meio de proteção frente a agentes estressores. Buscou-se esclarecer os efeitos fisiológicos do alagamento sobre o tomate, cv. Micro-Tom transformadas para diferentes níveis de expressão de HSPs mitocondrial (MT-sHSP22). Avaliou-se plantas de três genótipos (não transformadas, com elevada expressão de MT-sHSP22 e com baixa expressão de MT-sHSP22) que foram cultivadas em condições controladas. Quando as plantas apresentavam 50 dias foram parcialmente alagadas por um período de 14 dias, sendo que após sete dias de alagamento metade das plantas de cada genótipo foi submetido à recuperação. Foi determinada a emissão de fluorescência das clorofilas, as trocas gasosas, o índice de clorofila, área foliar e massa seca. Este estresse alterou a cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese que está relacionada a inativação do complexo de evolução de oxigênio, da perda da conectividade entre as unidades do fotossistema II, da oxidação-redução do pool de plastoquinona, e da atividade do fotossistema I. O genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22 foi o menos sensível ao estresse por alagamento.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum* Mill., fluorescência das clorofilas, Teste JIP, trocas gasosas.

ABSTRACT: Flooding of the soil is a severe environmental stress to crops, and may affect their physiological performance and, consequently, affect their productivity. The proteins called “heat shock proteins” (HSP) act as a safeguard against stressors agents. A clarification of the physiological effects of flooding on tomato farming was sought, Micro-Tom transformed to different levels of expression of mitochondrial HSPs (MT-sHSP22). Plants of three different genotypes were evaluated (not

processed, with high and low expression of MT-sHSP22) that were grown under controlled conditions. When the plants were 50 days they were submitted to stress by flooding for a 14 days time, and after seven days of flooding, half of the plants from each genotype were submitted to recovery. We determined the fluorescence emission of chlorophyll, gas exchange, chlorophyll index, leaf area and dry mass. This stress changed the electron transport chain of photosynthesis the is related to inactivation of oxygen evolution complex, of the loss of connectivity between units of photosystem II, of the oxidation-reduction of the plastoquinone pool, and the activity of photosystem I. The genotype with high expression of MT-sHSP22 was the least sensitive to stress by flooding.

Key words: *Lycopersicon esculentum* Mill, chlorophyll fluorescence, JIP test, gas exchange.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, estima-se que haja cerca de 28 milhões de hectares de solos sujeitos ao encharcamento (solos aluviais e hidromórficos) (MAGALHÃES et al., 2005), o que pode prejudicar seriamente o desempenho das plantas terrestres causando um grande impacto sobre a distribuição das espécies.

A deficiência de oxigênio é considerada um determinante importante em relação aos efeitos nocivos do alagamento nas plantas (HORCHANI et al, 2009). As mudanças físico-químicas do solo, induzidas pelo alagamento, afetam vários aspectos da fisiologia, morfologia e anatomia, dependendo da espécie vegetal (KOZLOWSKI, 1997). As plantas que frequentemente estão expostas a tais condições sofrem restrições no seu crescimento e desenvolvimento (HORCHANI et al., 2008), pois nas condições de solos inundados a difusão de O₂ se torna muito baixa, gerando uma diminuição da concentração deste gás (DANTAS et al., 2001) e, como consequência, manifestam-se nas plantas vários distúrbios em seu metabolismo, reduzindo tanto o crescimento vegetativo como o reprodutivo (KOZLOWSKI, 1997; DREW, 1997). O excesso de água no solo acarreta diminuição da difusão do oxigênio, necessário à respiração radicular, causando a hipoxia ou anoxia no solo (MATTOS, et al., 2005).

A diminuição de oxigênio na região das raízes pode desencadear respostas metabólicas, que poderão iniciar uma cascata de sinalização (HORCHANI et al., 2009). A consequência imediata da depleção de oxigênio é a redução na respiração,

diminuindo a geração de ATP e levando a uma diminuição na carga energética gerada (HORCHANI et al., 2009). Alterações nos níveis de ATP podem servir como sinal para posteriores respostas adaptativas como aumento do fluxo glicolítico (Efeito Pasteur) e mudança para a fermentação alcoólica (HORCHANI et al., 2009; MAGALHÃES et al, 2009).

As plantas, em condições naturais ou experimentais, podem ser submetidas à disponibilidade de O₂ que varia desde a normoxia, passando pela hipoxia ou até mesmo pela anoxia. Vários processos metabólicos são afetados pela deficiência de O₂, porém os eventos mais estudados são os relacionados à respiração e ao metabolismo de Nitrogênio. Na ausência de um aceptor eletrônico terminal na cadeia de transporte de elétrons, o ciclo do ácido tricarboxílico passa a funcionar parcialmente e em ambas as direções. Ocorre a acidificação do citosol e o piruvato, produto da glicólise, é transformado em lactato e etanol, que representam as principais reações fermentativas das plantas (SOUZA e SODEK 2002). Em condições alagadas, as raízes crescem somente na região superficial e não conseguem explorar totalmente o volume do solo, como em condições aeradas. Além disso, a hipoxia diminui a condutividade hidráulica e afeta as aquaporinas, diminuindo a absorção de água e nutrientes da raiz (MAGALHÃES et al, 2009).

As espécies sensíveis ao estresse por inundação desenvolvem sintomas, os quais resultam principalmente dos distúrbios causados pela hipoxia ou anoxia nas raízes. Os mais comuns são a abscisão de folhas, flores e frutos, clorose nas folhas, redução no comprimento da raiz principal, redução no crescimento em altura, inibição da formação de primórdios foliares, redução na expansão foliar e até mesmo morte da planta (ARRUDA et al, 2004). Além de adaptações morfo-anatômicas, podem ocorrer algumas alterações nas taxas de transpiração, da fotossíntese e na condutância estomática, decorrentes de ajustes bioquímicos e metabólicos, provocados pela inundação (KOZLOWSKI, 1997; ARRUDA et al, 2004). O crescimento e o desenvolvimento das plantas dependem, além das condições ambientais, do particionamento do carbono assimilado entre as fontes fotossintéticas, como as folhas maduras e tecidos jovens, raízes e frutos (HORCHANI et al, 2009). O decréscimo na produção de energia fotoquímica, em consequência do alagamento do solo pode afetar a eficiência fotossintética, em virtude de distúrbios causados na raiz ou diretamente na parte aérea, e dos danos

que ocorrem nas estruturas responsáveis pela fase fotoquímica da fotossíntese (ALLEN et al., 1996).

Muitos estudos têm mostrado que a diminuição da fotossíntese sob estresse hídrico pode ser associada com as perturbações dos processos bioquímicos (LU e ZHANG, 1999). Em particular, o fotossistema II tem se mostrado muito sensível ao estresse hídrico. Vários estudos demonstraram que o estresse hídrico resulta em danos no complexo de liberação de oxigênio do FSII (LU e ZHANG, 1999) e nos centros de reação do FSII (HAVAUX et al, 1987 apud LU e ZHANG, 1999; HE et al, 1995).

Uma das funções mais importante da célula vegetal é reagir contra o estresse induzido por autodefesa, sendo que estresses abióticos costumam causar alterações na síntese protéica, alterando os níveis de uma série de proteínas que podem ser solúveis ou de natureza estrutural (TIMPERIO et al, 2008).

Timperio et al. (2008) afirmam que as proteínas de choque térmico (HSP - *heat shock proteins*) são conhecidas por serem induzidas não só em resposta ao estresse de curto prazo, mas sua produção é um passo necessário para a aclimação da planta ao calor.

Estudos têm demonstrado que as sHSP (*small heat shock proteins*) em plantas são produzidas em resposta a uma ampla variedade de estresses ambientais, por exemplo calor, seca, frio, luz alta, radiação ultravioleta, estresse osmótico, estresse oxidativo e interação planta-patógeno (SARKAR et al, 2009).

Embora o papel das HSP na tolerância ao estresse seja muito importante, sendo fundamentais nos processos de proteção membranária, síntese e reparo de proteínas, contribuindo assim para a homeostase celular, existem outros estudos que sugerem que estas proteínas podem ter outras funções ainda desconhecidas (MORROW, 2000).

As HSPs funcionam como chaperonas moleculares, ou seja, tais proteínas interagem com outras proteínas minimizando a probabilidade dessas proteínas de interagir de forma inadequada com outras proteínas. As HSPs reconhecem e ligam-se a outras proteínas quando não estão em conformações-nativas, ou seja por desnaturação de proteínas de estresse ou porque os seu peptídeos ainda não foram totalmente sintetizados, dobrados, montados, ou localizadas em um compartimento celular apropriado (FEDER e HOFMANN 1999).

Strasser e Tsimilli-Michael (2001) salientam que todo sistema biológico funciona como um conversor de energia, trocando também matéria com o ambiente. Após qualquer alteração nas condições ambientais os sistemas vivos são capazes de sofrer alterações do seu estado interno de modo que possam se adaptar às novas condições, sem muita alteração no metabolismo geral. Desta forma, técnicas experimentais para medir o comportamento energético de um sistema fotossintético são necessárias e permitem a compreensão dos efeitos dos estresses sobre o metabolismo vegetal.

Dentre estes métodos, as análises de trocas gasosas e especialmente a emissão da fluorescência da clorofila tem sido amplamente utilizados para descrever ou mesmo prever o comportamento fotossintético em resposta a estresses.

Medições de fluorescência podem ser úteis em rápida avaliação dos efeitos dos fatores climáticos sobre o desempenho da planta (FIRMANO et al., 2009). A fluorescência da clorofila, além de não-destrutiva, é altamente sensível e de fácil manuseio, permitindo a obtenção de informações qualitativas e quantitativas sobre a condição fisiológica do aparato fotossintético (BAKER e ROSENQVIST, 2004). O Teste JIP (STRASSER e STRASSER, 1995) tem sido amplamente utilizado para a avaliação do impacto dos diferentes tipos de estresses nas plantas, tais como, elevada luminosidade, temperaturas baixas ou altas, ozônio, seca, salinidade e metais pesados como citado por Yusuf et al. (2010).

Os parâmetros da fluorescência da clorofila são empregados como indicativos de alterações na atividade fotossintética, sendo que a eficiência do transporte de elétrons através do FSII e a eficiência de operação deste estão correlacionados à assimilação de CO₂, sendo assim uma excelente ferramenta para examinar respostas e o desempenho fotossintético e fisiológico das plantas (BAKER e ROSENQVIST, 2004).

A intensidade da fluorescência da clorofila de organismos fotossintéticos adaptados ao escuro segue uma variação característica com o tempo após o início da iluminação. Esse efeito é conhecido como "efeito Kautsky". Na curva de indução de fluorescência, na intensidade mínima (F_0) todos os centros de reação estão abertos e na máxima (F_M) todos os centros de reação estão fechados. Todos os materiais fotossintéticos oxigênicos investigados até o momento mostram um aumento transiente da fluorescência constituído de uma sequência de fases, destacando as fases OJ e IP (STRASSER et al., 2000).

O tomateiro cv. Micro-Tom é considerado como um modelo de planta da família Solanaceae, pois possui características que o tornam adequado para o estudo experimental, tais como: o tamanho pequeno, cerca de 15 cm de altura, permite o cultivo denso (MEISSNER et al. 1997); o tempo de geração curto; e facilidade de transformação, sendo esta cultivar utilizada para a construção de bibliotecas de cDNA completo (AOKI et al, 2010), o que permite estudos de bioengenharia molecular. O pequeno tamanho da cultivar Micro-Tom permite experiências em ambientes confinados e ambientes controlados que cumprem as normas de segurança para os Organismos Geneticamente Modificados (OGM) (WATANABE, et al. 2007).

Atualmente Micro-Tom tem sido proposta como a cultivar preferencial para pesquisas a nível molecular para uma nova geração de linhagens transgênicas em tomateiro (MELO et al, 2009). Sendo assim, à medida que surgem novas linhagens transformadas com diferentes expressões de MT-sHSP22 mitocondrial é indispensável a realização de vários tipos de ensaios.

O trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a*, as trocas gasosas, o índice de clorofila e os parâmetros de crescimento em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivar Micro-Tom com diferentes níveis de expressão da MT-sHSP22 (*mitochondrial small heat shock proteins*) submetidas a estresse por alagamento.

2. MATERIAL E METODOS

2.1. Material vegetal e tratamentos

Foram utilizadas sementes de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill cv. Micro-Tom não transformadas (selvagem) e transformadas para resultarem em diferentes níveis de expressão de MT-sHSP22 mitocondrial (elevada e baixa) (Anexo 1), gentilmente cedidas pelo Prof. Cesar Valmor Rombaldi – Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, na Universidade Federal de Pelotas (DCTA-FAEM-UFPel).

As sementes foram colocadas em caixas de Gerbox®, com papel mata borrão e acondicionadas em câmara de germinação, permanecendo por cinco dias no escuro e após este período, transferidas para condição de baixa intensidade luminosa, onde permaneceram por mais dez dias. Quinze dias após a semeadura,

foram escolhidas 15 plântulas de cada genótipo, e transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 500 mL, tendo com substrato areia peneirada e lavada. As plântulas foram colocadas em câmaras de crescimento com condições controladas: densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, na altura central das copas das plantas; fotoperíodo de 10 horas; e temperatura de $21 \pm 3^\circ\text{C}$. A irrigação foi realizada diariamente, mantendo a umidade do substrato. Após o transplântio das mudas, três vezes por semana, foi aplicada solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), com pH ajustado para 6,0-6,5.

Quando as plantas estavam com 50 dias após a semeadura iniciaram-se a aplicações dos tratamentos que consistiram no alagamento (imersos com uma lâmina de água de 2 a 3 centímetros acima do nível do solo) de 10 plantas de cada genótipo. Após sete dias de alagamento, metade das plantas de cada genótipo foi retirada do estresse e retornaram as condições normais de níveis de água. O tratamento controle foi considerado as plantas que permaneceram em condições normais de níveis de água.

As medidas do índice de clorofila, fluorescência transiente das clorofilas OJIP e trocas gasosas foram realizadas no primeiro, terceiro, sétimo, décimo e décimo quarto dia após o início do experimento. Para as plantas que se encontravam em recuperação, foram realizadas determinações após três e sete dias de recuperação. As medidas de área foliar e massa seca das partes das plantas foram determinadas ao final do experimento (14 dias após o início do alagamento).

2.2 Índice de clorofila

Os teores de clorofila foram determinados, utilizando-se um medidor portátil de clorofila (CL-01 Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn Norfolk, UK), conforme metodologia descrita por Cassol et al. (2008), e expressos pelo índice de clorofila. As avaliações foram realizadas nas mesmas folhas utilizadas para as medidas da fluorescência da clorofila a e trocas gasosas.

2.3 Medida da fluorescência transiente OJIP

A fluorescência transiente OJIP da clorofila a foi medida nas primeiras folhas jovens completamente expandidas utilizando um fluorômetro portátil (Modelo Handy PEA, Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK). As medidas foram realizadas em folhas não destacadas previamente adaptadas ao escuro por 30

minutos para oxidação completa do sistema fotossintético de transporte de elétrons. A emissão de fluorescência foi induzida em uma área de 4 mm de diâmetro da folha pela exposição da amostra a um pulso de luz vermelha (pico 650 nm) numa intensidade de cerca de $3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As intensidades de fluorescência foram medidas entre 50 μs e 1 s. As intensidades de fluorescência determinadas em: 50 ($F_{50 \mu\text{s}}$), 100 ($F_{100 \mu\text{s}}$), 300 ($F_{300 \mu\text{s}}$) μs , 2 ($F_{2 \text{ ms}}$) e 30 ($F_{30 \text{ ms}}$) ms e F_m (fluorescência máxima), foram utilizadas para calcular os parâmetros de Teste JIP (STRASSER e STRASSER, 1995). Foi considerada a fluorescência inicial (F_0) a intensidade medida a 50 μs .

2.4 Análise dos dados de fluorescência

2.4.1 Teste JIP

A partir das intensidades de fluorescência medidas foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER e STRASSER, 1995), sendo que a interpretação adequada e correta dos referidos parâmetros deve ser realizada de forma cuidadosa, para que os dados analisados sejam informações corretas sobre o comportamento e o fluxo de energia em diferentes níveis. Para o cálculo dos parâmetros do Teste JIP utilizou-se o software Biolyzer (gentilmente cedido pelo Dr. Reto Strasser, Universidade de Genebra). A lista de alguns parâmetros do Teste JIP encontra-se na Tabela 1.

2.4.2 Normalização e subtrações das curvas de fluorescência transiente

Os parâmetros do Teste JIP foram normalizados para os valores obtidos nos respectivos controles, aos quais se atribuiu o valor unitário. Desta forma é possível comparar os efeitos do estresse em relação ao controle, podendo avaliar o impacto das mudanças de estado induzido pelo estresse.

Para comparação dos eventos refletidos nas fases OJ, OI e IP, as curvas transiente foram normalizadas como fluorescência variável relativa. Tsimilli-Michael e Strasser (2008), indicam que essas comparações, bem como as diferenças entre as fluorescências variáveis relativa entre as plantas submetidas ao estresse e o controle permitem a adequada avaliação dos eventos biofísicos afetados pelo estresse relativo ao fluxo de energia na cadeia de transporte de elétrons.

2.5 Trocas gasosas

As trocas gasosas foram medidas na primeira folha superior madura, completamente expandida, com um analisador portátil a infra-vermelho de CO₂ (modelo LI-6400XT LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA). As medidas foram realizadas entre as 10:00 e 11:00hs, com concentração de CO₂ no interior da câmara de 380 mol mol⁻¹ e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo de 1.500 μmol m⁻² s⁻¹, utilizando-se a fonte luminosa LI-COR 6400-02, acoplada à câmara de medida. As variáveis medidas foram: taxa assimilatória líquida de CO₂ (A, μmol CO₂ m⁻² s⁻¹); condutância estomática (g_s, mol H₂O m⁻² s⁻¹); e concentração intercelular de CO₂ (C_i, Pa), a partir das medidas da A e C_i calculou-se a eficiência aparente de carboxilação (A/C_i, μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ Pa⁻¹).

2.6 Medidas de crescimento

Ao final do experimento foram medidas a área foliar (AF) e massa seca do caule, pecíolo, folhas e raízes, permitindo o cálculo posterior da massa seca total das plantas e a razão massa seca da parte aérea sobre a massa seca das raízes. A área foliar foi estimada utilizando um medidor de área foliar (Modelo LI-3100 Li-Cor Inc., Lincoln, NE). Em relação a massa seca, foi realizada a pesagem do material vegetal, após secagem em estufa com circulação de ar forçada, a 65°C por um período de pelo menos 72h.

2.7 Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado sendo que as médias foram comparadas dentro de cada genótipo pelo Teste Tukey (p<0,05). Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, sendo considerada unidade experimental uma planta. Para as determinações de fluorescência da clorofila a foram realizadas três medidas por planta, totalizando 15 medidas por tratamento.

Tabela 1: Resumo dos parâmetros, fórmulas e sua descrição com dados extraídos de fluorescência da clorofila a (OJIP) transitória.

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	
$F_o \cong F_{50 \mu s}$	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
$V_J = (F_{2 ms} - F_o)/(F_m - F_o)$	Fluorescência variável relativa no passo J (2 ms)
$V_I = (F_{30 ms} - F_o)/(F_m - F_o)$	Fluorescência variável relativa no passo I (30 ms)
$M_o = 4 (F_{300 \mu s} - F_o)/(F_m - F_o)$	Declividade inicial (em ms^{-1}) da fluorescência transiente $V = f(t)$
$N = S_m * (M_o/V_J)$	Número de giros de redução, oxidação e re-redução de Q_A no tempo entre a luz ser ligada até atingir F_m
$S_m = EC_o/RC = Area/(F_m - F_o)$	Área complementar total normalizada acima da curva OJIP
$S_s = V_J/M_o$	Área complementar total normalizada acima da curva transiente entre os passos O e J
Rendimentos e razões de fluxo	
$\phi_{P_o} = TR_o/ABS = 1 - F_o/F_m = F_v/F_m$	Rendimento quântico máximo fotoquímico primário em $t = 0$
$\phi_{E_o} = \phi_{P_o} * \psi_o = 1 - (F_J/F_m) = ET_o/ABS$	Rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons
$\psi_{E_o} = ET_o/TR_o = 1 - V_J$	Probabilidade (no tempo 0) que um exciton capturado em mover um elétron na cadeia de transporte de elétrons após Q_A^-
$\delta_{R_o} = RE_o/ET_o = (1 - V_I)/(1 - V_J)$	Eficiência com que um elétron pode mover dos aceptores de elétrons do intersistema reduzidos para os aceptores finais do FSI
$\phi_{R_o} = RE_o/ABS = \phi_{P_o} * \psi_{E_o} * \delta_{R_o}$	Rendimento quântico de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI por fóton absorvido
Fluxos específicos ou atividades expressas por centro de reação (CR)	
$ABS/CR = M_o * (1/V_J) * (1/\phi_{P_o})$	Fluxo de absorção por CR
$TR_o/CR = M_o/V_J$	Fluxo de energia capturado por CR em $t = 0$
$ET_o/CR = (M_o/V_J) * \psi_{E_o} = (M_o/V_J) * (1 - V_J)$	Fluxo de transporte de elétrons por CR em $t = 0$
$RE_o/CR = (RE_o/ET_o) * (ET_o/CR)$	Redução dos aceptores finais do lado receptor de elétrons do FSI no por CR em $t = 0$
Índice de Performance	
$PI_{abs} = (CR/ABS) * (\phi_{P_o}/(1 - \phi_{P_o})) * (\psi_{E_o}/(1 - \psi_{E_o}))$	Índice de performance total
$PI_{total} = (CR/ABS) * (\phi_{P_o}/(1 - \phi_{P_o})) * (\psi_{E_o}/(1 - \psi_{E_o})) * (\delta_{R_o}/(1 - \delta_{R_o}))$	Índice de performance total , medindo a performance ate os aceptores finais de elétrons do FSI

3. RESULTADOS

3.1 Índice de clorofila

Na Figura 1 encontram-se os valores dos índices de clorofila para as plantas de tomate 'Micro Tom' durante o período de alagamento e de recuperação. Observou-se um incremento nos índices de clorofila nas plantas de todos os genótipos mantidas em condições normais de irrigação (controle) durante o transcorrer do experimento. No primeiro dia de alagamento, o índice de clorofila das plantas selvagens alagadas (Figura 1A) e com alta expressão da MT-sHSP22 (Figura 1B) apresentaram valores semelhantes, enquanto que as plantas com baixa expressão da MT-sHSP22 apresentaram maiores valores (Figura 1C), comparadas ao controle. Após o terceiro dia de alagamento os índices de clorofila nas plantas selvagens e com baixa expressão da MT-sHSP22 reduziram, sendo que para as plantas do genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22 os valores ficaram próximos aos do controle. Entretanto, para as plantas com elevada expressão da MT-sHSP22 (Figura 1B) foi observado um crescimento no terceiro dia após o alagamento.

No 7º dia de estresse por alagamento para as plantas do genótipo selvagem foi identificado um aumento no índice de clorofila, em relação ao índice de clorofila do 3º dia, fato observado também para as plantas do genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22, o que não foi verificado para as plantas com elevada expressão da MT-sHSP22, nas quais ocorreu uma redução nos índices de clorofila. No 10º dia após o início do estresse as plantas dos genótipos selvagem e com baixa expressão da MT-sHSP22 apresentaram um no índice de clorofila, em relação a avaliação anterior, enquanto que no controle esse índice aumentou. Entretanto, as plantas do genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22 apresentou um ligeiro acréscimo no índice de clorofila.

Aos 14 dias de estresse por alagamento, houve um acréscimo no índice de clorofila em relação aos 10 dias de alagamento, para os genótipos selvagens e com elevada expressão da MT-sHSP22, enquanto que para as plantas do genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22 os valores continuaram diminuindo, mostrando as maiores diferenças em relação às plantas controle.

O efeito do período de recuperação após o alagamento por sete dias não foi marcante para nenhum dos genótipos estudados, sendo que os valores observados

aos sete dias de recuperação foram similares aos observados aos três dias de recuperação (Figura 1).

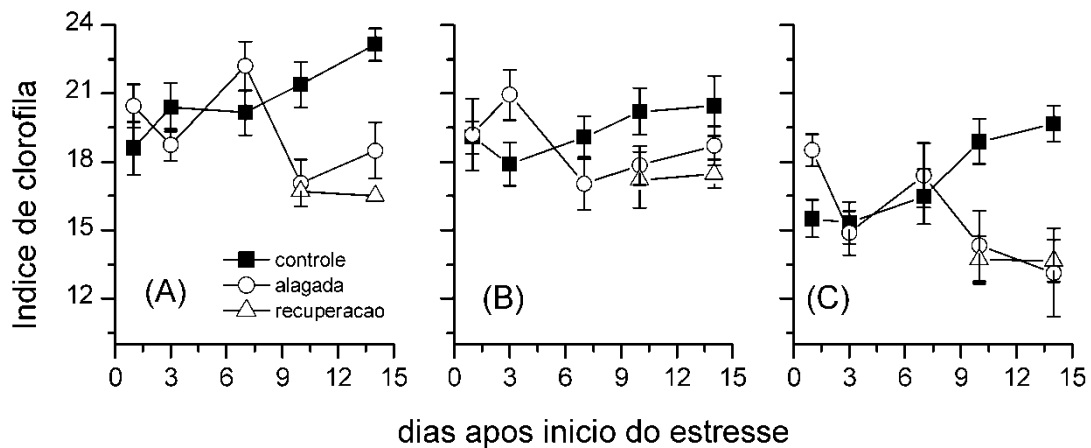


Figura 1: Índice de clorofila, unidade relativa, de plantas de tomate 'Micro-Tom' cultivadas sob diferentes condições de nível de água (controle, alagadas por sete dias, alagadas por sete dias e recuperadas por sete dias). (A) genótipo selvagem, (B) genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, (C) genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22. Barra indica erro padrão da média.

3.2 Análise da fluorescência transiente OJIP pelo Teste JIP

Parâmetros biofísicos derivados das curvas de fluorescência transiente OJIP e alguns parâmetros do Teste JIP (STRASSER e STRASSER, 1995) estão representados nas Figuras 2 e 3. Todos os dados dos parâmetros de fluorescência foram normalizados para os respectivos controles. Na Figura 2 são representados os dados relativos aos períodos de alagamento, enquanto na que Figura 3 estão os dados do período de recuperação.

Foram observados em todos os genótipos um aumento nas intensidades de fluorescência a 50, 100, 300 μ s e 2 ms ($F_{50\mu s}$, $F_{100\mu s}$, $F_{300\mu s}$ e F_{2ms} , respectivamente) apenas aos 14 dias após o início do alagamento. Porém as intensidades medidas a 30 ms (F_{30ms}) e a fluorescência máxima (F_M) não se alteraram para as plantas dos genótipos selvagem e com elevada expressão da MT-sHSP22, contudo para as plantas com baixa expressão da MT-sHSP22 tais valores reduziram em relação ao controle com o decorrer do estresse (Figura 2C).

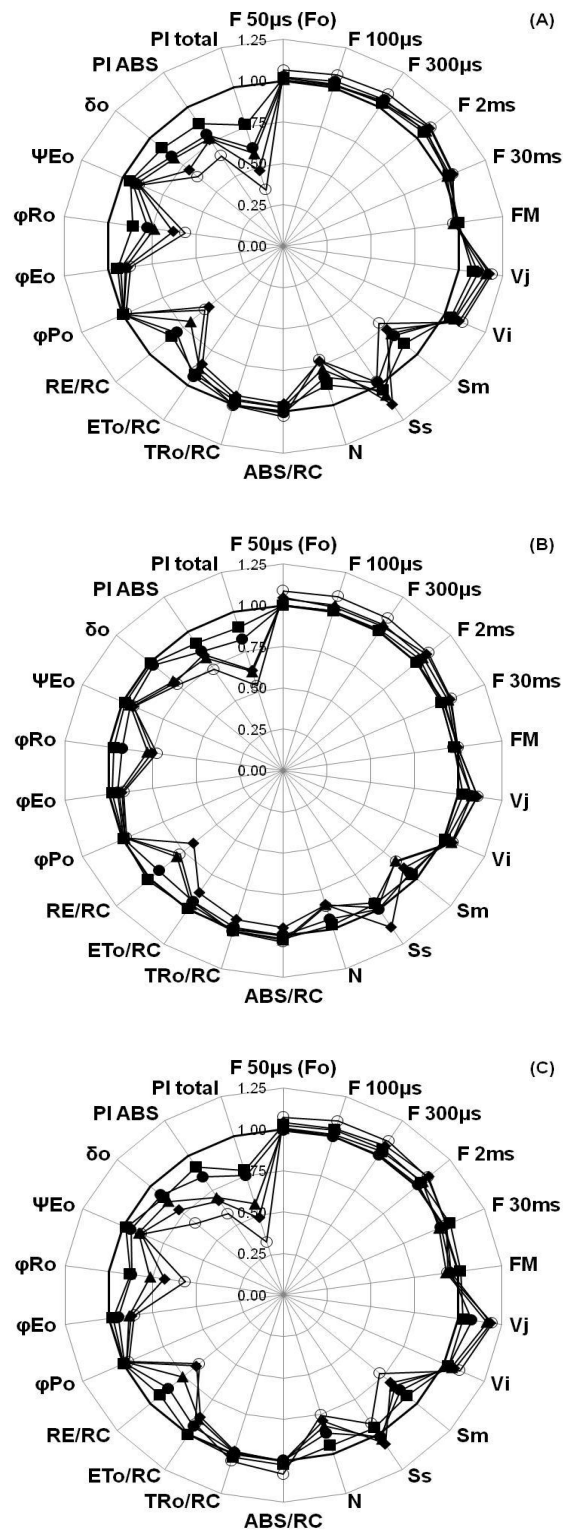


Figura 2: Parâmetros do Teste JIP, em relação ao respectivo controle, obtidos a partir da fluorescência transiente OJIP das clorofilas de plantas de tomate 'Micro-Tom' cultivadas sob condições de alagamento, normal e recuperada por diferentes períodos. (A) genótipo selvagem, (B) genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, (C) genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22. (—) controle, (—■—) 1, (—●—) 3, (—▲—) 7, (—◆—) 10 e (—◊—) 14 dias de alagamento.

A fluorescência relativa variável no passo J (2 ms) (V_J) aumentou com o transcorrer do estresse nas plantas de todos os genótipos, mas o incremento foi maior no genótipo selvagem e com baixa expressão da MT-sHSP22, quando comparadas ao controle. A fluorescência relativa variável no passo I (30 ms) (V_I) apresentou variações discretas em resposta ao estresse por alagamento nos três genótipo.

De maneira geral, para os três genótipos o alagamento provocou uma redução em S_m (área complementar total normalizada acima da curva transiente OJIP, refletindo eventos de múltiplos giros de redução de Q_A , indicando medida da energia necessária para fechar todos os centros de reação do FSII expressa como o número total de carregadores de elétrons por centro de reação do FSII) (Strasser et al, 2004). Porém, para as plantas do genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22 foram identificadas as menores reduções em S_m . Por outro lado, S_s (área complementar total normalizada acima da curva transiente somente na fase OJ, refletindo eventos de simples giros de redução de Q_A) (CHEN et al. 2011) não foi marcadamente afetada pelo estresse, podendo-se destacar apenas uma elevação neste parâmetro para plantas selvagens e com elevada expressão da MT-sHSP22 aos 10 dias de alagamento.

O numero de giros de redução, oxidação e re-redução de Q_A no tempo entre a luz ser ligada até atingir F_M (N) reduziu em todos os genótipos sob efeito do estresse por alagamento, sendo a redução tempo-dependente. Porém, para as plantas do genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, tal redução foi em menor magnitude (Figura 2B).

Os parâmetros que descrevem os fluxos específicos (fluxos por centro de reação do FSII) de absorção (ABS/RC) e de captura pelo centro de reação (TR_0/RC) não foram afetados pelo alagamento em nenhum dos genótipos avaliados. Porém, o fluxo de transporte de elétrons (ET_0/RC) apresentou redução em todos os genótipos, principalmente a partir do 10º dia de alagamento. O fluxo relacionado à redução do aceptor final de elétrons do fotossistema I (FSI) (RE_0/RC) decresceu já a partir do 1º dia após o início do alagamento, para as plantas do genótipo selvagem e com baixa expressão da MT-sHSP22, intensificando com o decorrer do estresse. Para as plantas do genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22 tal fato foi mais acentuado após o terceiro dia de estresse por alagamento.

Não foi identificada diferença no rendimento quântico máximo fotoquímico primário ($TR_0/ABS = F_V/F_M = \phi_{P0}$) em relação a todos os genótipos. O rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons (ϕ_{E0}) reduziu em função do tempo de alagamento, principalmente após o sétimo dia de alagamento, sendo mais acentuada nas plantas do genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22.

O rendimento quântico de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI (ϕ_{R0}) diminuiu em função do período de estresse. Para as plantas do genótipo selvagem e com baixa expressão da MT-sHSP22, esta redução iniciou-se já no primeiro dia após o alagamento, enquanto que para as plantas do genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22 a redução foi mais evidenciada a partir do sétimo dia de alagamento.

Em relação aos parâmetros que descrevem a eficiência de conservação de energia pode ser destacado que: a eficiência/probabilidade com que um éxciton capturado no centro de reação possa mover um elétron de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons (Ψ_{E0}) foi pouco afetada pelo estresse por alagamento. Diferentemente, a relação eficiência/probabilidade com que um elétron do intersistema de carregadores de elétrons move-se para reduzir os aceptores finais de elétrons do FSI ou probabilidade de redução de umceptor final do FSI (δ_{R0}) acompanhou os resultados descritos para RE/RC e ϕ_{R0} , demonstrando um efeito acentuado sobre a atividade do fotossistema I sobre condições de alagamento.

Os índices de performace fotossintético, PI_{ABS} e PI_{total} são parâmetros que incorporam os termos que expressam potenciais parciais de conservação de energia na bifurcação seqüencial de energia do exciton até a redução dos aceptores de elétrons no intersistema de transporte de elétrons e a redução dos aceptores finais do FSI, respectivamente (YUSUF et al. 2010), sendo que cada potencial parcial é dado pela razão da eficiência de conservação de energia dividida pelo complemento da eficiência (Tabela 1). No presente experimento, ambos os índices de performace reduziram com o transcorrer do estresse, sendo que para o PI_{total} a redução foi mais evidenciada, corroborando com as afirmativas de Yusuf et al (2010) que indicam que este parâmetro é o mais sensível do Teste JIP por que incorpora vários parâmetros que são avaliados a partir da fluorescência transiente OJIP. Entretanto, na comparação entre os genótipos deve ser destacada que as plantas do genótipo com

elevada expressão da MT-sHSP22, estas reduções ou foram menores ou iniciaram-se mais tarde (Figura 2B).

Em relação ao período de recuperação (Figura 3), pode ser evidenciado que para plantas do genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22 praticamente todos os parâmetros do Teste JIP retornaram a valores similares aos observados no controle. Porém os parâmetros associados com a atividade e funcionalidade do FSI foram os que ainda apresentam um efeito residual do alagamento, principalmente no terceiro dia após a retirada do excesso de água. Tais fatos demonstram que a recuperação do estresse por alagamento permite que a maquinaria fotossintética, em termos estrutural e funcional determinados pelos parâmetros de eficiência, rendimento e performance, retorne a plena funcionalidade. Entretanto tal fato não foi observado para as plantas do genótipo selvagem e do genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22, indicando que o dano estrutural e funcional não foi reparado neste período de recuperação.

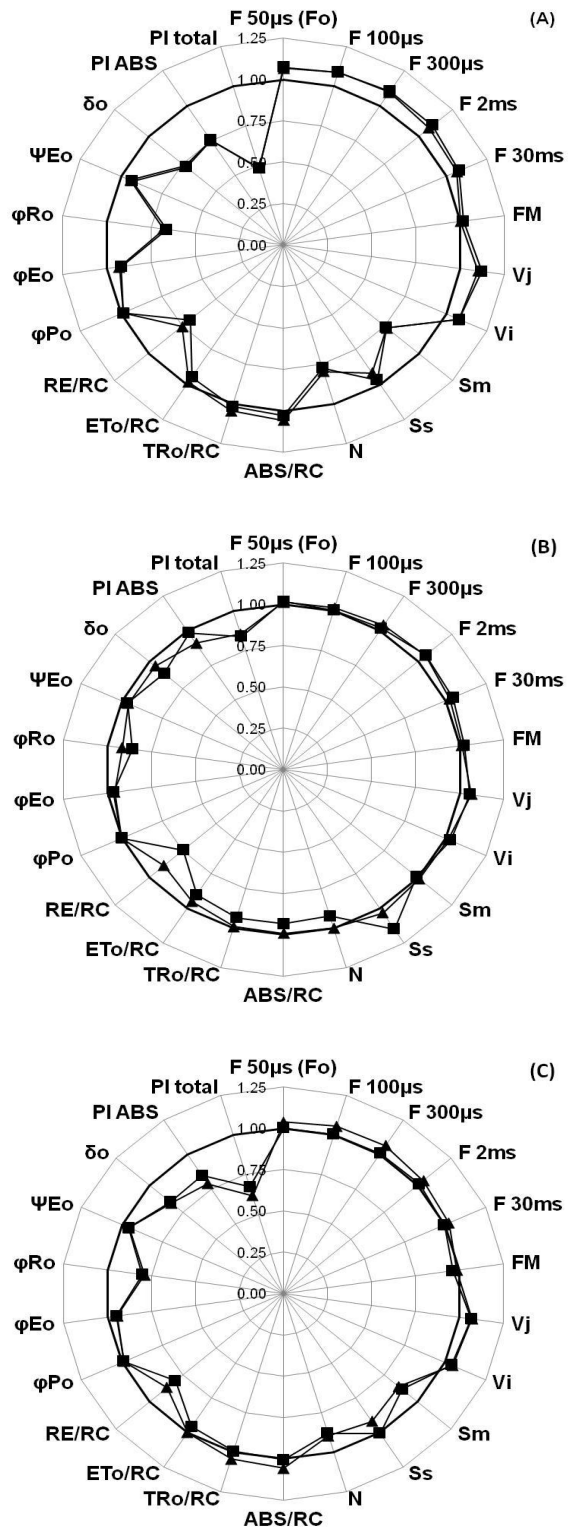


Figura 3: Parâmetros do Teste JIP, em relação ao respectivo controle, obtidos a partir da fluorescência transiente OJIP das clorofilas de plantas em tomate ‘Micro-Tom’ sob diferentes períodos de recuperação após alagamento por sete dias. (A) genótipo selvagem, (B) genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, (C) genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22. (—) controle, (—■—) 3 e (—▲—) 7 dias de recuperação.

3.3 Análise da fluorescência transiente OJIP: normalizações e subtrações

No intuito de avaliar pormenorizado o efeito do alagamento sobre as fases OJ, OI e IP da fluorescência transiente, são apresentados apenas os dados de normalizações e subtrações das curvas determinadas no 14º dia de alagamento, e 7º dia de recuperação em relação ao controle.

A fluorescência transiente OJIP das clorofilas *a* de folhas adaptadas ao escuro de tomate 'Micro Tom' são apresentadas, em escala logarítmica de tempo de 50 μ s a 1 s, na Figura 4 A-C. Todas as curvas mostraram a forma típica OJIP, com similar fluorescência variável máxima ($F_V = F_m - F_0$), demonstrando que todas as amostras estavam fotossinteticamente ativas, conforme prescrito por Yusuf et al. (2010). Nas Figuras 4 D-F são apresentados dados da fluorescência variável relativa [$V_{OP} = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$], enquanto que nas Figuras 4 G-H as diferenças entre as fluorescências variável e relativa [$\Delta V_{OP} = (V_{OP \text{ (tratamento)}} - V_{OP \text{ (controle)}})$] entre os passos O e P, pelas quais evidencia-se um comportamento distinto entre os genótipos, sendo que nas plantas com elevada expressão da MT-sHSP22 o efeito do alagamento é menos marcante.

Buscando-se uma melhor avaliação das diferenças entre os genótipos, empregaram-se normalizações adicionais e subtrações correspondentes, o que permite o estudo de diferença das cinéticas revelando bandas que estão ocultas entre os passos O, J, I e P.

Inicialmente, os dados de fluorescência foram normalizados entre os pontos O (50 μ s) e K (300 μ s) como fluorescência variável relativa [$V_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$] (Figura 5 A-C) e como diferença cinética [$\Delta V_{OK} = (V_{OK \text{ (tratamento)}} - V_{OK \text{ (controle)}})$] (Figura 5 D-F) em escala linear de tempo entre 50-300 μ s. Foi possível revelar a presença da banda-L (aproximadamente em 150 μ s) nas plantas de todos os genótipos estudados sob condições de alagamento. Porém, apenas nas plantas do genótipo que apresenta elevada expressão de MT-sHSP22 não identificou-se a banda-L, após período de recuperação de sete dias após o alagamento. A banda-L (STIRBET et al, 1998) revelada na subtração entre as fluorescência variável relativa entre os pontos O e K é um indicador da conectividade ou agrupamento das unidades do FSII, sendo que quando a banda-L é maior a conectividade é menor (YUSUF et al, 2010).

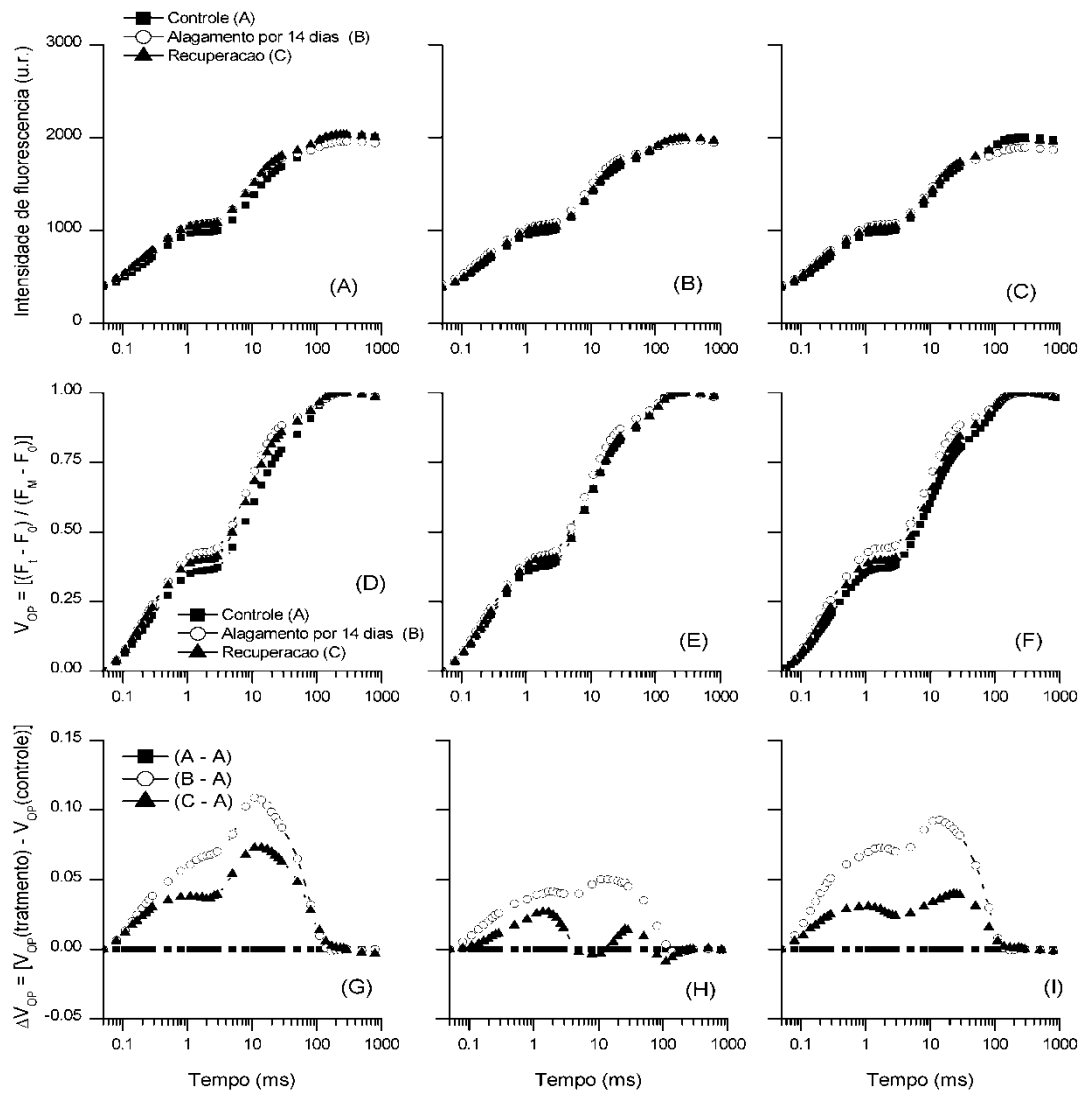


Figura 4. Fluorescência transiente OJIP das clorofilas em plantas de tomate 'Micro Tom' submetidas a condições normais de irrigação, 14 dias de alagamento e sete dias de alagamento com sete dias de recuperação. (A-C) Intensidade de fluorescência (D-F) fluorescência variável relativa [$V_{OP} = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$]; (G-I) diferença cinética de V_{OP} [$\Delta V_{OP} = (V_{OP}(\text{tratamento})) - (V_{OP}(\text{controle}))$]. (A, D e G) genótipo selvagem, (B, E e H) genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, (C, F e I) genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22.

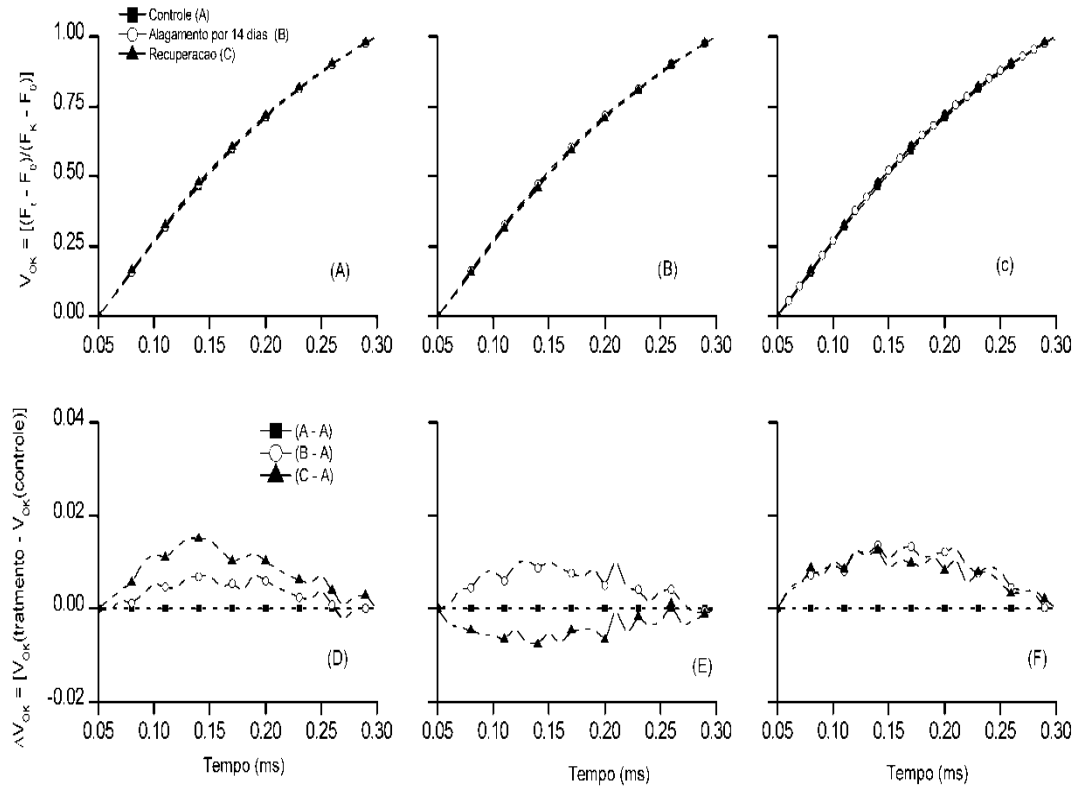


Figura 5. Fluorescência transiente OJIP das clorofilas de plantas de tomate ‘Micro Tom’ submetidas a condições normais de irrigação, 14 dias de alagamento e sete dias de alagamento com sete dias de recuperação. (A-C) fluorescência variável entre os passos O e K [$V_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$]; (D-F) diferença cinética de V_{OK} [$\Delta V_{OK} = (V_{OK}(\text{tratamento})) - (V_{OK}(\text{controle}))$]. (A e D) genótipo selvagem, (B e E) genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, (C e F) genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22.

Desta forma, pode-se inferir que o alagamento por 14 dias impôs a todos os genótipos uma perda de conectividade entre as unidades do FSII, contudo apenas para as plantas do genótipo que apresenta elevada expressão de MT-sHSP22 a recuperação foi eficiente para manter a conectividade entre as unidades do FS II (banda-L negativa) (Figura 5 E), sendo que a alta conectividade resulta na melhor utilização da energia de excitação e melhor estabilidade do sistema (STRASSER et al, 2004).

Na Figura 6 A-C, os dados de fluorescência foram normalizados entre os passos O (50 μ s) e J (2 μ s) como fluorescência variável relativa [$V_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$] e como diferença cinética [$\Delta V_{OJ} = (V_{OJ}(\text{tratamento})) - V_{OJ}(\text{controle})$]) (Figura 6 D-F) em escala linear de tempo entre 50 μ s - 2 ms. Tal procedimento permite a identificação

da banda-K (ao redor de 300 μ s), a qual segundo Yusuf et al (2010), quando positiva reflete uma inativação do complexo de liberação de oxigênio. O efeito do alagamento provocou nas plantas com baixa expressão da MT-sHSP22 o aparecimento da banda-K positiva, sendo que a recuperação para condições normais não alterou esta situação, porém para as plantas com elevada expressão da MT-sHSP22 não foi identificada banda-K proeminente em nenhum dos dois tratamentos em comparação com as plantas controle, podendo indicar uma efetiva estabilidade do complexo de liberação de oxigênio em resposta ao alagamento.

A normalização entre os passos O (50 μ s) e I (30 ms) serve para distinguir a seqüência de eventos a partir da captura do éxciton pelo FSII até a redução da plastoquinona (PQ) (fase O-I analisando para V_{OI} de 0 a 1), da transferência de elétrons direcionada ao FSI, para o acceptor final de elétrons do lado acceptor de elétrons do FS I, começando em plastoquinol (PQH_2) (fase I-P analisando para $V_{OI} \geq 1$) (YUSUF et al., 2010).

A avaliação da fase O-I foi realizada pela normalização das curvas transiente como fluorescência variável relativa [$V_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$], sendo que na Figura 7 A-C são apresentados os valores $V_{OI} < 1$. E na Figura 7 D-F as subtrações como [$\Delta V_{OI} = (V_{OI} \text{ (tratamento)} - V_{OI} \text{ (controle)})$]. Nesta figura foram observados comportamentos distintos entre os genótipos estudados, em resposta ao alagamento, demonstrando que o efeito do estresse foi mais marcante, sobre a fase O-I, para as plantas selvagem e com baixa expressão de MT-sHSP22, indicando provavelmente uma limitação na redução do acceptor final de elétrons do FSII, a plastoquinona, nestes genótipos, corroborando com os valores observados para os parâmetros do Teste JIP que descreve este fato.

A fase I-P foi avaliada a partir da normalização dos dados entre os passos O e I, contudo, analisando $V_{OI} \geq 1$ (Figura 8 A-C) e pela fluorescência variável relativa entre os pontos I e P, como [$V_{IP} = (F_t - F_I)/(F_M - F_I)$] (Figura 8 D-F) ambas em escala linear entre 30 e 300 ms. A amplitude máxima do aumento da fluorescência, representada na curva $V_{OI} \geq 1$, reflete o tamanho do *pool* de aceptores de elétrons do lado acceptor de elétrons do FSI. Neste sentido, pode-se observar que para todos os genótipos o alagamento reduziu essa amplitude, sendo em menor intensidade para as plantas do genótipo com elevada expressão de MT-sHSP22. Contudo a retirada das plantas do alagamento (recuperação) não reverteu este efeito a

exceção do observado para as plantas do genótipo com elevada expressão de MT-sHSP22 (Figura 8B).

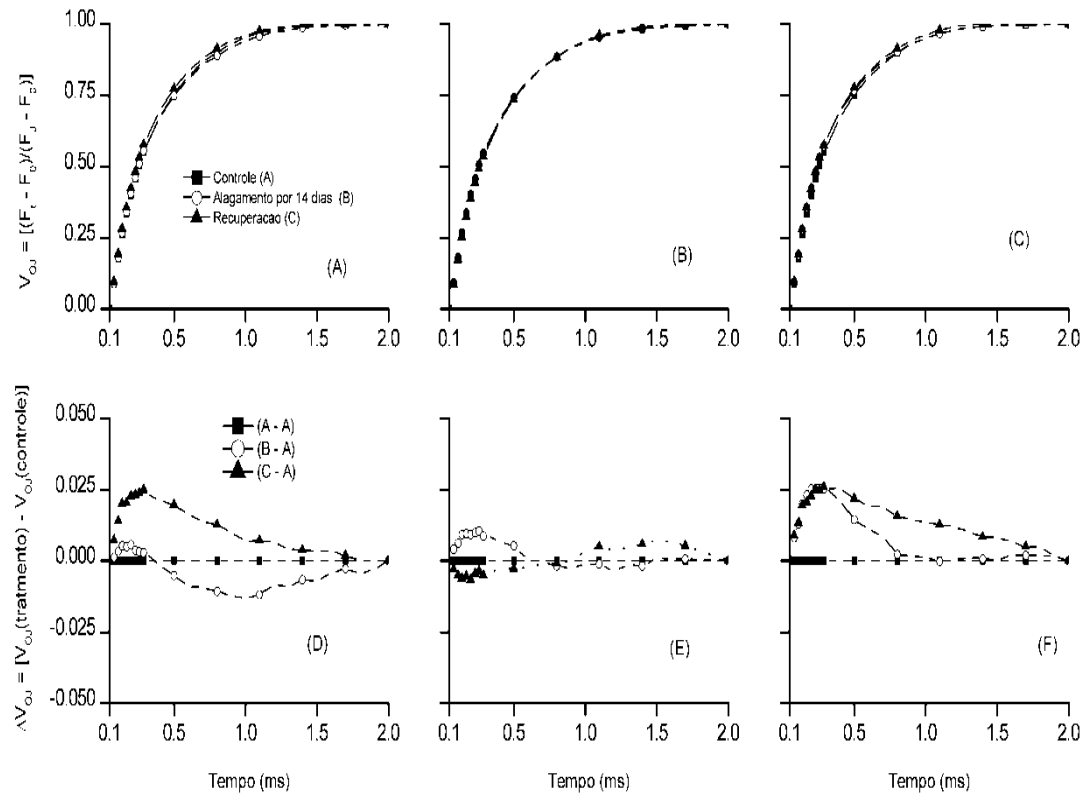


Figura 6. Fluorescência transiente OJIP das clorofilas de plantas de tomate 'Micro Tom' submetidas a condições normais de irrigação, 14 dias de alagamento e sete dias de alagamento com sete dias de recuperação. (A-C) fluorescência variável entre os passos O e J [$V_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$] (D-F) diferença cinética de V_{OJ} [$\Delta V_{OJ} = (V_{OJ}(\text{tratamento})) - (V_{OJ}(\text{controle}))$]. (A e D) genótipo selvagem, (B e E) genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, (C e F) genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22.

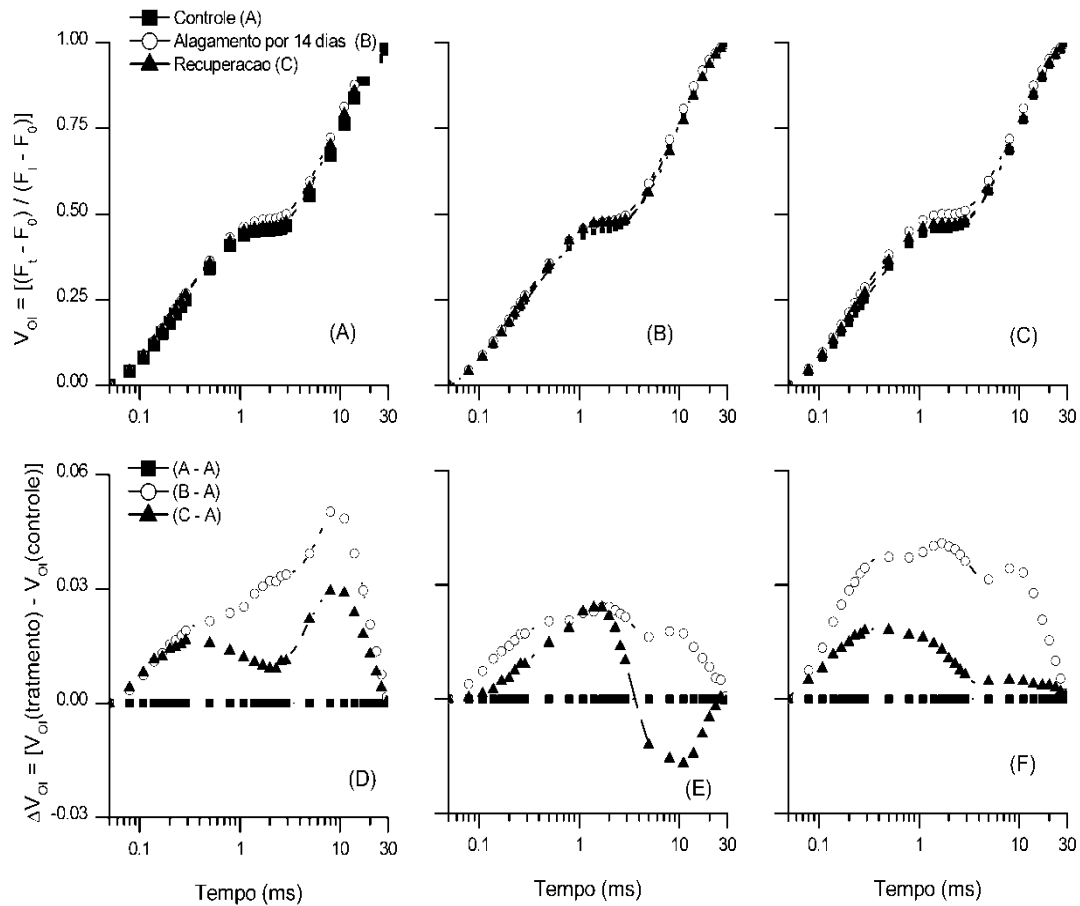


Figura 7. Fluorescência transiente OJIP das clorofilas de plantas de tomate 'Micro Tom' submetidas a condições normais de irrigação, 14 dias de alagamento e sete dias de alagamento com sete dias de recuperação. (A-C) fluorescência variável entre os passos O e I [$V_{OI} = (F_t - F_0) / (F_I - F_0)$]; (D-F) diferença cinética de V_{OI} [$\Delta V_{OI} = (V_{OI} \text{ (tratamento)}) - (V_{OI} \text{ (controle)})$]. (A e D) genótipo selvagem, (B e E) genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, (C e F) genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22.

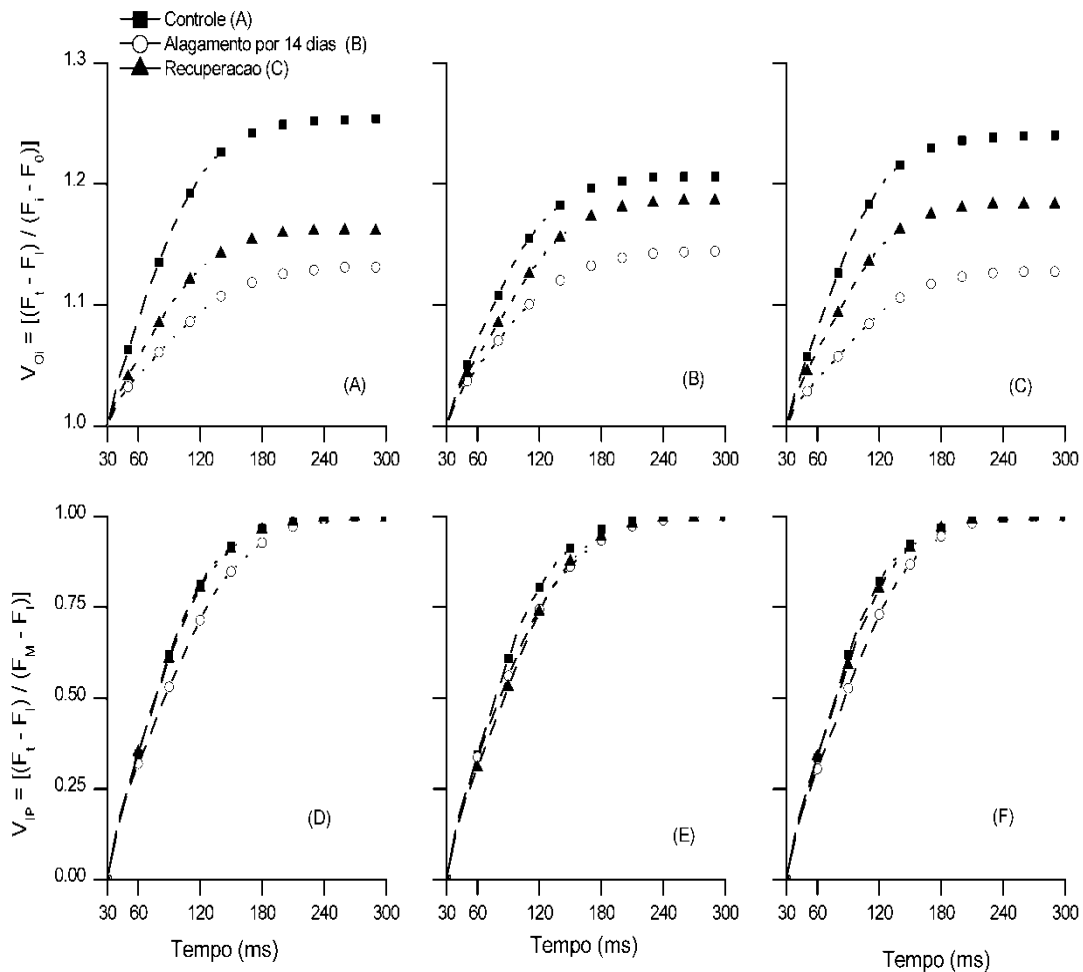


Figura 8. Fluorescência transiente OJIP das clorofilas de plantas de tomate 'Micro Tom' submetidas a condições normais de irrigação, 14 dias de alagamento e sete dias de alagamento com sete dias de recuperação. (A-C) fluorescência variável entre os passos O e I [$V_{OI} = (F_t - F_0) / (F_1 - F_0)$], para $V_{OI} \geq 1$; (D-F) fluorescência variável entre os passos I e P [$V_{IP} = (F_t - F_1) / (F_M - F_1)$]. (A e D) genótipo selvagem, (B e E) genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, (C e F) genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22.

A interpretação da fluorescência variável relativa entre os passos I e P (V_{IP}) possibilita a comparação das constantes globais de taxas de redução do *pool* de aceptores finais de elétrons do FSI (YUSUF et al., 2010), sendo que quando $V_{IP} = 0,5$ é definida a meia-vida de forma que o inverso do tempo, para atingir $V_{IP} = 0,5$, é uma estimativa da taxa global de redução dos aceptores de elétrons do FSI. Admitindo esta afirmativa, no presente experimento não se visualizou diferenças marcantes na taxa global de redução dos aceptores finais de elétrons nas plantas

submetidas ao alagamento quando comparadas aos valores apresentados no controle, sendo que também não se evidencia diferenças entre os genótipos.

3.4 Trocas gasosas

A taxa assimilatória líquida do CO_2 (A) (Figura 9 A-C) reduziu sob condições de alagamento em todos os genótipos, sendo a redução mais marcante logo no início do estresse, aos três dias de alagamento. Contudo, para as plantas do genótipo selvagem e com elevada expressão da MT-sHSP22, após o sétimo dia de alagamento, a fotossíntese líquida aumentou para valores próximos ao controle. Fato este não observado para as plantas com baixa expressão da MT-sHSP22, que apresentaram redução tempo-dependente sob condição de alagamento. A retirada das plantas do alagamento (recuperação), inicialmente (três dias de recuperação) não indicou aumento na taxa assimilatória líquida, contudo aos sete dias de recuperação observou-se um incremento acentuado em A , podendo indicar que um estresse anterior pode provocar uma alteração metabólica que resulte na recuperação da fixação do CO_2 .

A condutância estomática (Figura 9 D-F) para as plantas dos genótipos selvagem e com baixa expressão da MT-sHSP22 não foi afetada pelo alagamento, diferentemente, do observado para as plantas com elevada expressão da MT-sHSP22, que apresentaram até o 10º dia de alagamento condutância estomática menor nas plantas alagadas. Apenas aos 14 dias de alagamento as plantas do genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22 apresentaram condutância estomática menor sob condições de alagamento. Em termos de eficiência de carboxilação (Figura 8 G-I), observou-se comportamento semelhante ao observado para a taxa assimilatória líquida, sendo que a redução na relação A/C_i indica que as reações bioquímicas da fotossíntese foram afetadas, o que acarreta limitações de origem não estomática (CORNIC et al., 1992).

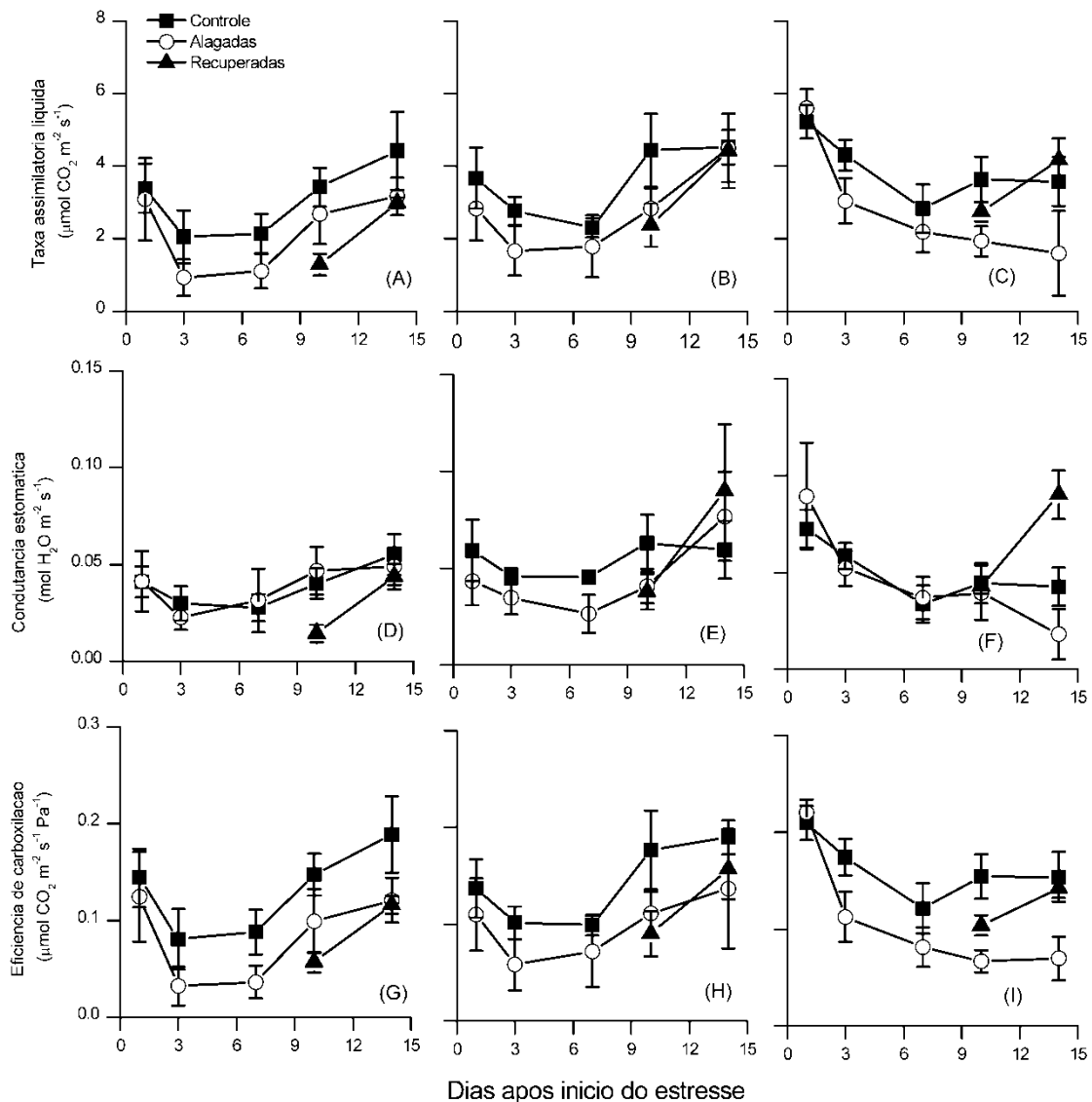


Figura 9: Taxa assimilatória líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (A-C), condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (D-F) e eficiência de carboxilação ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) (G-I) de plantas de tomate 'Micro-Tom' cultivadas sob diferentes condições de nível de água (controle, alagadas por sete dias, alagadas por sete dias e recuperadas por sete dias). (A, D e G) genótipo selvagem, (B, E e H) genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, (C, F e I) genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22. Barra indica erro padrão da média.

3.5 Parâmetros de crescimento

Os parâmetros de crescimento (área foliar, massa seca total e razão entre massa seca da parte aérea e raízes) avaliados ao final do experimento são apresentados na Tabela 2. Os genótipos selvagem e com baixa expressão da MT-sHSP22 apresentaram comportamentos semelhantes, pois exibiram diferenças significativas quanto a área foliar, sendo que as plantas controle apresentaram maior

área foliar por planta. Contudo, as plantas do genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22 não apresentaram efeito do alagamento sobre a área foliar.

Com relação à massa seca total, somente as plantas do genótipo baixa expressão da MT-sHSP22 foram influenciadas pelo alagamento. Entretanto, este genótipo não apresentou diferença na razão massa seca da parte aérea/raízes em relação ao controle, pois assim como houve redução da massa seca da parte aérea, houve redução da massa seca da raiz também, não apresentando desta forma diferença estatística entre os tratamentos. Já os demais genótipos diferiram estatisticamente, comportando-se ambos de modo similar, pois as plantas alagadas apresentaram maior incremento na parte aérea do que nas raízes, e as plantas controles e recuperadas de ambos os genótipos apresentaram uma diminuição mais acentuada neste componente, proporcionando mais massa seca para a raiz e menor acréscimo de massa seca na parte aérea.

Tabela 2: Variáveis de crescimento, medidas aos quatorze dias de alagamento, de plantas de tomate 'Micro Tom', tipo selvagem, com elevada expressão da HSP mitocondrial MT-sHSP22 e com baixa expressão da MT-sHSP22, submetidas a condições normais de irrigação, 14 dias de alagamento e sete dias de alagamento com sete dias de recuperação.

Genótipo	Tratamento	Área foliar (cm ² planta ⁻¹)	Massa seca total (g planta ⁻¹)	Razão entre massa seca da parte aérea e raízes
Selvagem	Controle	256 ± 16 a *	1,30 ± 0,15 a	6,4 ± 0,9 b
	Alagada	147 ± 15 b	1,02 ± 0,10 a	9,6 ± 1,3 a
	Recuperada	157 ± 13 b	1,06 ± 0,05 a	6,1 ± 0,3 b
com elevada expressão da MT-sHSP22	Controle	218 ± 17 a	1,29 ± 0,08 a	6,0 ± 0,7 b
	Alagada	198 ± 14 a	1,28 ± 0,05 a	10,0 ± 1,0 a
	Recuperada	233 ± 21 a	1,28 ± 0,10 a	6,4 ± 1,1 b
com baixa expressão da MT-sHSP22	Controle	250 ± 24 a	1,07 ± 0,09 a	5,3 ± 0,8 a
	Alagada	103 ± 27 c	0,64 ± 0,07 b	5,6 ± 1,2 a
	Recuperada	164 ± 15 b	1,08 ± 0,07 a	4,0 ± 0,9 a

* medias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste Tukey (p<0.05) dentro de cada genótipo. Media ± erro padrão da média (n=5)

4. DISCUSSÃO

O alagamento é conhecido por afetar o crescimento e a produção das plantas (HORCHANI et al, 2008), porém o efeito é variável entre diferentes genótipos. Foi observado, no presente trabalho, que quando as plantas foram submetidas ao alagamento, houve uma redução significativa da área foliar para os genótipos selvagem e com baixa expressão da MT-sHSP22, associado à redução da matéria seca total no genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22 sendo que este genótipo apresentou uma elevação na razão entre a massa seca da parte aérea e massa seca das raízes, fato atribuído à redução da massa seca das raízes. Assim, pode-se inferir um grau de tolerância às plantas que apresentam elevada expressão da MT-sHSP22 ao alagamento, corroborando com as afirmativas que genótipos que apresentam alta HSP podem suportar mais adequadamente a diferentes estresses.

As causas da redução do crescimento das plantas sob condição de alagamento podem ser as mais diversas. O principal efeito da inundação do solo é diminuir a velocidade de transferência de oxigênio para as raízes (HORCHANI et al, 2009), o que resulta em um processo de degradação e morte de uma parte dos tecidos da raiz. Isto leva à respiração anaeróbica, limitando o crescimento das raízes e posteriormente da parte aérea. Varias explicações são sugeridas para a redução da respiração celular radicular: i. redução da produção de fotoassimilados pela fotossíntese, ii. alteração na integridade das mitocôndrias (LIAO e LIN, 2001), iii. a diminuição da absorção e transporte de íons através das raízes (HORCHANI et al, 2009), demonstrando assim que as limitações no crescimento da planta pelo estresse não pode ser atribuído a um único processo fisiológico, mesmo que a fotossíntese seja o processo fisiológico dominante.

A relativa redução na biomassa de raízes e da mudança na alocação de metabólitos para a parte aérea durante a inundação é provavelmente o resultado de uma adaptação metabólica destinada para diminuir a demanda de oxigênio pelo sistema radicular (SOUZA e SODECK, 2002).

Deve ser destacado o fato que nas plantas do genótipo com elevada expressão de MT-sHSP22 foi identificado a aparecimento de raízes adventícias a partir do 10º dia de alagamento (Figura 10), apresentado indícios de que tais raízes possam ser uma alternativa para a sua maior tolerância frente ao estresse por

alagamento, visto que os demais genótipos não apresentaram tais estruturas. Horchani et al. (2008), salientam que as alterações morfológicas nas raízes (por exemplo, a formação de raízes adventícias e aerênquima) têm sido frequentemente observada em condições de alagamento o que permite aumento na circulação de oxigênio no interior das raízes (HORCHANI et al, 2009). Alguns autores mostraram que a presença de raízes adventícias em milho e em outras plantas podem favorecer a aeração e a absorção de água e nutrientes em regiões em que as raízes têm sido severamente afetadas, favorecendo, assim, a exploração do solo e a tolerância ao encharcamento (VODNIK et al. 2009).



Figura 10: Representante do genótipo com elevada expressão de MT-sHSP22, demonstrando as raízes adventícias, presentes a partir do 10º dia de alagamento.

Horchani et al (2008) mostram que em hipóxia na cultivar Micro-Tom de tomate, as raízes pré-existent das plantas pararam de crescer, na primeira semana de estresse e as raízes principais alteraram sua coloração normal. No entanto, as raízes adventícias são formadas e devido à proximidade com a atmosfera, essas raízes provavelmente tiveram um melhor acesso ao oxigênio. Para Mattos et al. (2005), a diminuição da disponibilidade de oxigênio e fotossintatos levam à detenção do crescimento e à deterioração progressiva das raízes principais.

No presente trabalho observaram-se ao longo do estresse por alagamento uma epinastia das folhas, uma ligeira clorose das folhas mais velhas, murcha, senescência e queda das folhas mais velhas bem como uma diminuição na atividade fotossintética. Essa redução pode ser parcialmente explicada pela diminuição em alguns momentos, no conteúdo de clorofila devido à hipoxia da raiz e sugere-se que a ação do etileno seja o principal processo responsável pelas modificações morfo-anatômicas observadas em caules e folhas a fim de tolerar estresse por hipoxia, a planta pode ainda sofrer ajustes bioquímicos, alterações em rotas metabólicas e hormonais (SOUZA e SODEK, 2002). O alagamento pode afetar a síntese e/ou transporte de citocininas (BAKER e ROSENQVIST, 2004), ou mesmo a produção de ácido abscísico nas raízes e posterior transporte para folhas (HORCHANI et al, 2010).

Vários estudos têm mostrado que o alagamento do solo é normalmente capaz de diminuir de forma significativa a capacidade fotossintética em plantas intolerantes a esse estresse (SOUZA e SODEK, 2002). Vários fatores podem levar a redução na atividade fotossintética sob condições de alagamento, sendo que a redução na abertura estomática, segundo Dias-Filho e Carvalho (2000) seria a principal causa da queda na capacidade fotossintética em plantas alagadas, fato não evidenciado no presente trabalho. Porém, Souza e Sodek et al, (2002) indicam que a redução da atividade fotossintética sob alagamento pode ser atribuída ao menor potencial hídrico das folhas, a baixas atividades de enzimas fotossintéticas, a redução no transporte de fotoassimilados, ou mesmo ao menor teor de clorofila. Há relatos na literatura que o surgimento de raízes adventícias, como um novo dreno para os fotoassimilados, explique a manutenção da abertura dos estômatos e da taxa transpiratória sob estresse, ainda que às custas de razoável desidratação dos tecidos foliares (MATTOS et al, 2005).

No presente trabalho a queda da taxa fotossintética foi mais relacionada à eficiência de carboxilação, indicativo que limitações não estomáticas foram preponderantes em afetar a fotossíntese. Neste sentido, Liao e Lin (2001) indicam que fatores metabólicos como o acúmulo de amido nas folhas também têm sido apontado como responsável pela diminuição da fotossíntese durante o alagamento do solo, causado pela redução da taxa de translocação de carboidratos das folhas para as raízes e diminuição do crescimento e das atividades metabólicas das raízes.

O alagamento impôs diferentes respostas dos genótipos em relação aos teores de clorofila, sendo descrito na literatura que um dos primeiros sintomas do estresse por alagamento é a diminuição da concentração de clorofila das folhas, resultando em clorose (NAUMANN et al. 2008, MATTOS, et al. 2005), sendo que existe uma variação intra e inter-específica na redução dos teores de clorofila em resposta ao alagamento (SMETHURST e SHABALA, 2003). Naumann et al. (2008) destacam que mudanças no conteúdo de clorofila são um indicador de estresse, mas estas mudanças ocorrem frequentemente após sinais visíveis de estresses. No presente experimento, o índice de clorofila das plantas estressadas mostrou-se inferior em relação ao controle, sendo que os genótipos selvagem e com baixa expressão da MT-sHSP22 foram os que mais reduziram os teores de clorofila ao longo do estresse.

A resposta fotossintética sob condição de alagamento observada no presente trabalho é evidenciada pelas alterações na absorção e eficiência de aproveitamento da energia luminosa entre os genótipos estudados, detectadas pelas mudanças nos parâmetros de fluorescência das clorofilas.

As medições da fluorescência da clorofila *a*, permitem uma ampla aplicação em estudos fotossintéticos (BUSSOTTI et al. 2010) e esses parâmetros podem ser usados com sucesso para detectar um número diferente de perturbações metabólicas em folhas de muitas espécies (BAKER e ROSENQVIST, 2004), servindo como uma sonda intrínseca do destino da energia de excitação do FSII (STRASSER e TSIMILLI-MICHAEL, 2001). Os parâmetros resultantes da interpretação correta da cinética de emissão de fluorescência trazem informações sobre as condições da estrutura, da conformação e da função do FSII (CHEN et al, 2011). O sinal de fluorescência é fortemente afetado pelo estado do FSII, nos centros de reação, que são os complexos de pigmentos que catalisam a principal reação fotoquímica do FSII, transformando a energia de excitação em energia redox que é canalizada para eles a partir do FSII (MAXWELL e JOHNSON, 2000, STRASSER e TSIMILLI-MICHAEL, 2001).

A interpretação dos parâmetros do Teste JIP, originados a partir da cinética de emissão de fluorescência, no presente trabalho, indica que o alagamento provocou alterações na absorção e aproveitamento da energia luminosa pela cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese, sendo mais marcantes para os genótipos selvagem e com baixa expressão da MT-sHSP22. Em relação ao controle o efeito do

alagamento pode ser mais acentuado nos parâmetros que descrevem a oxidação e redução dos aceptores de elétrons do FSII (S_m e N), resultando em uma diminuição no total de transportadores de elétrons, por centro de reação, apresentando assim um déficit na redução da Q_A . De acordo com Stirbet e Govindjee (2011), S_m é proporcional ao número de elétrons passando através da cadeia de transporte de elétrons, com $N = S_m/S_s$ (onde S_s representa a área normalizada para um volume de eventos), ou seja, o número de vezes que Q_A torna-se reduzida e re-oxidada novamente, até o máximo de intensidade da fluorescência F_M sendo alcançada (ou seja, o número do volume de eventos), sendo este parâmetro afetado pelo estresse, pois apresentou uma redução ao longo do alagamento, reduzindo desta forma o total de transportadores de elétrons.

Em relação aos parâmetros que descrevem os fluxos específicos de energia por centro de reação o parâmetro em relação ao fluxo de redução do acceptor final de elétrons do FSI (RE_0/RC) sofreu as maiores variações devido ao estresse por alagamento em todos os genótipos, porém em menor intensidade para o com elevada expressão da MT-sHSP22. Tais alterações resultaram em diminuição em relação ao controle dos parâmetros ϕ_{R0} e δ_{R0} , demonstrando um efeito marcante do alagamento sobre a atividade do FSI.

Considerando que os índices de performance (PI_{ABS} e PI_{total}) são produtos de termos que expressam potenciais parcial para a conservação de energia nas bifurcações seqüenciais dos fótons absorvidos pelo FSII para a redução de aceptores de elétrons intersistema e para a redução dos receptores de final FSI, respectivamente (TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2008, STRASSER et al, 2010, YUSUF et al., 2010), estes parâmetros tem sido propostos como os mais eficientes para quantificar estresses em plantas.

O parâmetro PI_{ABS} diminuiu ao longo dos dias de estresse por alagamento, e que conforme Strasser et al, (2010), uma redução grande dos valores PI_{ABS} pode ser atribuída à mudança de um, dois ou três parâmetros, que demonstra uma rápida redução da eficiência da reação redox na cadeia de transporte de elétrons. Mas o efeito do alagamento foi mais visível, no parâmetro PI_{total} , pois apresentou uma redução maior, pois expressaram pouca conservação de energia com o transcorrer, e que de acordo com Yusuf et al, (2010), quando este parâmetro mostra perda, significa que houve uma “tensão” negativa sobre o sistema. Mas vale destacar que entre as comparações dos genótipos, o genótipo que mais manteve o fluxo de

energia até o FSI, ao longo do estresse foi o com elevada expressão de MT-sHSP22, sugerindo assim que a alta expressão desta proteína, bem como a sua função frente a mecanismos estressores, pode estar envolvido em respostas, que visem à tolerância em relação a este estresse (SIDDIQUE et al. 2008).

A redução dramática da PI_{total} , não só resulta da perda de atividade FSII, mas também contra os danos da estrutura e função FSI. A fase de IP da curva OJIP está relacionada com transferência de elétrons através FSI e a diminuição de um congestionamento de elétrons causada por um bloco transitório no lado acceptor do FSI devido à inativação de ferredoxina NADP⁺ redutase (STRASSER et al, 2010 apud SCHANSKER et al. , 2005).

Para a análise da fluorescência transiente OJIP, foram realizadas normalizações e subtrações que permitiu a detecção de bandas entre os passos O e P. Estas banda fornecem uma riqueza de informações sobre a presença e função dos mecanismos que regem importantes propriedades fotossintéticas funcionais. A análise conjunta das bandas identificadas permite identificar diferenciação no efeito do alagamento para os genótipos estudados. Sendo o mesmo mais acentuado para os genótipos com baixa expressão de MT-sHSP22 e no genótipo selvagem, sendo menos acentuado o efeito do alagamento sobre o genótipo com elevada expressão de MT-sHSP22.

Através destas normalizações pode-se observar e identificar a banda-L positiva, presente em todos os genótipos estudados, e após a recuperação somente no genótipo com elevada expressão de MT-sHSP22, foi identificada a referida banda de forma negativa, sendo assim, ocorreu uma melhor utilização da energia de excitação, demonstrando de forma eficiente a recuperação para tal genótipo.

A presença desta banda-L positiva revelou que a conectividade e a transferência energética entre as unidades do FSII foi menor em todos os genótipos, resultando em diminuição na utilização da energia de excitação e uma maior estabilidade do sistema (YUSUF et al, 2010). Desta maneira o efeito do alagamento produziu uma perda na conectividade entre as unidades do FSII, sendo destacado também por Strasser e Stirbet (1998) que pode haver uma desorganização na estrutura das membranas dos tilacóides sob condição de estresse.

A fluorescência normalizada entre os pontos O (50 μ s) e J (2 μ s) permitiu identificar a banda-K (ao redor de 300 μ s), a qual é normalmente é observada em plantas submetidas a estresse por elevação da temperatura, contudo, sob estresse

de alagamento ela também foi verificada neste experimento, principalmente para as plantas alagadas com baixa expressão da MT-sHSP22. Segundo Yusuf et al., (2010), o aparecimento da banda-K positiva reflete uma inativação do complexo de evolução do oxigênio (especialmente do complexo Mn) e/ou um aumento do tamanho da antena funcional do FSII.

O estresse por alagamento não apresentou efeito sobre o genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, pois as plantas deste genótipo não apresentaram a banda-K em nenhum tratamento, exibindo assim, uma estabilidade no complexo de liberação do oxigênio, sugerindo assim que pela elevada expressão destas proteínas, ou de alguma forma este genótipo tenha obtido mais tolerância a esse estresse.

Em relação à avaliação da fase O-I, que serve para distinguir a sequência de eventos da captura do éxciton pelo FSII, até a redução de plastoquinona (PQ) (YUSUF et al. 2010), e os genótipos que mais exibiram alterações nessa fase, foram os genótipos com baixa expressão da MT-sHSP22 e o selvagem, sugerindo assim que a maior expressão das HSP pode estar correlacionada com tolerância frente a este estresse, visto que não apresentou limitação na redução da plastoquinona, conseguindo transferir em grande parte os elétrons para o complexo citocromo b_{6f} .

A diferença cinética entre os pontos I e P (30 ms para cerca de 300 ms), revela modificações no fluxo de elétrons da plastoquinol (PQH₂) para o acceptor final de elétrons do FSI (YUSUF, et al. 2010). Com base nos resultados do presente trabalho, observa-se que a indução do estresse por alagamento reduziu o tamanho do pool de aceptores de elétrons do FSI, para todos os genótipos estudados, sendo menos marcante para o genótipo com elevada expressão de MT-sHSP22, sugerindo assim que houve uma redução no rendimento fotoquímico.

5. CONCLUSÕES

O efeito mais marcante do alagamento sobre a cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese está relacionado à inativação do complexo de evolução de oxigênio, da perda da conectividade entre as unidades do fotossistema II, da oxidação-redução do pool de plastoquinona, e da atividade do fotossistema I.

Baseado nos índices de performance, curvas de cinética da fluorescência, trocas gasosas e parâmetros de crescimento, observou-se que os diferentes genótipos de tomate cultivar Micro-Tom testados, demonstraram comportamentos distintos em resposta ao alagamento do solo, mas o genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22 foi o menos sensível ao estresse, pois sugere-se assim que as proteínas de choque térmico mitocondrial (MT-sHSP22) podem proporcionar uma ampla variedade de reações e respostas frente ao estresse.

CAPITULO 2

ESTRESSE ABIÓTICO EM PLANTAS TRANSFORMADAS E NÃO TRANSFORMADAS DE TOMATE ‘MICRO-TOM’ COM DIFERENTES EXPRESSÃO DA sHSP22 MITOCONDRIAL: 2. EFEITO DE CICLOS DE ALTA E BAIXA TEMPERATURA

Abiotic stress in plants transformed and untransformed Micro-Tom tomato with different expressions of mitochondrial sHSP22: 2. effect of cycles of high and low temperature

RESUMO

Avaliou-se o efeito de estresse por baixa e alta temperatura em plantas de tomate cv. Micro-Tom transformadas para diferentes níveis de HSPs mitocondrial (MT-sHSP22). Plantas de três genótipos de tomate cv. Micro-Tom (não transformadas, com elevada expressão de HSP22 e com baixa expressão de MT-sHSP22) foram cultivadas em condições controladas de temperatura, fotoperíodo e densidade de fluxo de fótons. Quando as plantas apresentavam 59 dias foram submetidas a estresse térmico por período de 24h a 10°C ou 37°C, em câmaras de crescimento e a seguir as plantas foram transferidas para as condições iniciais por 24h, após este período foram novamente submetidas a novo ciclo de estresse e recuperação. Foi determinada a emissão de fluorescência das clorofilas e a partir das intensidades de fluorescência foram calculados os parâmetros do Teste JIP. Também se avaliou as trocas gasosas. A interpretação dos parâmetros do Teste JIP possibilitou identificar que os três genótipos apresentam comportamento distinto principalmente sobre estresse de alta temperatura, sendo que as plantas dos genótipos com alta MT-sHSP22 e não transformado apresentaram elevação nos parâmetros relacionados à atividade do fotossistema I. Quando as plantas foram submetidas ao estresse por baixa temperatura, estes mesmos genótipos demonstraram um incremento no fluxo de energia por centro de reação. Em relação à taxa assimilatória líquida de CO₂, para as plantas submetidas à baixa temperatura, esta reduziu após o estresse, mas depois com a recuperação todos os genótipos retornaram próximos aos controles. Já para as plantas submetidas a altas temperaturas o genótipo selvagem e com alta expressão de MT-sHSP22, demonstraram aumento em relação ao controle e no genótipo com baixa expressão de MT-sHSP22, já no primeiro ciclo de estresse, reduziu a sua taxa assimilatória líquida de CO₂. Estes resultados sugerem que o

genótipo não transformado e com aumento na expressão das MT-sHSP22 mitocondrial podem apresentar mecanismos de tolerância aos estresses térmicos, principalmente alta temperatura.

Palavras-chave: fluorescência das clorofilas, teste JIP, trocas gasosas, estresse.

ABSTRACT - We evaluated the effect of low stress and high temperature in tomato plants cv. Micro-Tom transformed into different levels of mitochondrial HSPs (MT-sHSP22). Plants of three tomatoes genotypes cv. Micro-Tom (not processed, with high expression of HSP22 and low expression of MT-sHSP22) were grown under controlled conditions of temperature, photoperiod and flux density of photons. When the plants were 59 days, they were submitted to thermal stress for a period of 24 hours of 10°C or 37°C in growth chambers and, then, the plants were transferred to the initial conditions for 24 hours. After this period, they were again submitted to a new cycle of stress and recovery. The chlorophyll fluorescence emission was determined and, from the fluorescence intensities, were calculated parameters of the JIP test. The gas exchange was also assessed. The interpretation of the JIP test parameters allowed the identification that the three genotypes exhibit different behavior, mainly on high-temperature stress, and the plants of high MT-sHSP22 genotypes and unprocessed ones showed an increase in the parameters related to photosystem I activity. When plants were subjected to stress by low temperature, these same genotypes showed an increase in the flow of energy per reaction center. Concerning the CO₂ assimilation rate for plants subjected to low temperatures, it was reduced after stress, but then, with all genotypes recovery, they returned close to the controls. As for the plants submitted to high temperatures, the wild and with high expression of MT-sHSP22 genotype showed increase compared to control and genotype with low expression of MT-sHSP22, already in the first cycle of stress, the assimilation rate liquid CO₂ was reduced. These results suggest that non-transformed genotypes and with increased expression of MT-sHSP22 mitochondrial mechanisms may show tolerance to thermal stresses, particularly high temperature.

Keywords: chlorophyll fluorescence, JIP test, gas exchange, stress.

1. INTRODUÇÃO

Muitos estresses podem afetar o desenvolvimento e crescimento de diversas plantas. Dentre os estresses abióticos, o estresse térmico induz várias alterações metabólicas, podendo levar ao encurtamento no ciclo de vida das plantas por inúmeras perturbações em processos metabólicos. A resposta a qualquer estresse pode ser reversível ou não, dependendo do nível de estresse ou mesmo de processos de adaptação. Entre os processos fisiológicos, a fotossíntese é o mais sensível ao estresse térmico, ocorrendo a sua inibição quando as plantas são submetidas a temperaturas acima da temperatura ótima de crescimento

(ALLAKHVERDIEV et al, 2008). Considerando a maquinaria fotossintética, o fotossistema II (FSII) tem sido relatado como o ponto de principal efeito das altas temperaturas (BERRY e BJÖRKMAN, 1980), contudo há relatos que outros componentes podem ser afetados pelas altas temperaturas, como inativação dos centros de reação do FSII (BUKHOV, et al. 1990), e transferência de elétrons entre Q_A e Q_B (DUCRUET e LEMOINE, 1985).

Alterações ambientais na temperatura, luz, água ou balanço hormonal levam a modificação da expressão gênica nas plantas (VIERLING, 1991). Em nível molecular, uma das respostas ambientais melhor caracterizadas é a resposta a alta temperatura ou aumento na quantidade das proteínas “heat shock” (HSP). O mesmo autor indica que quando as plântulas são submetidas à temperatura acima de cinco graus da temperatura ótima de crescimento, a síntese das principais proteínas e mRNA é inibida, enquanto que a transcrição e tradução de um pequeno conjunto de HSP é iniciada. Tais proteínas apresentam como função a prevenção da agregação irreversível de outras proteínas e a promoção do correto enrolamento das proteínas depois do início do estresse. Contudo, é salientado na literatura que não é apenas o estresse térmico que induzem a síntese destas proteínas, sugerindo a denominação de proteínas de estresse, mas devendo ser esta interpretação cuidadosa. Woronuk et al. (2010) sugerem que o frio pode induzir a expressão de várias proteínas em *Phaseolus angustissimus* e *Phaseolus vulgaris* apresentando tolerâncias diferentes em função da manutenção da homeostase na atividade transcricional de genes sob condições de baixa temperatura.

Várias evidências sugerem que a mitocôndria pode regular a resposta celular aos estresses (ARNHOLDT-SCHMITT et al., 2006), desta forma o estudo da expressão diferencial de genes mitocondriais em resposta a estresse é de grande importância para elucidação de processos ligados a adaptação a diversos estresse. Aken et al. (2009) concluíram em estudos com *Arabidopsis thaliana* que as mudanças nas proteínas responsivas ao estresse não é bem correlacionada com mudança a nível transcricional, e eles sugerem que mecanismos pós-transcricional também tem um papel importante na definição da resposta mitocondrial ao estresse.

Estudos desenvolvidos por Preczewski et al. (2000) mostram que em nove genótipos de *Lycopersicon* estudados há uma grande variação na termotolerância da taxa assimilatória líquida e na produção de HSP70, HSP60 e HSP24 cloroplastídicas e HSP70 citossólica em resposta ao estresse por calor, concluindo

que a variação natural na produção de HSP é correlacionada com a variação na termotolerância fotossintética, mas somente para certas pequenas proteínas “heat shock” (sHSP).

Há relatos da existência de várias proteínas “heat-shock” cloroplastídicas de baixa massa molecular (sHSP) localizadas na membrana de tilacóide, associadas ao complexo de liberação de oxigênio, e protegem, mas não reparam, danos ao fotossistema II durante o estresse térmico (PRECZEWSKI et al., 2000).

Tem sido relatado na literatura que as plantas apresentam uma rede complexa de defesa para suportar definidos estresses por alta temperatura, onde as HSPs podem ter um papel central na rede de resposta a este tipo de estresse (BANIWAL et al, 2004). Contudo Han et al (2009) indicam, por análise proteômica de plântulas arroz submetidas a diferentes temperaturas (26, 35, 40 e 45°C), que a resposta da expressão das proteínas é temperatura-dependente, indicando que diferentes estratégias são adotadas em diferentes níveis em alta temperatura. Sendo que em 35°C alguns mecanismos protetores da maquinaria fotossintética são ativados, enquanto que a 40°C as rotas antioxidantes são preferências, sugerindo também que o estresse entre 35 e 40°C podem induzir as HSP.

Considerando que a fotossíntese é um dos principais processos afetados pelo estresse térmico, estudos que caracterizem as respostas de diferentes plantas são necessários. Várias são as técnicas utilizadas para avaliar o processo fotossintético, destacando-se a análise da cinética de emissão de fluorescência da clorofila.

Medidas de fluorescência da clorofila *a* são amplamente utilizados em estudos do aparato fotossintético, dos efeitos de fatores externos afetando a fotossíntese, bem como o estudo da produtividade de organismos fotossintéticos. Sendo Baker e Rosenqvist (2004), as mudanças na emissão da fluorescência da clorofila são indicações de alterações na atividade fotossintética, sendo que a eficiência do transporte de elétrons através do FSII e a eficiência de operação deste está correlacionados à assimilação de CO₂, sendo assim uma excelente forma de examinar o desempenho fotossintético e fisiológico das plantas.

Estudos mostraram que em folhas submetidas a altas temperaturas ocorre o aparecimento de um ponto adicional K (STRASSER, 1997; POSPÍŠIL e DAU, 2000) na curva de cinética de emissão de fluorescência transiente OJIP. Foi observado que o ponto K surgia aos 300 µs e provavelmente estaria relacionado aos eventos

de inibição do lado doador de elétrons do FSII ligado ao complexo de evolução do oxigênio. Esse novo ponto corresponderia à resposta a condições de estresse tais como salinidade, déficit hídrico, temperatura e luminosidade (STRASSER, 1997; KOUŘIL et al., 2001; CHEN et al., 2004; LAZÁR, 2006). Contudo, em algumas situações, o surgimento do ponto K pode refletir na total supressão dos pontos I e J, além de grandes variações na amplitude do ponto P (STRASSER, 1997; POSPÍŠIL e DAU, 2000; MISRA et al., 2001; BUKHOV et al., 2003; PANDA et al., 2006).

Inúmeros trabalhos são relatados na literatura mostrando que a correta interpretação de variações na cinética de emissão de fluorescência são respostas a diferentes estresses abióticos como por déficit hídrico (SKOTNICA et al., 2000), por encharcamento (PANDA et al., 2006), por deficiências nutricionais (LU et al., 2001), por níveis de irradiância (RICHARDS et al., 2003), por exposição à radiação ultravioleta (KRIZEK et al., 2001), por salinidade (MISRA et al., 2001; CHEN et al., 2004), por metais pesados e resíduos químicos no solo (DAUGHTRY et al., 1995) e por baixas e altas temperaturas (KOUŘIL et al., 2004, BERTAMINI et al., 2005). Este estudos permitem: i. a elucidação do dano primário do estresse na fotossíntese, ii. grau diferencial de tolerância das plantas a diferentes estresses, iii. identificação de danos iniciais antes que os mesmos sejam visíveis.

Muitas plantas, inclusive o tomate requerem temperatura ideal de 22-30°C para o crescimento e desenvolvimento (OGWENO et al. 2009), porém apresentam sintomas de danos quando expostos a baixas temperaturas, e são principalmente, sensíveis a temperaturas abaixo de 10-15°C. Os sintomas do estresse e lesões induzidos nestas plantas aparecem entre 48-72 h, no entanto, esta duração varia de planta para outra e também depende da sensibilidade das plantas ao estresse de frio.

A performance fotossintética é significativamente reduzida abaixo de 18°C e cessa quase que completamente abaixo de 13°C, sendo afetada por praticamente todos os componentes fotossintetizantes, uma vez que a a baixa temperatura reduz a condutância estomática, provoca mudanças nos complexos de pigmentos e perdas de eficiência fotoquímica, restringe o transporte de elétrons através de modificações nas propriedades biofísicas do tilacóide lipídios, mudanças no metabolismo do carbono, alocação e particionamento (BATISTA-SANTOS et al. 2011).

As baixa temperaturas também pode causar um desequilíbrio na absorção energética e na utilização pelos sumidouros metabólicos, uma vez que reduz mais

as reações enzimáticas envolvidas no carbono, nitrogênio e enxofre do que a redução de processos fotofísicos e fotoquímicos envolvidos na transferência de energia de luz, absorção e transformação. No entanto, diminuições na eficiência de captura e no uso da energia luminosa pode acontecer, com o ocorre no FSII, sendo este reconhecidamente como um dos locais mais importantes da fotoinibição, que ocorre tanto no lado doador como no lado receptor do centro de reação.

A aclimação ao frio envolve, diversas alterações fisiológicas, incluindo alteração da composição de lipídios na membrana plasmática, acumulação de compostos protetores, como carboidratos, aminoácidos livres ou outros osmólitos e na expressão gênica (DAI et al 2007). De acordo com Rapacz (1999) a tolerância a baixas temperaturas está fortemente correlacionada com a capacidade de manter elevadas taxas de fotossíntese frente ao estresse, porque é indispensável assegurar uma fonte de energia durante aclimação ao frio.

. Objetivou-se no presente trabalho identificar através de análises fotossintéticas (fluorescência das clorofilas e trocas gasosas) o efeito de diferentes ciclos de temperaturas (10°C ou 37°C) em plantas de tomate cv. Micro-Tom com diferentes expressão da sHSP22 mitocondrial (MT-sHSP22)

2. MATERIAL E METODOS

2.1 Material vegetal e tratamentos

Sementes de tomate cv. Micro-Tom não transformadas (selvagem) e transformadas com cDNA da sHSP22 mitocondrial (MT-sHSP22), (gentilmente cedidas pelo Prof. Cesar Valmor Rombaldi – DCTA-FAEM-UFPEI), foram colocadas para germinar em gerbox no escuro a temperatura de 24°C. Quando as plântulas apresentavam 08 dias foram transplantadas para vaso plástico capacidade 0,5 kg contendo areia lavada como substrato, e mantidas em câmara de crescimento com condições controlada: temperatura de 21±2°C, fotoperíodo de 12h, densidade de fluxo de fótons em torno de 200 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa. Foi aplicada solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) meia força a partir de 14 dias após o transplante, e posteriormente foi elevada a força completa da solução nutritiva.

Quando as plantas apresentavam 59 dias após o transplante (estádio vegetativo pleno) foram aplicados os tratamentos que consistiram na transferência das plantas para condições de alta (37°C) ou baixa temperatura (10°C) por um período de 24 h (primeiro ciclo de estresse). A seguir as plantas retornaram para condições de temperatura de $21\pm 2^\circ\text{C}$ por 24h (primeira recuperação). Após a primeira recuperação as plantas foram novamente submetidas a um segundo ciclo de estresse nas mesmas temperaturas anteriores por 24h e posteriormente recuperadas a temperatura de $21\pm 2^\circ\text{C}$ (segunda recuperação). Os ciclos de estresses foram aplicados em câmaras de crescimento com fotoperíodo de 12 h e densidade de fluxo de fótons em torno de $50\ \mu\text{mol fótons m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa. As determinações de fluorescência transiente OJIP e trocas gasosas foram realizadas antes e imediatamente após cada ciclo de estresses/recuperação.

2.2 Fluorescência transiente OJIP, Teste JIP, Normalização e subtrações das curvas de fluorescência transiente

A fluorescência da clorofila *a* transiente OJIP foi medida nas primeiras folhas jovens completamente expandidas utilizando um fluorômetro portátil (Modelo Handy PEA, Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK). As medidas foram realizadas em folhas não destacadas previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos para oxidação completa do sistema fotossintético de transporte de elétrons. A emissão de fluorescência foi induzida em uma área de 4 mm de diâmetro da folha pela exposição da amostra a um pulso de luz vermelha (pico 650 nm) numa intensidade de cerca de $3.000\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$. As intensidades de fluorescência foram medida entre 50 μs e 1 s. As intensidades de fluorescência determinadas em: 50 ($F_{50\ \mu\text{s}}$), 100 ($F_{100\ \mu\text{s}}$), 300 ($F_{300\ \mu\text{s}}$) μs , 2 ($F_{2\ \text{ms}}$) e 30 ($F_{30\ \text{ms}}$) ms e F_m (fluorescência máxima), foram utilizadas para calcular os parâmetros de Teste JIP (Strasser e Strasser, 1995). Foi considerada a fluorescência inicial (F_0) a intensidade medida a 50 μs .

A partir destas intensidades de fluorescência medidas foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER e STRASSER, 1995), sendo que a interpretação adequada e correta dos referidos parâmetros deve ser realizada de forma cuidadosa, para que os dados analisados forneçam informações corretas sobre o comportamento e o fluxo de energia em diferentes níveis. Para o cálculo dos parâmetros do Teste JIP utilizou-se o software Biolyzer (gentilmente cedido pelo Dr.

Reto Strasser, Universidade de Genebra). A lista de parâmetros de fluorescência de importância relevante na presente dissertação se encontra na Tabela 1 (Capítulo 1).

Para comparação dos eventos refletidos nas fases OJ, OI e IP, as curvas transiente foram normalizadas como fluorescência variável relativa que permite a comparação do comportamento da cinética de emissão de fluorescência em relação ao controle, identificando efeitos em diferentes etapas do fluxo energético na cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese. As normalizações foram similares as descritas no primeiro capítulo.

2.3 Trocas gasosas

As trocas gasosas foram medidas na primeira folha superior madura, completamente expandidas com um analisador portátil a infra-vermelho de CO₂ (modelo LI-6400XT LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA). As medidas foram realizadas entre as 10:00 e 11:00hs, com concentração de CO₂ no interior da câmara de 380 mol mol⁻¹ e densidade de fluxo de fótons de 1.500 μmol m⁻² s⁻¹, utilizando-se a fonte luminosa LI-COR 6400-02, acoplada a câmara de medida. Entre outros parâmetros de trocas gasosas foi medida a taxa assimilatória líquida de CO₂ (A, μmol CO₂ m⁻² s⁻¹).

2.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado para cada estresse, sendo comparados os três genótipos e os ciclos de estresse/recuperação. Utilizou-se cinco repetições por tratamento, sendo que para as determinações de fluorescência transiente OJIP forma realizadas três medidas por tratamento, totalizando 15 determinações por tratamento. Os parâmetros de fluorescência foram normalizados em relação às determinações realizadas antes dos estresses (controle).

3. RESULTADOS

3.1 Efeito de ciclo de estresse de baixa temperatura

3.1.1 Fluorescência transiente da clorofila a: parâmetros biofísicos derivados do teste JIP

Os parâmetros biofísicos derivados das curvas de fluorescência transiente e alguns parâmetros do Teste-JIP (STRASSER e STRASSER, 1995) para as plantas submetidas a ciclos de temperatura de 10°C e posteriormente recuperadas para temperatura de 21°C são apresentados como gráfico radar. Todos os dados dos parâmetros de fluorescência foram normalizados para os dados de plantas mantidas a 21°C (controle), (Figura 1).

De maneira geral, para os três genótipos observou-se que o estresse de baixa temperatura provocou um aumento em S_m (área complementar total normalizada acima da curva transiente OJIP, refletindo eventos de múltiplos giros de redução de Q_A), sendo que após o período de recuperação os valores retornam aos observados para as plantas de controle. Contudo, S_s (área complementar total normalizada acima da curva transiente somente na fase OJ, refletindo eventos de simples giros de redução de Q_A) (CHEN et al. 2011) não foi afetado pelo estresse. 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) aumentou em todos os genótipos sob efeito do estresse por baixa temperatura, porém com menor magnitude para as plantas do genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22, sendo que após os períodos de recuperação os valores retornaram aos observados nas plantas controle.

A relação S_m/T_{Fmax} que indica o estado redox médio do par redox Q_A^-/Q_A , isto é, a fração média de centro de reação do FSII aberto entre o tempo 0 e T_{Fmax} , (STRASSER et al. 2000) reduziu acentuadamente imediatamente após os dois ciclos de estresse por baixa temperatura para os três genótipos, indicando um severo fechamento dos centros de reação do FSII. As plantas do genótipo com alto HSP (Figura 1B) apresentaram a menor redução (40%), sendo que após o período de recuperação as plantas do genótipo baixo MT-sHSP22 os valores não retornam aos observados nas plantas controle, diferentemente do observado para as plantas selvagens e com elevada expressão da MT-sHSP22. A redução acentuada na relação S_m/T_{Fmax} foi resultado de um aumento acentuado no tempo para atingir a fluorescência máxima quando as plantas foram submetidas aos ciclos de estresse (290-300 ms para controle e 590- 600 ms após os estresse), porém após a recuperação os valores ficaram semelhantes aos observados para as plantas controle.

Para os parâmetros de fluxos específicos (fluxos por centro de reação do FSII) observou-se aumento nos fluxos de absorção (ABS/RC), de captura pelo

centro de reação (TR_o/RC) e de transporte de elétrons (ET_o/RC) após o segundo período de recuperação do segundo ciclo de estresse, sendo que este incremento foi mais relevante nos genótipos selvagem e com elevada expressão da MT-sHSP22. Não foi observado um aumento no fluxo de elétrons que reduz os aceptores finais de elétrons do FSI (RE_o/RC).

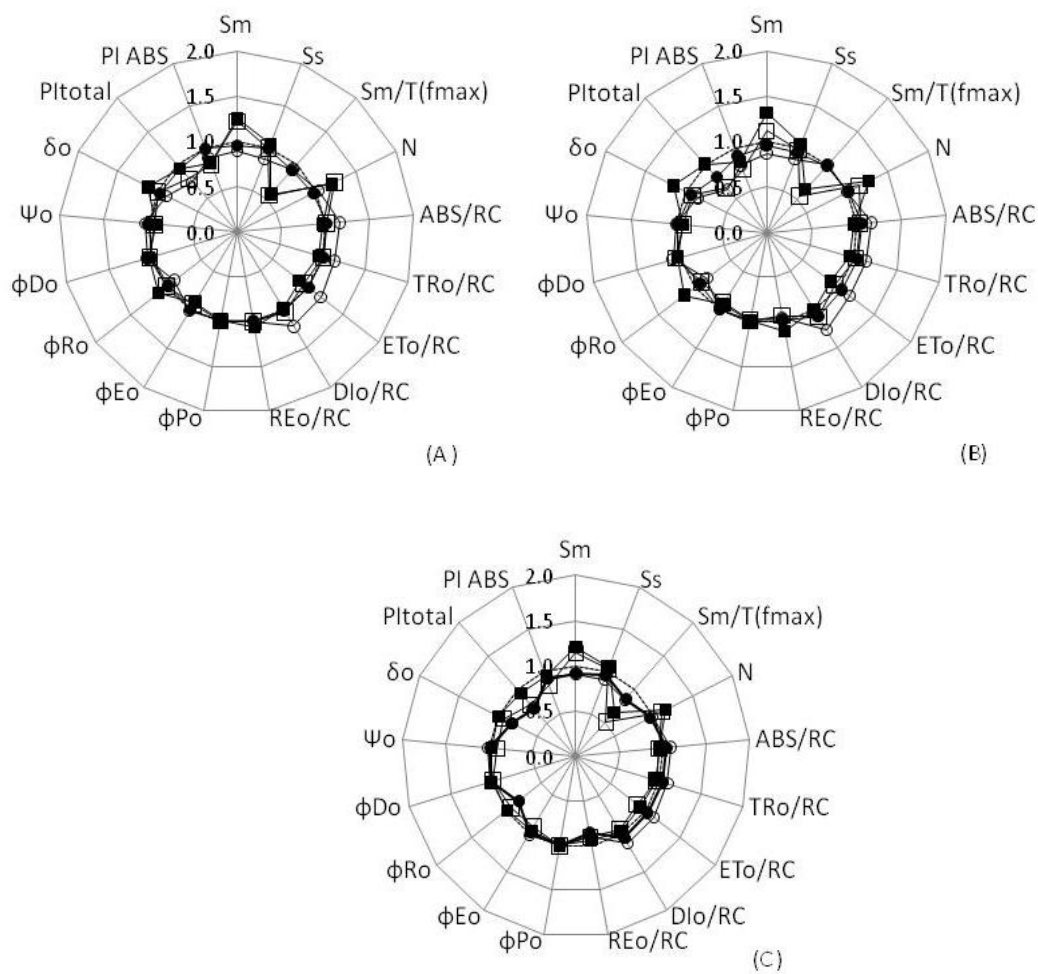


Figura 1: Parâmetros do Teste JIP, em relação ao respectivo controle, obtidos a partir da fluorescência transiente OJIP das clorofilas de plantas de tomate 'Micro-Tom' submetidas a 2 períodos de 24 h a 10°C, intercalados com recuperação a 21°C. (A) genótipo selvagem, (B) genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, (C) genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22. (—) controle, (—■—) primeiro ciclo de estresse, (—●—) primeira recuperação, (—□—) segundo ciclo de estresse e (—○—) segunda recuperação. Valores normalizados para o controle.

Não houve diferença entre os tratamentos para o rendimento quântico fotoquímico máximo ($TR_0/ABS = F_V/F_M = \phi_{P0}$) e rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons (ϕ_{E0}). Contudo, o rendimento quântico de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI (ϕ_{R0}) aumentou após o primeiro estresse por baixa temperatura apenas nas plantas com elevada expressão da MT-sHSP22 (Figura 1B). Tais resultados refletem o que foi observado para os parâmetros que descrevem as eficiências (Ψ_{E0} – eficiência/probabilidade com que um éxciton capturado no centro de reação possa mover um elétron de Q_A^- para intersistema de aceptores de elétrons; e δ_{R0} – eficiência/probabilidade com que um elétron do intersistema de carregadores de elétrons move-se para reduzir os aceptores finais de elétrons do FSI ou probabilidade de redução de umceptor final do FSI).

O índice de performance em relação à absorção (PI_{ABS}) (STRASSER et al., 2004) apresentou decréscimo após o primeiro dia de estresse, principalmente para as plantas dos genótipos selvagem e com elevada expressão da MT-sHSP22 (Figura 1B) com retorno aos valores próximos aos do controle após o primeiro dia de recuperação. Contudo, para o segundo dia de estresse todos os três genótipos apresentaram redução em PI_{ABS} , mas em menor intensidade para as plantas com baixa expressão da MT-sHSP22 (Figura 1C). De outra forma, o índice de performance total (PI_{total}) (TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2008) apresentou redução mais acentuada após o segundo dia de estresse por baixa temperatura, sem retorno dos valores para próximo das plantas controle após o segundo período de recuperação.

3.1.2. Fluorescência transiente da clorofila a: Normalizações e subtração de transientes

Os dados (em escala logarítmica de tempo, no intervalo 50 μ s a 1 s), da fluorescência variável relativa da clorofila a entre os passos O e P (V_{OP}) para as plantas submetidas a estresse de baixa temperatura estão apresentados nas Figuras 2A-C, na qual se observa uma elevação na fluorescência variável relativa no passos J (V_J) nos três genótipos imediatamente após o estresse, com retorno a valores similares ao controle após a recuperação. As curvas de diferença cinética da fluorescência relativa em relação ao controle ($\Delta V_{OP} = V_{OP[tratamento]} - V_{OP[controle]}$) são apresentadas nas Figuras 2D-E, pelas quais observam-se efeitos diferentes entre os

genótipos em função dos estresses e o período de recuperação. Para facilitar a análise dos efeitos sobre as etapas OJ, OI e IP, foram realizadas normalizações específicas.

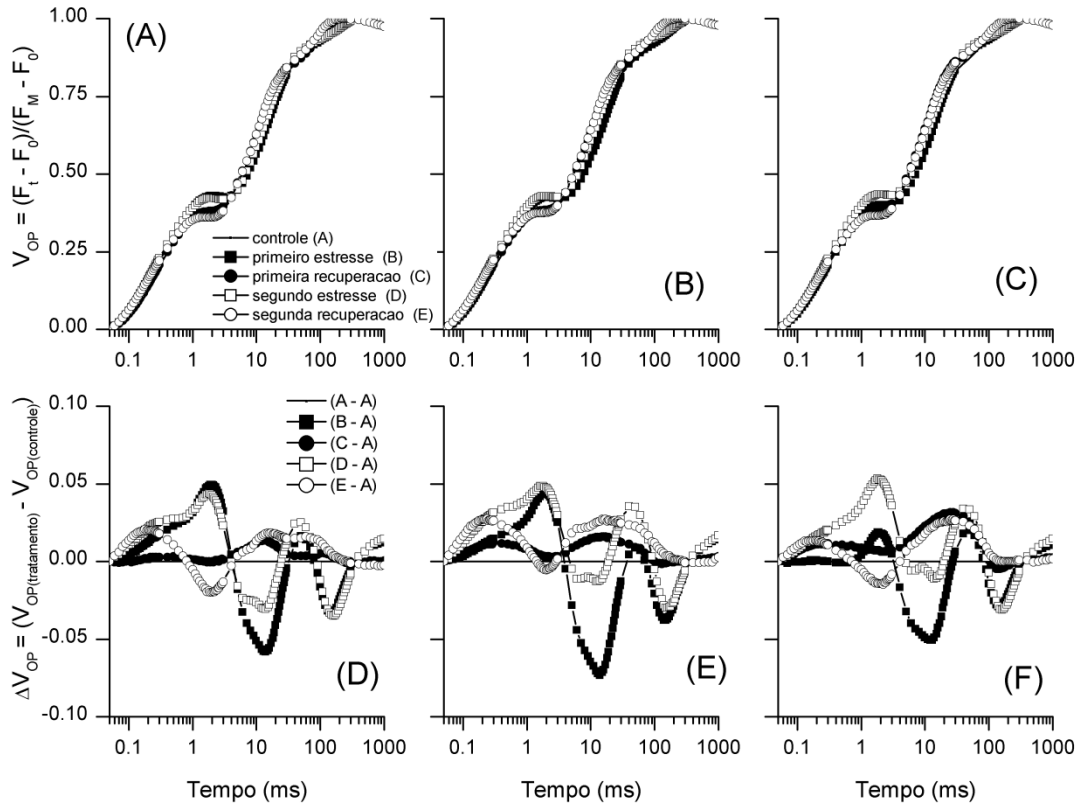


Figura 2. Fluorescência transiente da clorofila *a* do passos O até P depois de dupla normalização entre os passos entre F_0 e F_P de folhas adaptadas ao escuro de plantas de tomate 'Micro-Tom' submetidas a 2 períodos de 24 h a 10°C, intercalados com recuperação a 21°C. (A-C) fluorescência variável relativa [$V_{OP} = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$]; (D-E) diferença cinética de V_{OP} [$\Delta V_{OP} = V_{OP[tratamento]} - V_{OP[controle]}$]. (A e D – genótipo selvagem), (B e E – genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22), (C e F – genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22).

A fluorescência relativa entre os passos O (50 μ s) e K (300 μ s) foi normalizada pela fórmula ($V_{OK} = [F_t - F_0]/[F_K - F_0]$) e as diferenças cinéticas ($\Delta V_{OK} = V_{OK[tratamento]} - V_{OK[controle]}$) estão apresentadas nas Figuras 3A-C, nas quais é possível identificar o aparecimento da banda-L (aproximadamente em 150 μ s). Esta banda surgiu de maneira diferenciada entre os genótipos: i. para as plantas selvagem apenas no segundo estresse e na segunda recuperação; ii. para as plantas dos genótipos transformados foi identificada também após o primeiro período de recuperação.

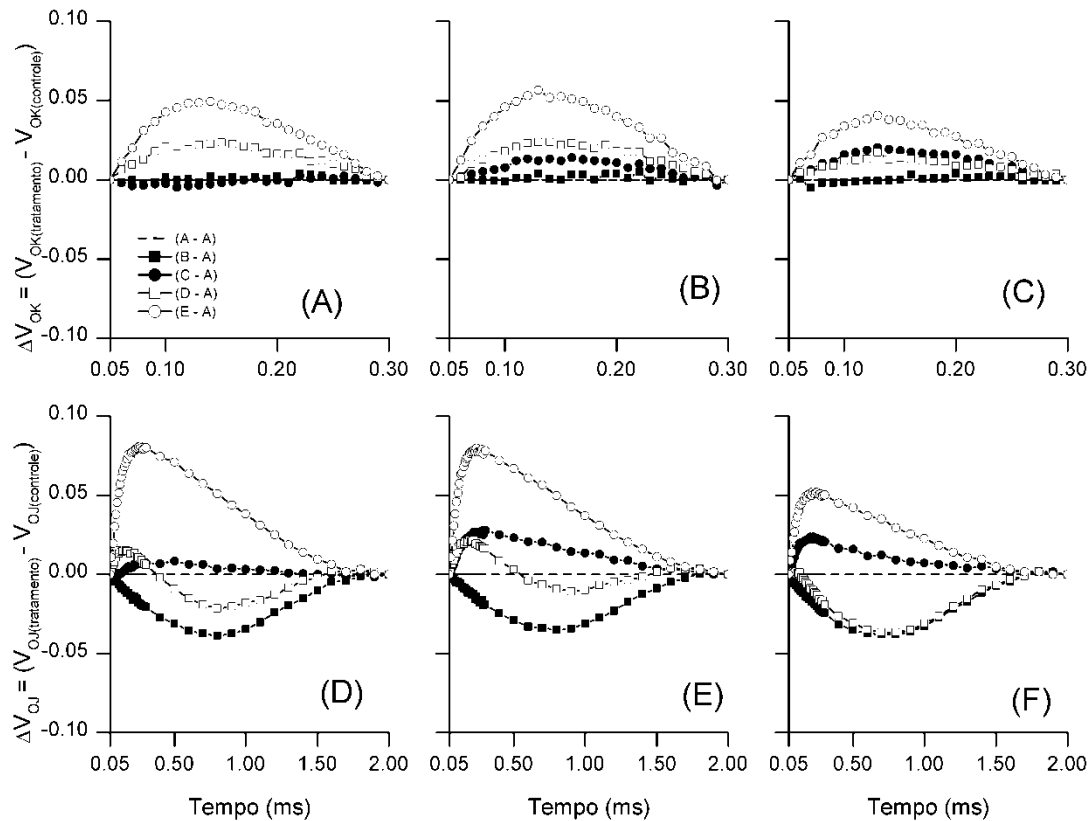


Figura 3. Fluorescência transiente da clorofila *a* dos passos O até K e O até J depois de dupla normalização entre os passos F_0 e F_K , F_0 e F_J respectivamente, de folhas adaptadas ao escuro em plantas de tomate ‘Micro-Tom’ submetidas a 2 períodos de 24 h a 10°C, intercalados com recuperação a 21°C. (A-C) diferença cinética de V_{OK} [$\Delta V_{OK} = V_{OK[tratamento]} - V_{OK[controle]}$]; (D-F) diferença cinética de V_{OJ} [$\Delta V_{OJ} = V_{OJ[tratamento]} - V_{OJ[controle]}$]. (A e D – genótipo selvagem), (B e E – genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22), (C e F – genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22). (legendas dentro dos gráficos A – controle, B - primeiro estresse, C - primeira recuperação, D - segundo estresse, E - segunda recuperação).

O aparecimento da banda-L é um indicador da conectividade (agrupamento) das unidades do FSII (STRASSER e STIRBET, 1998), sendo que quando a mesma é positiva a conectividade é menor (YUSUF et al., 2010). A alta conectividade resulta em uma melhor utilização da energia de excitação e melhor estabilidade do sistema (STRASSER et al., 2004). A partir destas observações pode-se inferir que o primeiro ciclo de estresse por baixa temperatura e recuperação não provocou efeitos marcantes na utilização da energia de excitação, mas o segundo estresse gerou uma perda de agrupamento entre as unidades do FSII.

A fluorescência relativa entre os passos O (50 μ s) e J (2 ms) foi normalizada pela fórmula ($V_{OJ} = [F_t - F_0]/[F_J - F_0]$) e as diferenças cinéticas ($\Delta V_{OJ} = V_{OJ[tratamento]} -$

$V_{OJ[\text{controle}]}$) estão apresentadas nas Figuras 3 D-F, nas quais é possível identificar o aparecimento da banda-K a aproximadamente 300 μs . A banda-K positiva reflete a inativação do complexo de evolução de oxigênio (YUSUF et al., 2010). Alterações na fase O-J com diferentes amplitudes da banda-K ocorreram de forma distinta nos três genótipos em resposta ao estresse por baixa temperatura, destacando-se a banda-K após o segundo período de estresse nas plantas do genótipo selvagem (Figura 3D) e com elevada expressão da MT-sHSP22 (Figura 3E), porém as maiores amplitudes foram observadas após o segundo período de recuperação em todos os genótipos.

Para avaliar a fase O-I, os dados de fluorescência transiente das clorofilas foram normalizados com $V_{OI} = [F_t - F_0]/[F_1 - F_0]$, e apresentados na faixa de tempo de 50 μs a 1 s (Figuras 5 A-C) and 30 to 300 ms (Figura D-F). A análise da fluorescência variável entre os passos O e I menor do que 1 ($V_{OI} < 1$) permite avaliar a sequência de eventos desde a captura do éxciton pelo centro de reação do FSII até a redução da plastoquinona. Nas Figuras 4 A-C pode-se identificar que as plantas de todos os genótipos apresentaram menores V_{OI} nas determinações realizadas após o período de recuperação, podendo indicar uma menor taxa de oxidação dos aceptores finais de elétrons do lado acceptor do FSII.

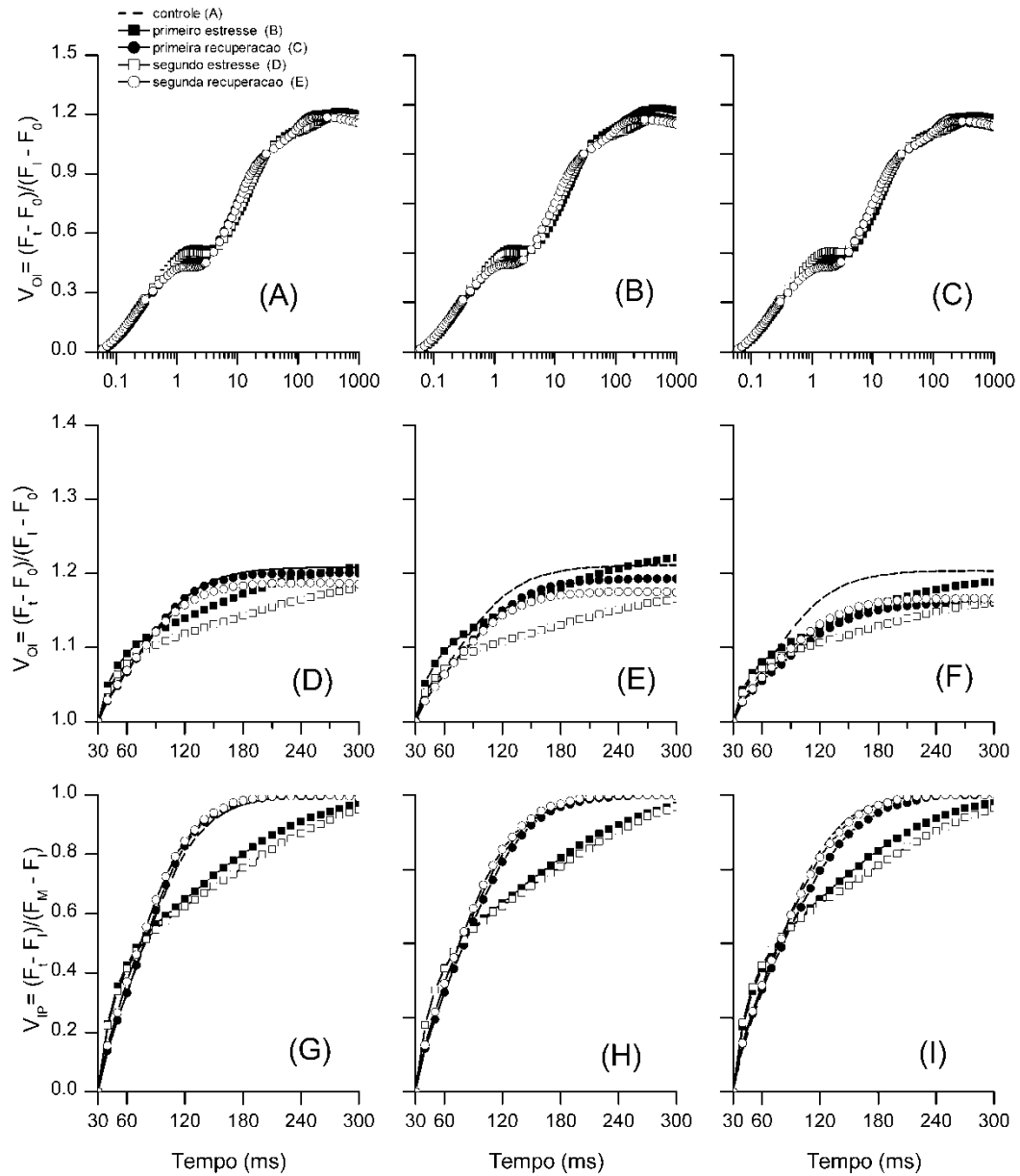


Figura 4. Fluorescência transiente da clorofila *a* do passos O até I e I até P depois de dupla normalização entre os passos entre F_0 e F_I e F_I e F_M respectivamente, de folhas adaptadas ao escuro de plantas de tomate 'Micro-Tom' submetidas a 2 períodos de 24 h a 10°C, intercalados com recuperação a 21°C. (A-C) fluorescência variável relativa entre o passos O e I [$V_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$]; (D-F) V_{OI} no tempo entre 30 e 300 μ s; (G-I) fluorescência variável relativa entre o passos I e P [$V_{IP} = (F_t - F_I)/(F_P - F_I)$]. (A, D e G – genótipo selvagem), (B, E e H – genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22), (C, F e I – genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22).

A fase I-P foi avaliada por dois procedimentos distintos: i. interpretação da normalização da fluorescência variável entre os passos O e I com valores maiores ou iguais a 1 ($V_{OI} \geq 1$) (Figura 4D-F), que permite avaliar a sequência de eventos da transferência de elétrons da plastoquinona reduzida para o aceptor final de elétrons

do FSI e, ii. a normalização dos dados de fluorescência transiente entre os passos I e P ($V_{IP} = [F_t - F_I]/[F_M - F_I]$) em escala linear entre 30 e 300 ms (Figura 4G-I).

Em cada curva $V_{OI} \geq 1$ na faixa de tempo entre 30 e 300 ms, a máxima amplitude do aumento da fluorescência reflete o tamanho do pool de aceptores finais de elétrons do lado acceptor do FSI. Neste sentido, pode-se demonstrar que todos os genótipos apresentam redução no pool de aceptores de elétrons após os dois ciclos de estresse a baixa temperatura, contudo o período de recuperação permitiu o retorno da quantidade de aceptores apenas para as plantas selvagem (Figura 4D) e com elevada expressão da MT-sHSP22 (Figura 4).

A fluorescência variável transiente entre os passos I e P permite deduzir o comportamento do fluxo de elétrons que atinge os aceptores finais do FSI. Os dados de V_{IP} no intervalo 30 a 300 ms (Figura 4G-I) mostra um comportamento como descrito pela equação de Michaelis-Menten, na qual o inverso do tempo para atingir $V_{IP} = 0,5$ é uma estimativa da taxa global de redução dos aceptores finais do FSI. No presente estudo não foram identificadas diferenças na taxa global de redução do acceptor final de elétrons do FSI em nenhuma das condições aplicadas

3.1.3 Taxa assimilatória líquida

A taxa assimilatória líquida (Figura 5) reduziu após a aplicação de cada um dos ciclos de estresse por baixa temperatura para os três genótipos, sendo que após os períodos de recuperação a taxa assimilatória líquida retornou a valores próximos ao controle.

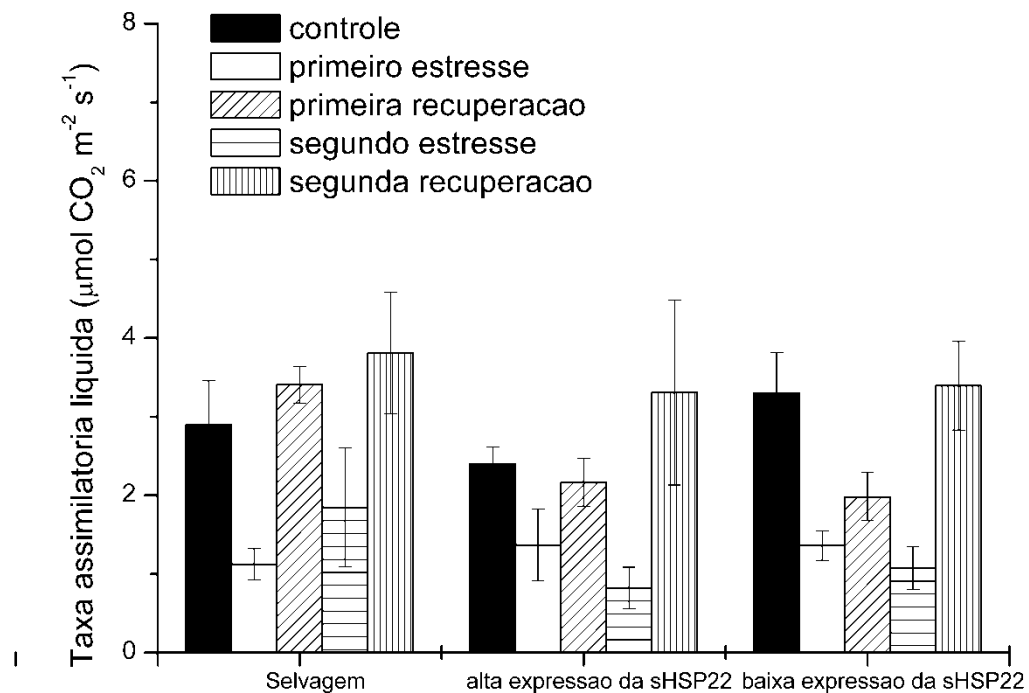


Figura 5: Taxa assimilatória líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de plantas de tomate 'Micro-Tom' cultivadas submetidas a 2 períodos de 24 h a 10°C , intercalados com recuperação a 21°C . Barra indica erro padrão da média.

3.2. Efeito de ciclo de estresse de alta temperatura

3.2.1 Fluorescência transiente da clorofila a: parâmetros biofísicos derivados do Teste JIP

Os parâmetros biofísicos derivados das curvas de fluorescência transiente e alguns parâmetros do Teste-JIP (STRASSER e STRASSER, 1995) para as plantas submetidas a ciclos de temperatura de 37°C e posteriormente recuperadas para temperatura de 21°C são apresentados como gráfico radar (Figura 6). Todos os dados dos parâmetros de fluorescência foram normalizados para os dados de plantas mantidas a 21°C (controle).

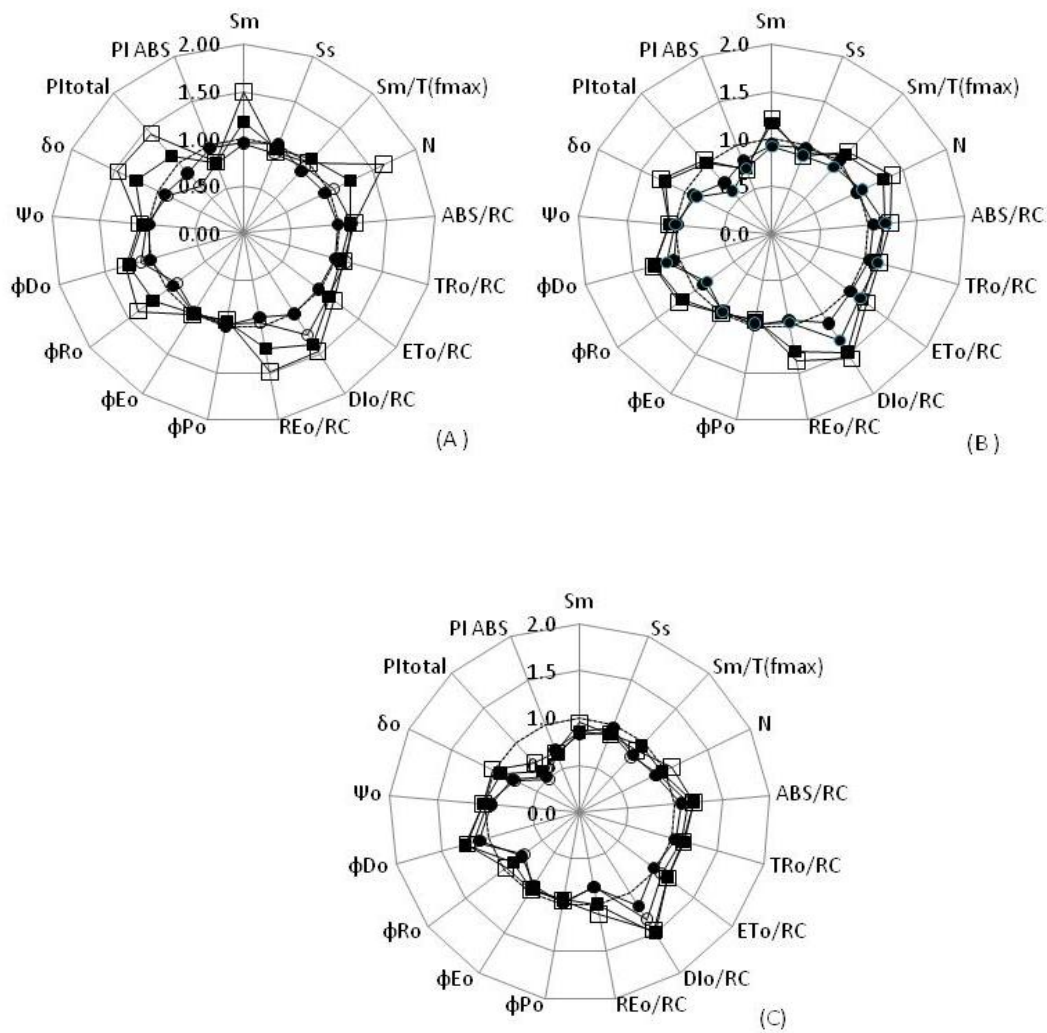


Figura 6: Parâmetros do Teste JIP, em relação ao respectivo controle, obtidos a partir da fluorescência transiente OJIP das clorofilas de plantas de tomate 'Micro-Tom' submetidas a 2 períodos de 24 h a 37°C, intercalados com a recuperação a 21°C. (A) genótipo selvagem, (B) genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, (C) genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22. (—) controle, (—■—) primeiro ciclo de estresse, (—●—) primeira recuperação, (—□—) segundo ciclo de estresse e (—○—) segunda recuperação. Valores normalizados para o controle.

Os ciclos de alta temperatura resultaram em efeitos diferentes entre os três genótipos. A área complementar total normalizada acima da curva transiente OJIP (S_m) mostra que houve um em resposta aos estresses para os genótipos selvagem e com elevada expressão da MT-sHSP22, fato não observado para o genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22. Porém a área complementar total normalizada acima da curva transiente somente na fase OJ, refletindo eventos de simples giros de redução de Q_A (S_s), não foi afetada pelos estresses em nenhum dos genótipos. 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) aumentou para os genótipos, selvagem e com elevada expressão da MT-sHSP22, sendo mais marcante no segundo ciclo de estresse nas plantas selvagens. Todavia, para o genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22 não foi observada diferença em relação ao controle para este parâmetro.

Os parâmetros de fluxos específicos (fluxos por centro de reação do FSII) de absorção (ABS/RC), de captura pelo centro de reação (TR_0/RC) e de transporte de elétrons (ET_0/RC) aumentaram em relação controle após os dois ciclos de estresse e retornaram para valores próximos ao controle nos três genótipos. Porém, o fluxo de elétrons que reduz os aceptores finais de elétrons do FSI (RE_0/RC) aumentou apenas para os genótipos selvagem e com elevada expressão da MT-sHSP22. Entretanto o fluxo de dissipação (DI_0/RC) foi o parâmetro que mais se elevou em resposta aos estresses em todos os genótipos, sendo que apenas após o primeiro período de recuperação foi observado retorno a valores similares ao controle, e após o segundo ciclo de recuperação tal parâmetro ainda se manteve elevado.

Os tratamentos não apresentaram diferença em: i. rendimento quântico fotoquímico máximo ($TR_0/ABS = F_v/F_M = \phi_{P0}$); ii. rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons (ϕ_{E0}). No entanto, o rendimento quântico de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI (ϕ_{R0}) aumentou após o primeiro estresse por alta temperatura apenas nas plantas com elevada expressão da MT-sHSP22 e no genótipo selvagem (Figura 6A e B). No segundo ciclo de estresse, novamente os mesmos genótipos apresentaram uma elevação ainda maior que no primeiro ciclo, sendo mais expressante no genótipo selvagem. Esses resultados refletem o que foi analisado para os parâmetros que Ψ_{E0} – eficiência/probabilidade com que um éxciton capturado no centro de reação possa mover um elétron de Q_A^- para intersistema de aceptores de elétrons; e δ_{R0} – eficiência/probabilidade com que um elétron do intersistema de carregadores de

elétrons move-se para reduzir os aceptores finais de elétrons do FSI ou probabilidade de redução de umceptor final do FSI), demonstrando assim uma inter-relação entre estes parâmetros.

No que se refere ao índice de performance em relação à absorção (PI_{ABS}) (STRASSER et al., 2004), houve decréscimo ao longo do tratamento em todos os genótipos, não sendo evidenciado retorno próximo aos controles, após a recuperação (Figura 6). Já o índice de performance total (PI_{total}) (TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2008), demonstrou uma maior redução no genótipo com baixa expressão de MT-sHSP22, bem como também não apresentou recuperação. O mesmo não foi verificado para o genótipo selvagem e com elevada expressão de MT-sHSP22, onde houve um acréscimo ao longo do tratamento, este sendo mais demonstrado no genótipo selvagem. A recuperação de ambos os genótipos apresentou-se próximo aos níveis de controle.

3.2.2. Fluorescência transiente da clorofila a: Normalizações e subtração de transientes

A fluorescência variável relativa entre os passos O e P [$V_{OP} = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$], podem ser observadas na Figura 7 A-C, e as diferenças entre as fluorescências variável relativa entre os ponto O e P [$\Delta V_{OP} = (V_{OP \text{ (tratamento)}} - V_{OP \text{ (controle)}})$] estão representadas na Figura 7 D-F. A análise destes dados permite identificar diferenças entre os genótipos durante os períodos de estresses e nos períodos de recuperações. Buscando facilitar uma melhor análise dos efeitos do estresse sobre as fases OJ, OI e IP foram realizadas normalizações específicas.

A normalização entre os pontos O (50 μ s) e K (300 μ s) na representada na forma de diferença cinética [$\Delta V_{OK} = (V_{OK \text{ (tratamento)}} - V_{OK \text{ (controle)}})$] (Figura 8 A-C), demonstrou a presença da banda-L (aproximadamente em 150 μ s), em todos os genótipos. Esta banda demonstra a conectividade ou agrupamento das unidades do FSII, e quando é positiva, a conectividade está em baixos níveis (YUSUF et al, 2010).

Os dados normalizados entre os pontos O (50 μ s) e J (2 μ s) na forma de fluorescência variável relativa e apresentados na forma de diferença cinética [$\Delta V_{OJ} = (V_{OJ \text{ (tratamento)}} - V_{OJ \text{ (controle)}})$] (Figura 8 D-F), permitem a visualização da banda-K (~ 300 μ s), a qual quando positiva reflete uma inativação do complexo de liberação de

oxigênio (YUSUF et al. 2010). No presente experimento observou-se que todos os genótipos apresentaram esta banda na forma positiva imediatamente após os estresses e após a primeira recuperação.

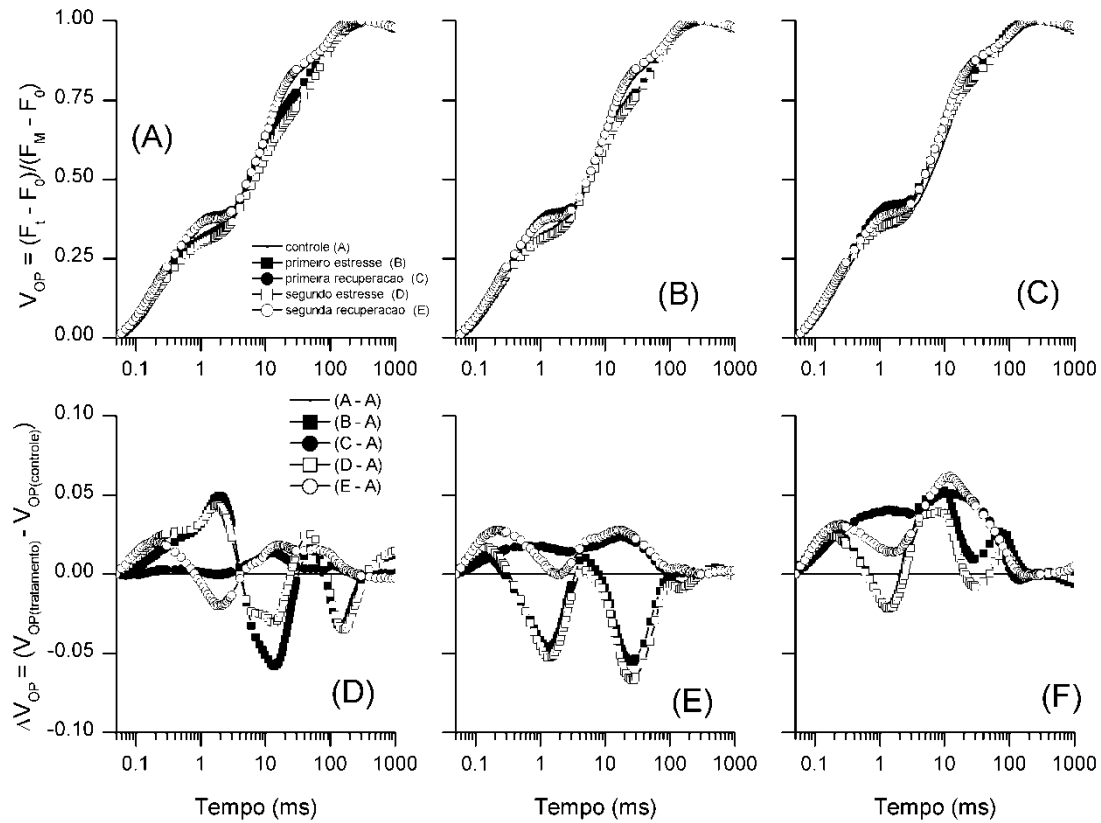


Figura 7. Fluorescência transiente da clorofila *a* do passo O até P depois de dupla normalização entre os passos F_0 e F_P de folhas adaptadas ao escuro em plantas de tomate 'Micro-Tom' submetidas a 2 períodos de 24 h a 37°C, intercalados com a recuperação a 21°C. (A-C) fluorescência variável relativa [$V_{OP} = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$]; (D-F) diferença cinética de V_{OP} [$\Delta V_{OP} = V_{OP[tratamento]} - V_{OP[controle]}$]. (A e D – genótipo selvagem), (B e E – genótipo com elevada expressão MT-sHSP22), (C e F – genótipo com baixa expressão MT-sHSP22).

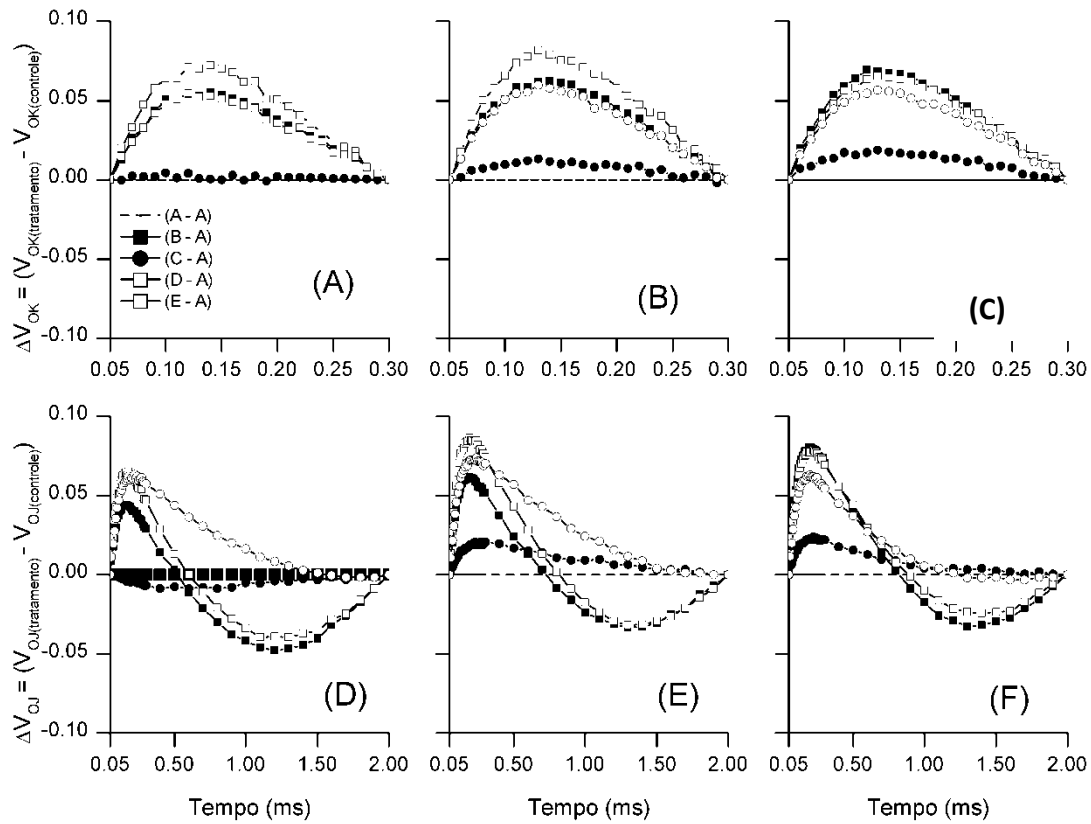


Figura 8. Fluorescência transiente da clorofila *a* do passos O até K e O até J depois de dupla normalização entre os passos entre F_0 e F_K F_0 e F_J respectivamente, de folhas adaptadas ao escuro de plantas de tomate 'Micro-Tom' submetidas a 2 períodos de 24 h a 37°C, intercalados com a recuperação a 21°C. (A-C) diferença cinética de V_{OK} [$\Delta V_{OK} = V_{OK[tratamento]} - V_{OK[controle]}$]; (D-F) diferença cinética de V_{OJ} [$\Delta V_{OJ} = V_{OJ[tratamento]} - V_{OJ[controle]}$]. (A e D – genótipo selvagem), (B e E – genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22), (C e F – genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22). (legendas dentro dos gráficos A – controle, B - primeiro estresse, C - primeira recuperação, D - segundo estresse, E - segunda recuperação).

Para identificar o efeito das altas temperaturas sobre a fase O-I da curva de fluorescência transiente OJIP, procedeu-se a normalização das curvas transiente com fluorescência variável relativa entre os passos O e I [$V_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$], (Figura 9 A-C). A análise da fluorescência variável entre os passos O e I menor do que 1 ($V_{OI} < 1$) permite avaliar a sequência de eventos deste a captura do éxciton pelo centro de reação do FSII até a redução da plastoquinona. Nas Figuras 9A-C pode-se identificar que as plantas de todos os genótipos apresentaram menores V_{OI}

nas determinações realizadas após o período de recuperação, podendo indicar uma menor taxa de oxidação dos aceptores finais de elétrons do lado acceptor do FSI.

A fase I-P foi avaliada por dois procedimentos distintos: i. interpretação da normalização da fluorescência variável entre os passos O e I com valores maiores ou iguais que 1 ($V_{OI} \geq 1$) (Figura 9D-F), que permite avaliar a sequência de eventos da transferência de elétrons da plastoquinona reduzida para o acceptor final de elétrons do FSI e, ii. a normalização dos dados de fluorescência transiente entre os passos I e P como ($V_{IP} = [F_t - F_I]/[F_M - F_I]$) em escala linear entre 30 e 300 ms (Figura 9G-I).

A Figura 9 D-F, representada na forma de $V_{OI} \geq 1$, reflete o tamanho do *pool* de aceptores de elétrons do lado acceptor de elétrons do FSI. Neste experimento se observou diferenças marcantes nesta fase O-I entre os genótipos, destacando os genótipos selvagem (Figura 9D) e com elevada expressão da MT-sHSP22, que após cada estresse apresentaram maiores amplitudes das curvas, indicando maior *pool* de aceptores de elétrons do lado acceptor de elétrons do FSI, sendo que imediatamente após as recuperações os valores assemelham-se ao controle. Tais fatos não foram observados para o genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22

A fluorescência variável transiente entre os passos I (30ms) e P permite deduzir o comportamento do fluxo de elétrons que atinge os aceptores finais do FSI. Os dados de V_{IP} no intervalo 30 a 300 ms (Figura 9G-I) mostra um comportamento como descrito pela equação de Michaelis-Menten, na qual o inverso do tempo para atingir $V_{IP} = 0,5$ é uma estimativa da taxa global de redução dos aceptores finais do FSI. No presente estudo não foram identificadas diferenças na taxa global de redução do acceptor final de elétrons do FSI em nenhuma das condições aplicadas.

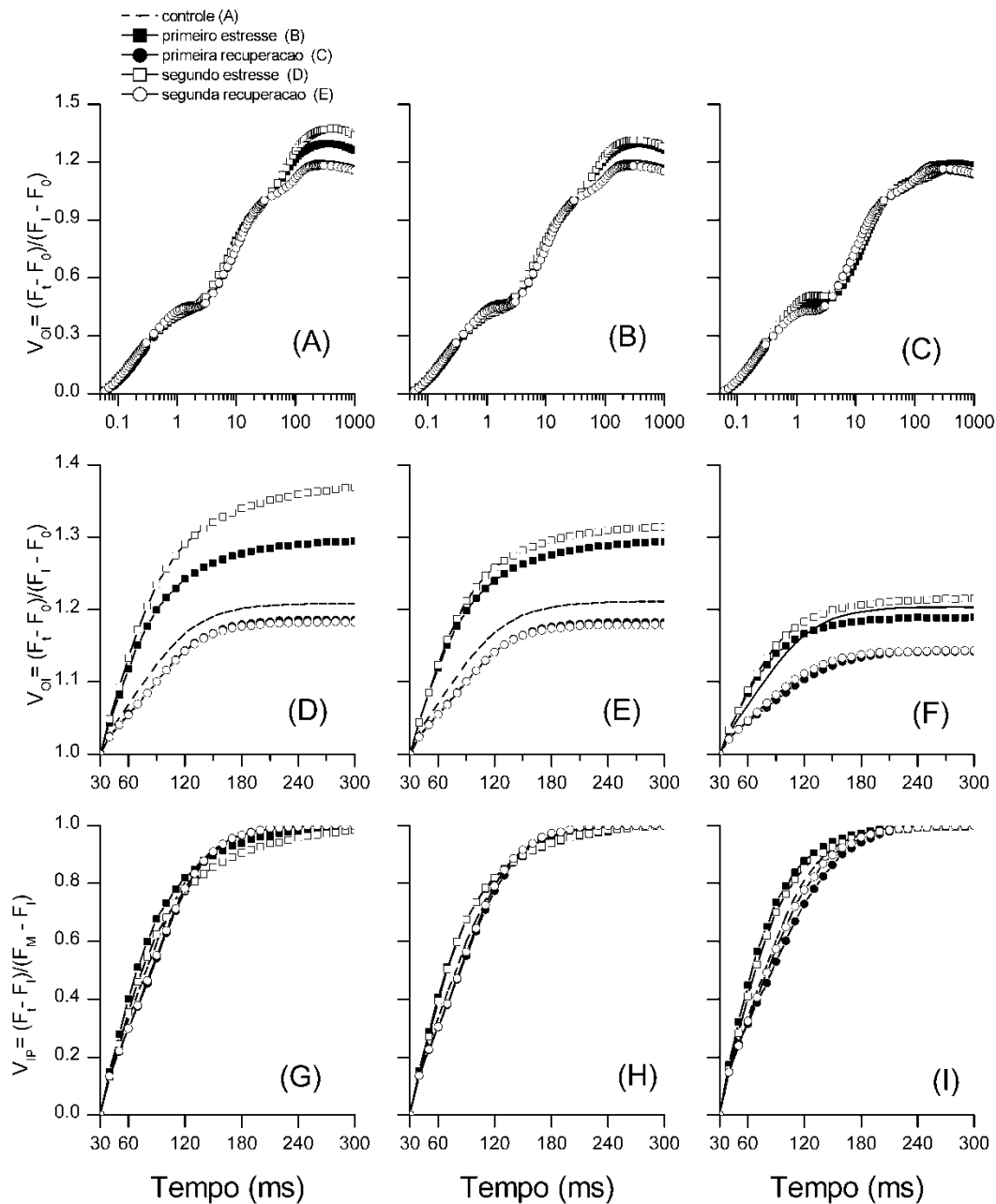


Figura 9. Fluorescência transiente da clorofila *a* do passos O até I e I até P depois de dupla normalização entre os passos F_0 e F_1 e F_1 e F_M respectivamente, de folhas adaptadas ao escuro em plantas de tomate 'Micro-Tom' submetidas a 2 períodos de 24 h a 37°C, intercalados com a recuperação a 21°C. (A-C) fluorescência variável relativa entre o passos O e I [$V_{OI} = (F_t - F_0)/(F_1 - F_0)$]; (D-F) V_{OI} no tempo entre 30 e 300 μ s; (G-I) fluorescência variável relativa entre o passos I e P [$V_{IP} = (F_t - F_I)/(F_P - F_I)$]. (A, D e G – genótipo selvagem), (B, E e H – genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22), (C, F e I – genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22).

3.2.3. Taxa assimilatória líquida

A taxa assimilatória líquida (A) (Figura 10) aumentou em relação ao controle após os dois ciclos de estresse por alta temperatura para as plantas do genótipo

selvagem e com elevada expressão da MT-sHSP22, sendo para este último o aumento mais marcante, principalmente após o segundo ciclo de estresse a 37°C. Entretanto, para as plantas do genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22 foi observado redução na taxa assimilatória líquida após o primeiro ciclo de estresse. Contudo, após o primeiro dia de recuperação os valores da taxa assimilatória líquida aumentaram, mas sempre abaixo dos observados para as plantas do genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22.

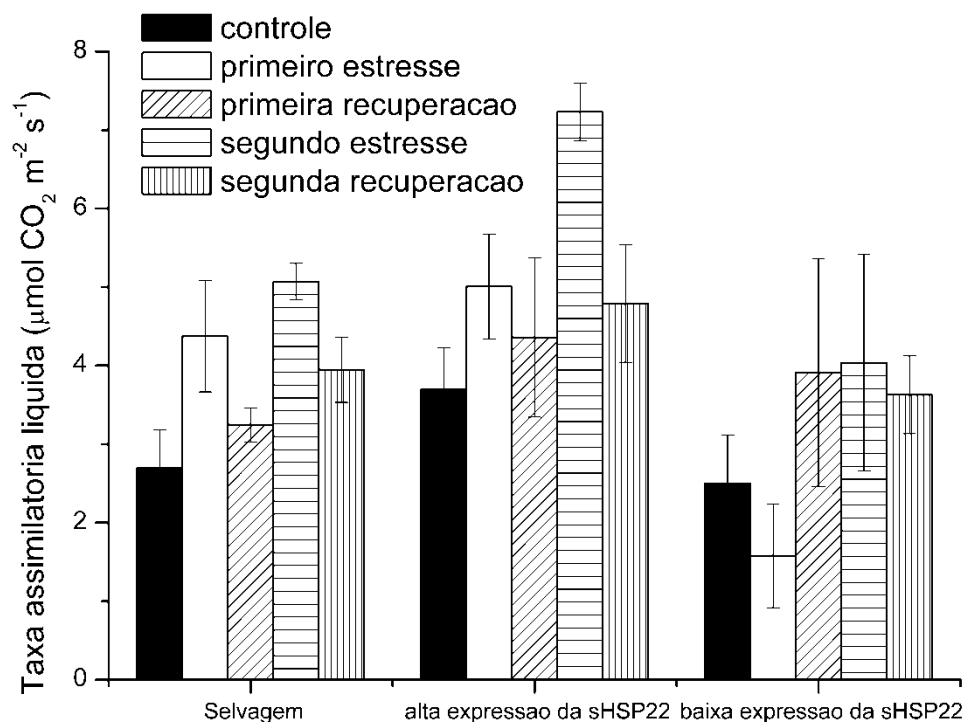


Figura 10: Taxa assimilatória líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de plantas de tomate Micro-Tom submetidas a 2 períodos de 24 h a 37°C, intercalados com a recuperação a 21°C. Barra indica erro padrão da média.

4. DISCUSSÃO

4.1. Efeito do ciclo do estresse de baixa temperatura

A temperatura é um fator abiótico cujos efeitos negativos de sua ocorrência são de difícil controle durante o crescimento das plantas, o que torna a tolerância genética das cultivares extremamente importante. No entanto, o grau de estresse,

intensidade e duração, e o estágio de desenvolvimento da planta podem variar no consequente dano observado, assim como de uma espécie para outra.

Os sintomas visuais variam dependendo da temperatura, do período de exposição, da fase de desenvolvimento, e de outras condições ambientais tais como luz, presença de vento, disponibilidade de água e nutrientes. As plantas podem mostrar uma perda do vigor e uma redução nas taxas de crescimento, mesmo na ausência de outros sintomas visíveis.

Em cultivares muito sensíveis, o frio causa danos irreversíveis aos componentes da célula e ao metabolismo. Geralmente, a membrana celular é o alvo primário, ocorrendo uma transição física de um estado flexível líquido-cristalino a uma fase de gel sólido. Esta mudança afeta as funções celulares em várias formas. O efeito mais imediato é um incremento na permeabilidade da membrana celular, que provoca uma perda de solutos e desbalanceamento iônico (MORSY et al., 2005), resultando como consequência do metabolismo anormal, danos às células e acúmulo de compostos tóxicos e radicais livres de oxigênio que causam em caso extremo, a morte das células. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) aumenta a peroxidação dos lipídios, promovendo danos à membrana do cloroplasto, além de ocasionar a desnaturação de biomoléculas, resultando na diminuição da fotossíntese e morte celular (DJANAGUIRAMAN et al., 2009)

Na presença de baixas temperaturas, a assimilação de CO_2 e a fotorespiração são suprimidas. Nesta situação, como a capacidade de utilização dos fótons diminui, aumenta-se a susceptibilidade à fotoinibição. Além disso, tem-se relatado um incremento dos pigmentos derivados do ciclo da xantofila e uma maior atividade das enzimas do ciclo da água (HIROTSU et al., 2004). Ogwen et al. (2009) ressaltam que o mais sensível componente de plantas ao estresse de temperatura foi identificado como sendo o aparelho fotossintético.

Nas plantas de tomate 'Micro-Tom' estudadas, através da análise da fluorescência transiente da clorofila *a*, observou-se um aumento acentuado no tempo para atingir a fluorescência máxima e em S_s (giros de oxidação e reoxidação de Q_A) imediatamente após os ciclos de estresses. Em plantas de batata, Batista-Santos et al. (2011), relatam a diminuição de uma proteína 10kDa no FSII de forma a ocasionar um retardamento na reoxidação Q_A e conduzir a uma desordem geral no FSII. Os mesmos autores indicam ainda que sob frio, há uma maior saturação dos ácidos graxos da membrana e uma diminuição na produção de ATP, e o

transporte cíclico e não cíclico são afetados por uma inibição do transporte de elétrons entre Q_A e Q_B , sendo que acarretará uma redução no fluxo de elétrons no FSII.

Segundo Hendrickson et al. (2006), a membrana dos cloroplastos é dupla, mas não exatamente constituída por fosfolípidios e sim por glicosilglicerídeos, entre eles digalactosil diacil glicerol (DGDG), e no lugar do fosfato há uma galactose, sendo esta molécula importante para a transferência eficiente de energia dos carotenóides para as clorofilas.

Tem sido observado que um maior grau de saturação nos monogalactosildiacylglicerol (MGDG) irá prejudicar a mobilidade das plastoquinonas nos tilacóides. O aumento da proporção de MGDG, necessário para o funcionamento da ATPase da membrana dos tilacóides (SIEGENTHALER e TRÉMOLIÈRES, 1998) e para regulação do funcionamento do FSII (IBA, 2002) poderá promover a manutenção do processo fotossintético. Por outro lado a síntese de DGDG e fosfatidilglicerol (PG) é igualmente necessária para a estabilidade e funcionamento dos complexos de captação de luz (LHCII).

Batista-Santos et al. (2011) ressaltaram que o genótipo que mais se recuperou do estresse por frio é o que apresentou um forte aumento da síntese de novo de lípidos membranares, aliado a alterações qualitativas nas classes lipídicas, com reflexos nos aumentos significativos (absolutos e proporcionais) de MGDG e, principalmente, dos fosfolípidos, em particular do PG. Tal fato estará certamente ligado à manutenção da maquinaria fotossintética e uma recuperação metabólica mais rápida após o fim da imposição do frio. Tais resultados podem contribuir para explicar os diferentes atividades entre os genótipos, nos impactos causados pelo frio sobre o FSII.

O acentuado fechamento dos centros de reação do FSII, observado no presente trabalho, pode ter sido afetado pela fotoxidação, o que prejudica o transporte de elétrons que pode ser atribuído à diminuição do número de centros de reação abertos do FSII e da eficiência de captura de energia por esses centros abertos (OGWENO, et al. 2009), ou mesmo pelo silenciamento de alguns centros de reação (centro de reação que não reduz Q_A). A presença da banda L (positiva) nos genótipos estudados resulta em uma diminuição da conectividade energética entre as unidades do FSII (YUSUF et al. 2010). Pietrini et al. (2005) sugerem que esses efeitos são atribuíveis a algumas diferenças na composição e organização do FSII,

nos centro de reação e no sistema antena, pois eles provavelmente refletem mudanças no agrupamento do FSII.

Neste experimento, também foi visualizado a presença da banda-K, sendo que quando positiva representa uma inativação do complexo de evolução do oxigênio (YUSUF et al. 2010). Para o tratamento de estresse por baixa temperatura, os efeitos do frio sobre o FSII, consistiram em duas fases distintas. Na primeira fase (durante o primeiro estresse) os genótipos não apresentaram a banda-K de forma positiva, demonstrando que não houve efeitos graves sobre o FSII. Na segunda fase (após o segundo estresse), apresentaram a banda-K positiva, sendo mais pronunciada na segunda recuperação, destacando assim a ocorrência de um desbalanço entre os lados doadores e aceptores de elétrons do FSII, estando associado à dissociação do complexo de evolução de oxigênio, juntamente com uma diminuição progressiva nos processos fotoquímicos.

Em relação ao FSI, todos os genótipos apresentaram sensibilidade ao frio, pois se verificou uma redução no pool de aceptores finais de elétrons do FSI. Stirbet e Govindjee (2011) salientam que a molécula de plastocianina, quando em estado reduzido, age como doadora de elétrons para o FSI, e que quando há uma diminuição nas taxas de assimilação de carbono, estas estão presentes em menor número (1 PC / FSI). Já em folhas com altas taxas de assimilação de carbono, podem estar presentes até 5 PC/FSI e tal redução acaba afetando a produção de NADPH₂, como resultado do fluxo de elétrons na cadeia de transporte de elétrons.

Pietrini et al. (2005) ressaltam que nem toda a energia luminosa absorvida é capturada, bem como transportada, ou seja, nem todos fótons são convertidos em atividade fotoquímica, o que foi evidenciado através do índices de performance (PI_{ABS} e PI_{total}), indicando assim a sensibilidade dos genótipos estudados ao estresse. Huner et al. (1998) destacam que o potencial para um desequilíbrio energético entre a fase fotoquímica, o transporte de elétrons e o metabolismo do carbono é exacerbado em condições de alta luminosidade e temperaturas baixas, ou ambos, que levam a uma maior pressão de excitação sobre o FSII. Numa escala de tempo de minutos, os organismos podem se aclimatar em uma tentativa de compensar a exposição à alta pressão de excitação do FSII, reduzindo a eficiência de transferência de energia para FSII seja por desvio de energia a partir de FSII para FSI através de transições de estado ou de dissipação de energia excedente na forma de calor por *quenching* não fotoquímico. Estes mecanismos resultam em

ajustes na área funcional da absorção transversal do FSII, o que reduziria a eficiência fotossintética medida como o rendimento quântico de CO₂ assimilado ou o rendimento quântico da evolução O₂.

Para a taxa assimilatória líquida de CO₂ em todos os genótipos, houve reduções fortes nas plantas submetidas a primeira fase e na segunda fase do estresse e isto pode sugerir uma queda na condutância estomática (g_s) (BATISTA-SANTOS et al. 2011).

Após cada período de 24 horas de recuperação as plantas de todos os genótipos retornaram a taxa assimilatória líquida próxima ao controle, sugerindo que possa ter ocorrido uma aclimação, fato também verificado em folhas de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) (PIETRINI et al., 2005). Os mesmos autores sugerem que a perfeita sobreposição da taxa de assimilação de CO₂ em função da concentração interna de CO₂, para as folhas aclimatadas e não aclimatadas, indica que a capacidade fotossintética não foi reduzida e que a redução da assimilação de CO₂ pode ser na sua maioria causada pela foto-oxidação pelo tratamento de choque com frio, e que alguns estudos já relacionam a redução da fotossíntese com a degradação das clorofilas e da Rubisco pelas espécies reativas de oxigênio, apresentando posteriormente senescência.

As respostas adaptativas dos genótipos menos suscetíveis ao frio envolvem uma série de reações fisiológicas, entre elas o ajustamento osmótico, aumentos na estabilidade das membranas por incrementos na desnaturação dos ácidos graxos nos lipídeos da membrana, aumentos na estabilidade das proteínas e outras macromoléculas por chaperonas moleculares e desintoxicação celular, eliminando os efeitos perigosos dos radicais livres via antioxidantes (MORSY et al., 2005).

As proteínas de choque térmico (HSP) são uma família que abrange muitas chaperonas e que possuem papéis importantes na proteção da célula contra estresses. Têm sido demonstrado, através de vários estudos fisiológicos, que as proteínas que estão mais envolvidas na proteção frente a estresses são as HSP, as quais aumentam a sua síntese, só que muitos mutantes que superexpressam essas proteínas, não apresentam respostas, só a concentração delas aumenta, pois ela é uma resposta e não uma causa da tolerância ao estresse.

Este experimento demonstrou que para estresse por baixa temperatura, a alta expressão destas proteínas MT-sHSP22, nem sempre foi benéfica para as plantas deste genótipo, ou não apresentaram respostas. Isto evidencia a

necessidade de mais estudos, pois a interação destas proteínas com as baixas temperaturas não está totalmente elucidada na literatura, sendo os principais efeitos relacionados às altas temperaturas.

4.2. Efeito do ciclo do estresse de alta temperatura

O estresse por altas temperaturas tem sido relatado na literatura como um grande problema que afeta o crescimento e o desenvolvimento das plantas. O mais sensível componente de plantas ao estresse de temperatura foi identificado como sendo o aparelho fotossintético (HECKATHORN et al., 1998).

As plantas de tomate 'Micro-Tom' submetidas a temperatura de 37°C, apresentaram alterações em parâmetros de fluorescência das clorofilas, destacando-se os genótipos com elevada expressão de MT-sHSP22 e o selvagem. Esses genótipos demonstraram um aumento nos parâmetros relacionados à atividade dos aceptores de elétrons do aceptor do FSII (pool de plastoquinona), bem como uma elevação na capacidade de absorção, captura, aproveitamento e transferência de energia, resultando em estabilidade dos índices de performance em relação ao controle (medida antes dos estresses).

Os valores de PI_{total} das plantas dos genótipos com elevada expressão da MT-sHSP22 e o selvagem, corroboraram com o que Yusuf et al. (2010) aborda, sobre este parâmetro, que quando mostra "ganho" (aumento em relação ao controle), significa que houve uma tensão positiva sobre o sistema, o que demonstra claramente que as modificações estruturais induzidas nessas plantas permitiu à maquinaria fotossintética dessas plantas um melhor desempenho sob o tratamento com estresse térmico. A presença das bandas L e K, a partir das normalizações entre os pontos O e K, O e J, respectivamente, e através da análise dessas bandas foi possível compreender vários aspectos, sendo possível uma abordagem mais precisa sobre determinado ponto. Essas bandas quando positivas repercutem dificuldades que a planta enfrentou, e que interferiu de alguma maneira no desempenho total da planta.

A taxa assimilatória líquida evidencia que o genótipo com elevada expressão da proteína MT-sHSP22, foi o que mais se aclimatou a condição submetida pelo estresse o que vem confirmar com Heckathorn et al. (1998) que as HSPs constituem um componente importante na aquisição de termo-tolerância e além disso a expressão delas e mais a associação delas com a mitocôndria, venham

proporcionar proteção à fosforilação oxidativa quando as mitocôndrias são submetidas a elevadas temperaturas

Wahid et al, (2007) aborda que a redução no crescimento das plantas é uma das principais consequências do estresse. Isso ocorre principalmente devido a uma redução na taxa de fotossíntese líquida e geração de poder redutor, bem como a interferência com funções mitocondriais. Sugere-se que durante as reações luminosas, o aumento na temperatura da folha induz a síntese de ATP para equilibrar o consumo de ATP sob estresse de calor, possivelmente, pelo fluxo cíclico de elétrons (BUKHOV et al., 1999). Durante as “reações escuras” da fotossíntese, no Ciclo de Calvin, a ativação da Rubisco é determinada como uma etapa crítica, podendo ser inibida a 35-40°C, o que resulta em uma diminuição líquida de assimilação CO₂ e produção de carboidratos.

Em plantas de batata a temperatura elevada proporcionou a perda do transporte fotossintético de elétrons (OGWENO et al. 2009), relatando também que a oxidação da água era o componente mais sensível ao calor. Esses pesquisadores verificaram também a inibição da ribulose-1,5-carboxilase/oxigenase, além do acúmulo de espécies reativas de oxigênio.

O fotossistema II é altamente termolábil, e sua atividade é muito reduzida ou mesmo parcialmente interrompida sob altas temperaturas, devido às propriedades das membranas dos tilacóides. O estresse por calor também pode levar a uma dissociação do complexo de evolução do oxigênio (CEO), resultando em um desequilíbrio entre o fluxo de elétrons do CEO em direção ao lado aceptor do FSII em direção ao centro de reação do FSI (WAHID et al, 2007). Estresse por calor faz com que ocorra a dissociação do manganês (Mn) na estabilização da proteína de 33 kDa no FSII, liberando átomos de Mn, bem como pode prejudicar outras partes do centro de reação, por exemplo, as proteínas D1 e/ou D2.

Em relação ao rendimento quântico de redução dos aceptores finais de elétrons, novamente os genótipos com elevada expressão da MT-sHSP22 e o selvagem, estão relacionados com os maiores incrementos ao longo do tratamento, o mesmo não verificado para o genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22, pois segundo Ogwen, et al. (2009), o que implica que deve haver outros sumidouros de elétrons, e que o calor induz a estimulação cíclica de transporte de elétrons ao redor FSI, o que pode ser responsável por aumentos também no pH, no mesmo sentido as elevadas temperaturas aumentaram a reação Mehler.

O genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22, perdeu energia ao longo da cadeia de transporte de elétrons, talvez esta energia foi utilizada para reparos ao longo da cadeia, pois não obteve rendimento significativo no final do fluxo, em comparação aos demais genótipos, que obtiveram excelentes rendimentos em relação a esta temperatura.

Há relatos que é possível que proteínas estejam envolvidas na proteção da maquinaria fotossintética, especialmente o FSII, contra os danos causados por estresses que causam foto-oxidação, bem como por estresse por calor, pois geralmente a elevação da temperatura vem acompanhada de uma alta radiação solar, relacionado a isso as plantas têm vários mecanismos responsáveis, tais como o ciclo de xantofila, e enzimas capazes de eliminar as espécies reativas de oxigênio, nas imediações do FSI, bem como a fotorrespiração (LEE et al., 2000). Estas evidências sugerem que o papel das HSP está relacionado com a proteção da célula, assegurando o funcionamento de processos vitais, sobretudo aqueles envolvidos com a produção de energia durante o período que a planta é submetida a altas temperaturas (LIN, et al., 1984).

As HSP normalmente estão associadas com estruturas celulares, como a parede celular, cloroplastos, mitocôndrias e ribossomos. Em plantas de tomate sob estresse por calor, HSP agregam-se em uma estrutura granular no citoplasma, possivelmente para proteger a maquinaria de biossíntese de proteínas, ou mesmo evitar a desnaturação de proteínas causadas pela alta temperatura (WAHID et al, 2007). Contudo, alguns resultados sugerem que as HSP de alto peso molecular possuem uma função celular básica, mesmo na ausência de estresse, enquanto as HSP de baixo peso molecular estão diretamente relacionadas com a sobrevivência e recuperação de estresses térmicos, assim como processos específicos de desenvolvimento (WATERS et al., 1996).

Os genes que codificam as sHSP são um dos genes que são expressados rapidamente, pois transcrições de sHSP já foram observados após 10 minutos em casos de estresse por calor, na maioria dos casos (SARKAR et al. 2009).

Em plantas de ervilha (*Pisum sativum* L. var. Provence) quando transferidas de uma temperatura normal de crescimento de 25°C até 40°C por 3 h, foi observado que estas plantas induziram a produção e acúmulo de uma proteína de choque térmico de 22 kDa, pequena massa molecular aparente, designado HSP22, que se acumulou na matriz mitocondrial das folhas verdes (LENNE e DOUCE, 1994). Os

mesmos autores salientaram que a resposta ao choque térmico é rápida e pode ser detectada após 30 minutos de temperatura elevada, porém as HSP22 diminuíram muito lentamente após o retorno a condições normais. Mais tarde, Lenne et al (1995), relataram a presença destas proteínas nas mesmas condições descritas acima, em locais como raiz, demonstraram que o precursor HSP22 (ou seja, a proteína madura, mais o peptídeo de trânsito) tem uma massa molecular aparente de 26 kDa após a tradução *in vitro* de mRNA extraído do calor.

Sob estresse de calor as plantas acumulam altos níveis de pequenas proteínas mitocondriais de choque térmico (sHSP) (LIU e SHONO, 1999). Elas protegem o NADH: ubiquinona oxidoreductase da cadeia de transporte de elétrons durante o estresse por calor (NAUTIYAL et al. 2005).

Estudos realizados com soja revelaram que existe uma correlação entre a manutenção da fosforilação oxidativa e a presença de HSP entre 15 e 30kDa, mesmo quando mitocôndrias são submetidas a 42,5 °C (CHOU et al.,1989). Clarke e Critchley (1990), observaram que em, plantas C₄ (sorgo, milho e *Urochloa panicoides* L.), a inibição da síntese protéica pelo tratamento com cicloheximida, durante o choque térmico, promove uma diminuição drástica na eficiência da fotossíntese, sugerindo que a síntese de HSP tem um papel de proteção no cloroplasto.

5. CONCLUSÕES

Em resposta a baixa temperatura, os parâmetros que envolvem a relação oxidação e reoxidação do aceptor de elétrons do fotossistema II, o tempo para atingir a fluorescência máxima e os que descrevem a atividade do fotossistema I são os mais responsivos às condições impostas pelo frio, porém não se evidencia relação positiva efetiva entre a tolerância a este estresse com o nível de expressão das sHSP22 mitocondrial.

Para o estresse por alta temperatura, observou-se que a supreexpressão das sHSP22 mitocondrial resultou em menores efeito danosos sobre a atividade fotossintética, evidenciando um grau de tolerância atribuído a estas proteínas.

REFERÊNCIAS

- 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 Ciências da Vida Plant Molecular**, v. 2, n^o 6, p. 1310-1324, 2009.
- ALLAKHVERDIEV S.I.; KRESLAVSKI V.D.; KLIMOV V.V.; LOS D.A.; CARPENTIER R.; MOHANTY, P. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis, **Photosynthesis Research**, v. 98, p. 541–550, 2008.
- ALLEN, J. A.; PEZENSKY, S. R.; CHAMBERS, J. L. Interaction of flooding and salinity stress on balcypress (*Taxodium disticum*). **Tree Physiology**, v. 16, p. 307-313, 1996.
- 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.
- ARNHOLDT-SCHMITT, B.; COSTA, J.H.; MELO, D. AOX- a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 281–287, 2006.
- ARRUDA, G. M. T.; CALBO, M. E. R. Efeitos da inundação no crescimento, trocas gasosas e porosidade radicular da carnaúba (*Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore). **Acta Botanica Brasilica**, vol.18, n^o.2, p. 219-224, 2004.
- BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n^o. 403, p. 1607–1621, 2004.
- BANIWAL, S.K.; BHARTI, K.; CHAN, K.Y.; FAUTH, M.; GANGULI, A.; KOTAK, S.; MISHRA, S.K.; NOVER, L.; PORT, M.; SCHARF, K.D.; TRIPP, J.; WEBER, C.; ZIELINSKI, D.; KOSKULL-DORING, P. V. Heat stress response in plants: a

complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors, **Journal of Biosciences**, v. 29, p. 471–487, 2004.

BATISTA-SANTOS, P.; LIDON, F.C.; FORTUNATO, A.; LEITÃO, A.E.; LOPES, E.; PARTELLI, F.; RIBEIRO, A.I.; RAMALHO, J.C. The impact of cold on photosynthesis in genotypes of *Coffea* spp. — Photosystem sensitivity, photoprotective mechanisms and gene expression. **Journal of Plant Physiology**, v.168,p.792-806.2011.

BERRY, J.; BJÖRKMAN, O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 491–54, 1980.

BERTAMINI, M.; MUTHUCHELIAN, K.; RUBINIGG, M.; ZORER, R.; NEDUNCHEZHIAN, N. Low-night temperature (LNT) induced changes of photosynthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.) plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43 p. 693–699, 2005.

BUKHOV, N.G.; SABAT, S.C.; MOHANTY, P. Analysis of chlorophyll a fluorescence changes in weak light in heat treated *Amaranthus* chloroplasts, **Photosynthesis Research**, v. 23, p. 81–87, 1990.

BUKHOV, N. G.; WIESE, C.; NEIMANIS, S. E.; HEBER U. Heat sensitivity of chloroplasts and leaves: leakage of protons from thylakoids and reversible activation of cyclic electron transport, **Photosynthesis Research**, v. 59, p. 81–93, 1999.

BUKHOV, N. G.; GOVINDACHARY, S.; EGOROVA, E. A.; JOLY, D.; CARPENTIER, R. "N,N',N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine initiates the appearance of a well-resolved I peak in the kinetics of chlorophyll fluorescence rise in isolated thylakoids" **Biochemical Biophysical Acta**, v. 1607, p. 91-96, 2003.

BUSSOTTI, F.; NALI, C.; LORENZINI, G. Chlorophyll fluorescence: from theory to (good) practice. An introduction. **Environmental and Experimental Botany**, 2010.

CAMARGO FILHO, W. P.; DONADELLI, A.; SUEYOSHI, M. L. S.; CAMARGO, A. M. M. P. Evolução da produção de tomate no Brasil. **Agricultura em São Paulo**, SP, v. 41 p.41-69, 1994.

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.

CATUNDA, M. G.; FREITAS, S. P.; OLIVEIRA, J. G.; SILVA, C. M. M. Efeitos de Herbicidas na Atividade Fotossintética e no Crescimento de Abacaxi (*Ananas Comosus*). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 23, n. 1, p. 115-121, 2005.

CHEN, H. X.; AN, S. Z.; LI, W. J.; GAO, H. Y. Characterization of PSII photochemistry and thermostability in salt-treated *Rumex* leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p. 257–264. 2004.

- CHEN, S.; ZHOU, F.; YIN, C.; STRASSER, R. J.; YANG, C.; QIANG, S. Application of fast chlorophyll a fluorescence kinetics to probe action target of 3-acetyl-5-isopropyltetramic acid. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 269-279.2011.
- CHOU, M.; CHEN, Y.; LIN, C. Thermotolerance of Isolated Mitochondria Associated with Heat Shock Proteins. **Plant Physiology**, v. 89, p. 617-621, 1989.
- CLARKE, A.K.; CRITCHLEY, C. (1994) Characterization of chloroplast heat shock proteins in young leaves of C4 monocotyledons. **Physiologia Plantarum**, v. 92, p. 118–130, 1994.
- 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.
- DAI, F.; ZHOU, M.; ZHANG, G. The change of chlorophyll fluorescence parameters in winter barley during recovery after freezing shock and as affected by cold acclimation and irradiance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p.915-921,2007.
- DANTAS, B. F.; ARAGAO, C. A.; ALVES, J. D. Cálcio e o desenvolvimento de aerênquimas e atividade de celulase em plântulas de milho submetidas a hipoxia. **Scientia Agricola**, vol.58, n.2, p. 251-257, 2001.
- DAUGHTRY, C. S. T.; MCMURTREY III, J. E.; CHAPPELLE, E. W.; DULANEY, W. P.; IRONS, J. R.; SATTERWHITE, M. B. Potential for discriminating crop residues from soil by reflectance and fluorescence. **Agronomy Journal**, v. 87, p. 165–171, 1995.
- DIAS-FILHO, M. B.; CARVALHO, C. J. Physiological and morphological responses of *Brachiaria spp.* to flooding. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.1959-1966, 2000.
- DJANAGUIRAMAN, M.; SHEEBA, J. A.; DEVI, D. D.; BANGARUSAMY, U. Cotton leaf senescence can be delayed by nitrophenolate spray through enhanced antioxidant defense system. **Journal of Agronomy Crop Science**, v. 195, p. 213-224, 2009.
- DREW, M. C. Oxygen Deficiency And Root Metabolism: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 223-250, 1997.
- DUCRUET, M. H.; LERNOINE, Y. Increased heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in triazine – resistant bio types from different plant species. **Plant and Cell Physiology**, v. 26, p. 419-429, 1985.
- FARINHA, T. B.; ZSÖGÖN, A.; PERES, L. E. P. Breeding the Tomato Micro-Tom Model System for Ornamental Value Intl. *Eucarpia symp.* (Sec. Ornamentals) on

“Colourful Breeding and Genetics” Eds.: J.M. van Tuyl and D.P. de Vries **Acta Horticulturae**, 836, 2009.

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.

FIRMANO, R. S.; KUWAHARA, F. A.; SOUZA, G. M. Relação entre adubação fosfatada e deficiência hídrica em soja. **Ciência Rural**. vol.39, n.7, p. 1967-1973, 2009.

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

GIRAUD, E.; et al. The Absence Of Alternative Oxidase1a In *Arabidopsis* Results In Acute Sensitivity To Combined Light And Drought Stress. **Plant Physiology**, v. 147 p. 595–610, 2008.

HAN, F.; CHEN, H; LI, X.; YANG, M.; LIU, G.; SHEN, S. A comparative proteomic analysis of rice seedlings under various high-temperature stresses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 1625–1634, 2009.

HAVAUX, M.; CANAANI, O.; MALKI, S. Inhibition of photosynthetic activities under slow water stress measured *in vivo* by the protoacoustic method. **Physiologia Plantarum**, v. 70, p. 503-510, 1987.

HE, J. X.; WANG, J.; LIANG, H. G. Effects of water stress on photochemical function and protein metabolism of photosystem II in wheat leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 93, p. 771-777.

HECKATHORN, S. A.; DOWNS, C. A.; SHARKEY, T. D.; COLEMAN, J. S. The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. **Plant Physiology**. v.116, p. 439-444, 1998.

HENDRICKSON, L.; VLČKOVÁ, A.; SELSTAM, E.; HUNER, N.; ÖQUIST, G.; HURRY, V. Cold acclimation of the *Arabidopsis* *dgd1* mutant results in recovery from photosystem I-limited photosynthesis. **Federation of European Biochemical Societies - FEBS Letters**, v. 580, p. 4959-4968, 2006.

HIROTSU, N.; MAKINO, A.; USHIO, A.; MAE, T. Changes in the thermal dissipation and the electron flow in the water-water cycle in rice growing under conditions of physiologically low temperature. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 45, nº. 5, p. 635- 644, 2004.

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

- HORCHANI, F. S.; ASCHI-SMIT, R. BROUQUISSE. Involvement of nitrate reduction in the tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants to prolonged root hypoxia. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, p. 1113-1123, 2010.
- HORCHANI, F.; KHAYATI, H.; RAYMOND, P.; BROUQUISSE, R.; ASCHI-SMITI, S. Contrasted effects of prolonged root hypoxia on tomato root and fruit (*Solanum lycopersicum*) metabolism. **Journal of Agronomy and Crop Science** v. 195 n^o. 4 p. 313-318, 2009.
- HORCHANI, F.; GALLUSCI, P.; BALDET, P.; et al. Prolonged root hypoxia induces ammonium accumulation and decreases the nutritional quality of tomato fruits Journal of plant physiology. **Journal of Plant Physiology**. v. 165, p. 1352-1359, 2008.
- HUNER, N. P. A.; ÖQUIST, G.; SARHAN F. Energy balance and acclimation to light and cold. **Trends in Plant Science**, v. 3, p.224-230, 1998.
- IBA, K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 225–24, 2002.
- KOUŘIL, R.; ILÍKA, P.; TOMEKA, P.; NAUŠA, J. A. N.; POULÍČKOVÁB, A. Chlorophyll fluorescence temperature curve on *Klebsormidium flaccidum* cultivated at different temperature regimes **Journal of Plant Physiology**. v. 158, p. 1131–1136, 2001.
- KOŮRIL, R.; LAZÁR, D.; ILÍK, P.; SKOTNICA, J.; KRCÍNAK, P.; NAUŠ, J. High-Temperature Induced Chlorophyll Fluorescence Rise in Plants at 40–50°C: Experimental and Theoretical Approach. **Photosynthesis Research**. v.81 , p.49-66, 2004.
- KOZLOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology Monograph**, v. 1, p. 1-29, 1997.
- KRIZEK, D. T.; MIDDLETON, E. M.; SANDHU, R. K.; KIM, M. S. Evaluating UV-B effects and EDU protection in cucumber leaves using fluorescence images and fluorescence emission spectra. **Journal of Plant Physiology**. v. 158. p. 41–53, 2001.
- LAZÁR, D. The Polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. **Functional Plant Biology**. v. 33, p. 9-30, 2006.
- 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, M. A.; GARIN, J.; DOUCE, R. Sequence and expression of the mRNA encoding HSP22, the mitochondrial small heat-shock protein in pea leaves. **Biochemical Journal**, v.311, 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.
- LIAO, C. T.; LIN, C.H. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. **Proceedings of the National Science Council**. v.25, p.148-157, 2001.
- LIN, C-Y.; ROBERTS, J. K.; KEY, J. L. Acquisition os thermotolerance in soybean seedling, synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. **Plant Physiology**, v.74, p.152-160, 1984.
- 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.
- LU, C.; ZHANG, J.; ZHANG, Q.; LI, L.; KUANG, T. Modification of photosystem II photochemistry in nitrogen deficient maize and wheat plants **Journal of Plant Physiology**. v. 158. p. 1423–1430, 2001.
- LU, C.; ZHANG, J. Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. Related searches for **Journal of Experimental Botany**. v. 50, nº. 336, p. 1199–1206, 1999.
- MAGALHÃES, P. C.; COELHO, C. H. M.; GAMA, E. E. G.; BORÉM, A. Avaliação dos ciclos de seleção da variedade BRS 4154 – Saracura para tolerância ao encharcamento do solo. **Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica**, p. 67, 2005.
- MAGALHÃES, P. C.; et al. Avaliação das modificações morfológicas radiculares durante os ciclos de seleção do milho Saracura tolerante a hipóxia. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo**, p. 1217-1981, 2009.
- MARTÍ, E.; GISBERT, C. B. G. J.; DIXON, M S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. L. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Oxford Journals Life Sciences Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 2037-2047, 2006.
- MATTOS, J. L. S.; GOMIDE, J. A.; HUAMAN, C. A. M. Y. Crescimento de Espécies do Gênero *Brachiaria* sob Alagamento em Casa de Vegetação. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.34, n.3, p.765-773, 2005.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Fluorescence of chlorophyll-a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 659-668, 2000.
- 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**, vol.33, n.5, p. 1213-1219, 2009.

- MISRA, A. N.; SRIVASTAVA, A.; STRASSER, R. J. Utilization of fast chlorophyll a fluorescence technique in assessing the salt/ion sensitivity of mung bean and Brassica seedlings. **Journal of Plant Physiology**. v. 158, p. 1173-1181, 2001.
- MORROW, G.; INAGUMA, Y.; KATO, R. M. T. The Small Heat Shock Protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster* Is a Mitochondrial Protein Displaying Oligomeric Organization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 31204-31210, 2000.
- MORSY, M.; ABEER, M.; GIBBONS, J.; SONG, Y.; DE LOS REYES, B. The OsLti6 genes encoding low-molecular weight membrane proteins are differentially expressed in rice cultivars with contrasting sensitivity to low temperature. **Gene**, Amsterdam, v. 344, p. 171-180, 2005.
- NAUMANN, J. C.; YOUNG, D. R.; ANDERSON, J. E. Leaf chlorophyll fluorescence, reflectance, and physiological response to freshwater and saltwater flooding in the evergreen shrub, *Myrica cerifera*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 3, p.402–409,2008.
- NAUTIYAL, P. C. I.; SHONO, M.; EGAWA, Y. Enhanced thermotolerance of the vegetative part of MT-sHSP transgenic tomato line. **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 393-409, 2005.
- NOGUEIRA, R. J. M. C.; SILVA JR., J. F. Resistência estomática, tensão de água no xilema e teor de clorofila em genótipos de gravioleira. **Scientia Agricola**, v. 58, nº 3, p. 491-495, 2001.
- OGWENO, J., SONG, X.; HU, W.; SHI, K.; ZHOU, Y.; YU, J. Detached leaves of tomato differ in their photosynthetic physiological response to moderate high and low temperature stress. **Scientia Horticulturae**, v. 123, p. 17-22, 2009.
- PANDA, D.; RAO, D. N.; SHARMA, S. G.; STRASSER, R. J.; SARKAR, R. K. Submergence effects on rice genotypes during seedling stage: Probing of submergence driven changes of photosystem 2 by chlorophyll a fluorescence induction O-J-I-P transients. **Photosynthetica**. v. 44, p. 69-75, 2006.
- PAPAGEORGIOU, C. G.; GOVINDJEE. Photosystem II fluorescence: Slow changes – Scaling from the past. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 104, p.258-270, 2011.
- PIETRINI, F.; CHAUDHURI, D.; THAPLIYAL, A. P.; MASSACCI, A. Analysis of chlorophyll fluorescence transients in mandarin leaves during a photo-oxidative cold shock and recovery. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 106, p.189-198,2005.
- POSPÍŠIL, P.; DAU, H. Chlorophyll fluorescence transiente of photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution. **Photosynthesis Research**, v. 65, p. 41-52, 2000.

- PRECZEWSKI, P. J.; HECKATHORN S. A.; DOWNS C. A.; COLEMAN, J. S. Photosynthetic thermo-tolerance is quantitatively and positively correlated with production of specific heat-shock proteins among nine genotypes of *Lycopersicon* (tomato). **Photosynthetica**, v. 38, p. 127-134, 2000.
- RAPACZ, M. Frost resistance and cold acclimation abilities of spring-type oilseed rape. **Plant Science**, v. 147, p. 55-64, 1999.
- RICHARDS, J. T.; SCHUERGER, A. C.; CAPELLE, G.; GUIKEMA, J. A. Laser-induced fluorescence spectroscopy of dark- and light-adapted bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) plants grown under three irradiance levels and subjected to fluctuating lighting conditions. **Remote Sensing of Environment**, v. 84, p. 323–341, 2003.
- 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.
- SCHANSKER, G.; TÓTH, S.Z.; STRASSER. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v.1706, p. 250-261, 2005.
- SHONO, M.; LIU, J. The function of tomato mitochondrial small heat shock protein under heat stress conditions. JIRCAS: Japan International **Research Center For Agricultural Sciences**. Research Highlights, 2001.
- 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(2), p. 183–197, 2008.
- SIEGENTHALER, P. A.; TRÉMOLIÈRES, A. Role of acyl lipids in the function of photosynthetic membranes in higher plants. In: Siegenthaler, P.-A., Murata, N. (Eds.), *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*, Series **Advances in Photosynthesis**, v. 6. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 145-173, 1998.
- SKOTNICA, J.; MATOUŠKOVÁ, M.; NAUŠ, J.; LAZAR, D.; DVORAK, L. Thermoluminescence and fluorescence study of changes in Photosystem II photochemistry in desiccating barley leaves. **Photosynthesis Research** v. 65, p.29–40, 2000.
- SMETHURST, C. F; SHABALA, S. Screening methods for waterlogging tolerance in lucerne: comparative analysis of waterlogging effects on chlorophyll fluorescence, photosynthesis, biomass and chlorophyll content. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 335–343, 2003.
- SOUSA, C. A. F.; SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 14, nº 2, p. 83-94, 2002.

- STIRBET, A.; GOVINDJEE; STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Chlorophylla Fluorescence Induction in Higher Plants: Modelling and Numerical Simulation. **Journal of Theoretical Biology**, v. 193, p. 131-15, 1998.
- STIRBET, A.; GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104, p. 236-257, 2011.
- STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A; TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: **Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation**. M. Yunus. U. Pathre, P. Mohanty (eds.), Taylor & Francis. London. GB. p. 445-483, London, 2000.
- STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transient to address environmental questions: The JIP-test. In: MATHIS, P. (Ed.), **Photosynthesis: from light to biosphere**, Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, The Netherlands, p. 977-980, 1995.
- STRASSER, B. J. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. **Photosynthesis Research**. v. 52, p. 147–155, 1997.
- 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.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Structure function relationship in the photosynthetic apparatus: a biophysical approach. In: **Biophysical Processes in Living Systems**, Pardha Saradhi P (ed) Science Publishers, Inc. Enfield (NH), USA, Chapter 16, p. 271 – 303, 2001.
- STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the fluorescence transient In: PAPAGEORGIOU, G. C.; GOVINDJEE, (Eds.), **Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis**. Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Springer: Dordrecht, p. 321-362, 2004.
- 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 (BBA) – Bioenergetics**, v. 1797, p.1313-1326, 2010.
- 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.
- TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. *In vivo* assessment of plants vitality: applications in detecting and evaluating the impact of Mycorrhization on host

- plants. In: VARMA, A. (Ed.), **Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics**, 3rd edition Springer, Dordrecht, p. 679-703, 2008.
- TÜRKAN, I.; DEMIRA, T. I. Recent developments in understanding salinity tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 1, p. 2-9, Elsevier, 2009.
- VIERLING, E. The role of heat shock proteins in plants. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 579-620, 1991.
- VODNIK, D.; STRAJNAR, P.; JEMC, S.; MACEK, I. Respiratory potential of maize (*Zea mays* L.) roots exposed to hypoxia. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v. 65, n° 1, p. 107-110, 2009.
- 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.
- WATANABE, S.; TSUYOSHI, M.; KOH, A.; YASUTAKA, K.; HITOSHI, M.; SHUNSUKE, I.; YUKIKO, Y.; DAISUKE, S.; HIROSHI, E. Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. **Plant Biotechnology**, v. 24, p. 33–38, 2007.
- WATERS, E. R.; LEE, G. J.; VIERLING, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 325–338, 1996.
- WORONUK, G.; VIJAYAN, P.; LABERGE, S.; VANDENBERG, B.; BETT, K. Transcriptomic analysis of chilling stress in *Phaseolus* spp. **Environmental and Experimental Botany**, v. 69, p. 95–104, 2010.
- YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE, SARIN, N. B. Overexpression of γ -totoopherol 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.
- ZRIBI, L.; GHARBI, F.; REZGUI, F.; SALWA, R.; HASSAN, N.; MOHAMED, R. N. Application of chlorophyll fluorescence for the diagnosis of salt stress in tomato "*Solanum lycopersicum* (variety Rio Grande)" **Scientia Horticulturae**, v. 120, p. 367-372, 2009.

ANEXO 1

A transformação das plantas de tomate cv. Micro-Tom transformadas com cDNA da sHSP22 mitocondrial, foi realizada através do tecido epidérmico das folhas desta cultivar, sendo os tecidos mitocondriais preservados. A técnica utilizada foi “immunocapture PCR” (Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia de Polimerase) ou de “immunocapture RT-PCR” (uma variação/mistura da técnica de PCR), que é um método sensível para a detecção dos níveis de expressão do mRNA. A transformação da sHSP22 mitocondrial foi feita com cDNA (proteínas), através da união dos nucleotídeos com a sequência específica dos *primers* requeridos, e esta união foi realizada através da referida técnica de PCR – cópias de uma sequência de ácidos nucleicos. Posteriormente as alíquotas do produto das amplificações, foram analisadas em eletroforese, como demonstra a Figura 1A, que ilustra o acúmulo de RNAm da referida proteína, evidenciando onde mais se concentra a possível expressão destas proteínas.

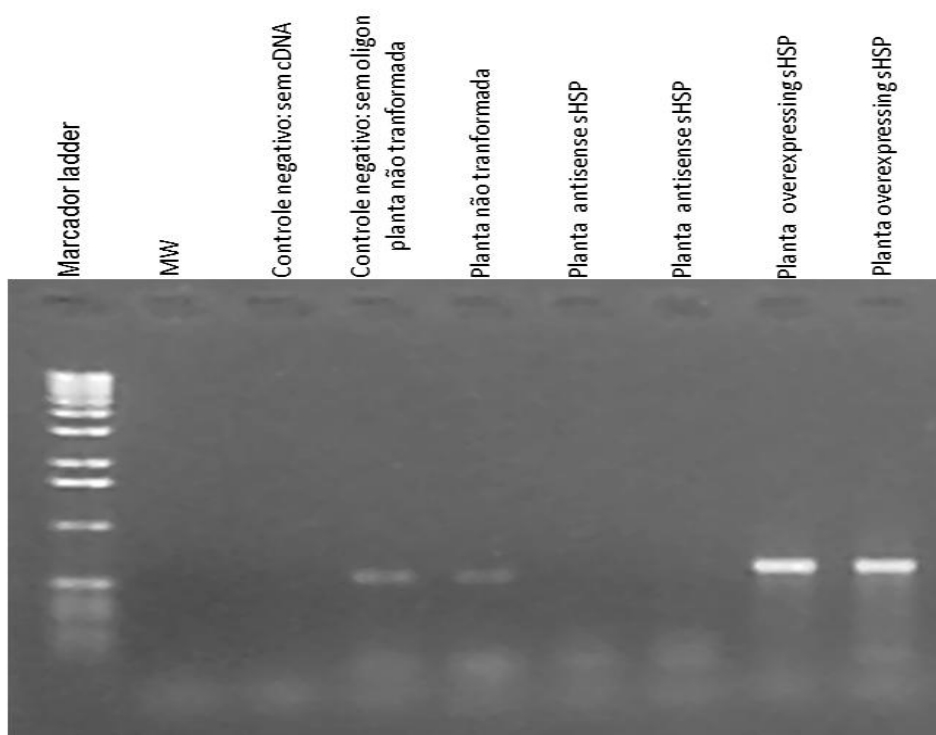


Figura 1A – Padrões de amplificação de alelos-S obtidos com os *primers* no tomate cv. Micro-Tom. (Gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi).