

INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS - AGRONOMIA

**ESTRESSES ABIÓTICOS EM MICROTOMATEIROS:
ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
ANATÔMICAS**

Autora: Ariana Bertola Carnevale
Orientador: DSc. Alan Carlos da Costa

Rio Verde - GO
Agosto – 2021

INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS - AGRONOMIA

**ESTRESSES ABIÓTICOS EM MICROTOMATEIROS:
ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
ANATÔMICAS**

Autora: Ariana Bertola Carnevale
Orientador: DSc. Alan Carlos da Costa

Tese apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, Área de Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

Rio Verde - GO
Agosto – 2021

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

C289e Carnevale, Ariana Bertola
Estresses abióticos em microtomateiros: alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas / Ariana Bertola Carnevale; orientador Alan Carlos da Costa; co-orientador Adinan Alves da Silva. -- Rio Verde, 2021.
80 p.

Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2021.

1. Solanacea. 2. micro-tom. 3. alta irradiância. 4. déficit hídrico. 5. alta temperatura. I. Carlos da Costa, Alan, orient. II. Alves da Silva, Adinan , co-orient. III. Título.



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- Tese
 Dissertação
 Monografia – Especialização
 TCC - Graduação
 Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____
- Artigo Científico
 Capítulo de Livro
 Livro
 Trabalho Apresentado em Evento

Nome Completo do Autor: Ariana Bertola Carnevale

Matrícula: 2017102320140041

Título do Trabalho: Estresses abióticos em microtomateiros: alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: há informações originais que estão em processo de publicação em periódicos científicos.

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 04/11/2023

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não
O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, 04 de novembro de 2021.
Local Data

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Prof. Dr. Alan Carlos da Costa - orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 77/2021 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

ATA Nº/80 BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE TESE

Aos vinte e sete dias do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e um, às 14:00h (quatorze horas), reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof. Dr. Alan Carlos da Costa (Orientador), Prof. Dr. Marconi Batista Teixeira (Avaliador interno), Prof. Dr. Márcio Rosa (Avaliador externo), Prof.ª Dra. Fabia Barbosa da Silva (Avaliadora interna), Prof. Dr. Adriano Jakelaitis (Avaliador interno), sob a presidência do(a) primeiro(a), em sessão pública realizada por vídeo conferência do IF Goiano – Campus Rio Verde, para procederem a avaliação da defesa de Tese, em nível de Doutorado, de autoria de **ARIANA BERTOLA CARNEVALE**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A sessão foi aberta pelo(a) presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. Alan Carlos da Costa, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida o(a) autor (a) da Tese para, em 40 min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o(a) examinado(a), tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, e procedidas às correções recomendadas, a Tese foi **APROVADA**, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **DOUTOR(a) EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA**, na área de concentração Produção Vegetal Sustentável no Cerrado, pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGCA-AGRO da versão definitiva da Tese, com as devidas correções. Assim sendo, a defesa da tese perderá a validade se não cumprida essa condição, em até **60** (sessenta) dias da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa Tese em periódicos de circulação nacional e/ou internacional, após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Tese de Doutorado, e para constar, eu, Vanilda Maria Campos, secretária do PPGCA-AGRO, lavrei a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.

Prof. Dr. Alan Carlos da Costa (Presidente)

Prof. Dr. Marconi Batista Teixeira (Avaliador interno)

Prof. Dr. Márcio Rosa (Avaliador externo)

Prof.ª Dra. Fabia Barbosa da Silva (Avaliadora interna)

Prof. Dr. Adriano Jakelaitis (Avaliador interno)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 90/2021 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

**ESTRESSES ABIÓTICOS EM MICROTOMATEIROS: ALTERAÇÕES
FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E ANATÔMICAS.**

Autora: Ariana Bertola Carnevale
Orientador: Dr. Alan Carlos da Costa

TITULAÇÃO: Doutorado em Ciências Agrárias - Agronomia - Área de
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADO em, 27 de agosto de 2021.

Prof. Dr. Alan Carlos da Costa (Presidente)
Prof. Dr. Marconi Batista Teixeira (Avaliador interno)
Prof. Dr. Márcio Rosa (Avaliador externo)
Prof.^a Dr. Fabia Barbosa da Silva (Avaliadora externa)
Prof. Dr. Adriano Jakelaitis (Avaliador interno)

Documento assinado eletronicamente por:

- Fábيا Barbosa da Silva, Fábيا Barbosa da Silva - Membro externo - Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde (10651417000500), em 30/08/2021 22:44:17.
- Adriano Jakelaitis, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 27/08/2021 22:13:44.
- Márcio Rosa, Márcio Rosa - Professor Avaliador de Banca - Universidade de Rio Verde (01815216000178), em 27/08/2021 18:08:58.
- Marconi Batista Teixeira, COORDENADOR DE CURSO - FUC1 - UCPG-RV, em 27/08/2021 18:08:44.
- Alan Carlos da Costa, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 27/08/2021 18:04:21.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 24/08/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 302521
Código de Autenticação: 645aa49b36



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3620-5600

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

**ESTRESSES ABIÓTICOS EM MICROTOMATEIROS:
ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
ANATÔMICAS**

Autora: Ariana Bertola Carnevale
Orientador: Dr. Alan Carlos da Costa

TITULAÇÃO: Doutor(a) em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de Concentração
em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

Aprovado em 27 de agosto de 2021.

Prof. Dr. Márcio Rosa
Avaliador externo
Universidade de Rio Verde (UniRV)

Prof. Dra. Fábيا Barbosa da Silva
Avaliadora interna
IF Goiano – Campus Rio Verde

Prof. Dr. Marconi Batista Teixeira
Avaliador interno
IF Goiano – Campus Rio Verde

Prof. Dr. Adriano Jakelaitis
Avaliador interno
IF Goiano – Campus Rio Verde

Prof. Dr. Alan Carlos da Costa
Presidente
IF Goiano – Campus Rio Verde

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, sabedoria, força e mais esta importante vitória.

À minha Família de Minas e de Mineiros, por serem minha maior escola, por todo amor, carinho, incentivo, confiança e apoio incondicional, sempre estando ao meu lado em tudo que escolhi e ser meu porto seguro. Pelo exemplo de sabedoria, humildade, dedicação, perseverança.

Aos meus amigos de Mineiros, pelo carinho e compreensão durante o período que estive ausente. Aos novos amigos de Rio Verde, e àqueles que reencontrei, gratidão por me escutar, apoiar e proporcionar momentos de alegria e relaxamento.

Ao meu orientador Professor Alan Carlos da Costa, pela oportunidade e ensinamentos transmitidos.

Aos meus coorientadores Priscila Ferreira Batista e Adinan Alves da Silva, não tenho como expressar meu agradecimento a vocês. Quanta paciência e dedicação, quantos conhecimentos transmitidos, quanto carinho, como crescemos juntos e aprendemos a nos respeitar, cada uma dentro das suas limitações. Priscila com sua objetividade e determinação me fizeram seguir em frente e vencer vários medos, boas conversas, risadas, e momentos de descontração me permitiram continuar nos momentos mais turbulentos. Adinan, sua calma e repetição me fizeram pensar sobre os detalhes de cada etapa realizada, quantas vezes quis sair correndo, mais aos poucos fomos nos conhecendo e entendi o quanto sua postura era importante na realização dos experimentos.

A Emily, por sua dedicação, paciência e disposição em ajudar em todos os momentos necessários.

A todos do Laboratório de Ecofisiologia, que participaram da minha história, nestes quatro anos e meio, quanto conversamos, choramos, rimos, comemos, nos

reunimos nos mais variados momentos. Muitos vão ficar na minha vida, de muitos me lembrarei com carinho e agradecimento.

Agradeço aos membros da banca, pelas contribuições e por terem aceito o convite, meu muito obrigada.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, pela oportunidade de realização do doutorado. Às demais agências de fomento, pelo apoio financeiro para a execução dos projetos de pesquisa.

A todos meus colegas e amigos de pós-graduação e do Instituto Federal Goiano, pela amizade, companheirismo e pelo compartilhamento de conhecimentos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação do IF Goiano, pela dedicação e ensinamentos repassados durante toda minha jornada de acadêmica.

Ao Centro Universitário de Mineiros (UNIFIMES), pela concessão da bolsa, pela liberação para cursar o período das disciplinas presenciais e por todas as vezes que precisei me ausentar, obrigada!

E por fim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que este estudo se tornasse realidade, **MUITO OBRIGADA.**

BIOGRAFIA DA AUTORA

ARIANA BERTOLA CARNEVALE, filha de Dulcinea Bertola Carnevale e Luciano Carnevale (*in memoriam*), nasceu dia 04 de dezembro de 1974, na cidade de Barbacena, Minas Gerais.

Técnica em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Barbacena (1992), possui graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras (1999). Mestrado em Agronomia (Entomologia) pela Universidade Federal de Lavras (2002). Neste mesmo ano, iniciou suas atividades como docente na Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior (FIMES), atualmente Centro Universitário de Mineiros (UNIFIMES), onde atua até o presente momento.

Em 2017, iniciou no curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

ÍNDICE

	Página
1 INTRODUÇÃO GERAL	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
2. OBJETIVO	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. CAPÍTULO I	22
Estresse combinado afeta microtomateiros fotomorfogênicos	22
RESUMO	22
ABSTRACT	23
1.Introdução	24
1.2 Material e Métodos	26
2.2.1. Material vegetal e condições experimentais	26
2.2.2 Delineamento experimental e análises estatísticas	27
2.2.3 Avaliações	27
2.2.3.1 Relações hídricas e osmóticas	27
2.2.3.2 Trocas Gasosas	28
2.2.3.2.1 Fluorescência da clorofila a	28
2.2.3.3 Concentração de malonaldeído (MDA) foliar	29
2.2.3.5 Concentração de prolina	29
2.2.3.6 Extração enzimática	30
2.2.3.6.1 Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD-EC1.15.1.1)	30
2.2.3.6.2 Determinação da atividade da catalase (CAT-EC 1.11.1.6)	30
2.2.3.6.3 Determinação da atividade da peroxidase (POX-EC 1.11.1.7)	30
2.2.3.7 Concentração de pigmentos foliares	31
3. Resultados	32
4.Discussão	39
5.Conclusão	43
6.Referências	43
4. CAPÍTULO II	48
Efeito da irradiância e temperatura em microtomateiros fotomorfogênicos	48
RESUMO	48
ABSTRACT	49
1 Introdução	51
2. Material e Métodos	53
2.1 Material vegetal, desenho experimental e condições experimentais	53

2.2 Delineamento experimental e análises estatísticas	54
2.3 Detalhamento das avaliações	54
2.3.1 Trocas Gasosas	54
2.3.2 Fluorescência da clorofila a	54
2.3.3 Caracterização da micromorfometria foliar	55
2.3.4 Concentração de pigmentos foliares	56
2.3.5 Determinação de proteínas totais	56
2.3.6 Concentração de malonaldeído (MDA) foliar	56
2.3.7 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes	57
3.Resultados	58
4.Discussão	68
5.Conclusão.....	73
6.Referências.....	73
CONCLUSÃO GERAL.....	78

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I	22
Tabela 1. Análise de variância de acordo com rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_M), rendimento quântico da dissipação regulada de energia (Y_{NPQ}) e rendimento quântico da dissipação não regulada de energia (Y_{NO}) de 2 genótipos de microtomateiros: <i>wt</i> e <i>hpl</i> , submetidos a 2 condições contrastantes: controle e estresse, 7 DAI dos tratamentos	34
Tabela 2. Concentrações de malondialdeído (MDA) e prolina, atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) e catalase (CAT) de 2 genótipos de microtomateiros: <i>wt</i> e <i>hpl</i> , submetidos a 2 condições contrastantes: controle e estresse, 7 DAI dos tratamentos.....	35
Tabela 03. Micromorfometria da epiderme adaxial (Ep. Ad.) e abaxial (Ep. Ab.), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE) e mesófilo (Me) de 2 genótipos de microtomateiros: <i>wt</i> e <i>hpl</i> , submetidos a 2 condições contrastantes: controle e estresse, aos 7 DAI dos tratamentos.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I	22
Figura 01. Potencial hídrico (Ψ_w , A) e potencial osmótico (Ψ_s , B) de dois genótipos de microtomateiros: wt e <i>hpl</i> , submetidos a duas condições contrastantes: controle e estresse, 7 dias após a imposição dos tratamentos (DAI). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados são médias \pm EP ($n=5$).....	32
Figura 02. Taxa fotossintética (A, A), taxa transpiratória (E, B), condutância estomática (g_s , C), razão entre a concentração interna e externa de CO ₂ (C_i/C_a , D) e eficiência intrínseca do uso da água (EiUA, E) de 2 genótipos de microtomateiros: WT e <i>hpl</i> , submetidos a 2 condições contrastantes: controle e estresse, 7 DAI dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados são médias \pm EP ($n=5$)	33
Figura 3. Rendimento quântico efetivo do fotossistema II [Y_{II}], A] e taxa de transporte de elétrons (ETR; B) de 2 genótipos de microtomateiros: wt e <i>hpl</i> , submetidos a 2 condições contrastantes: controle e estresse, 7 DAI dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados são médias \pm EP ($n=5$)	34
Figura 4. Atividade da enzima peroxidase (POX, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) de 2 genótipos de microtomateiros: wt e <i>hpl</i> (A), submetidos a 2 condições contrastantes: controle e estresse (B), 7 DAI dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados são médias \pm EP ($n=5$)..	35
Figura 05. Clorofila <i>a</i> (Cl <i>a</i> , A), Clorofila <i>b</i> (Cl <i>b</i> , B) e clorofilas totais (Cl _t , C) Carotenoides (Crt, D) de dois genótipos de microtomateiros: wt e <i>hpl</i> , submetidos a duas condições contrastantes: controle e estresse, 7 DAI dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados são médias \pm EP ($n=5$)	36

Figura 6. Dendrograma associado com *heatmap* para características anatômicas fisiológicas e bioquímicas de 2 genótipos de microtomateiros: wt e *hp1*, submetidos a 2 condições contrastantes: controle e estresse, aos 7 DAI dos tratamentos38

CAPÍTULO II48

Figura 01. Clorofila *a* (A), Clorofila *b* (B) e clorofilas totais (C) Carotenoides (D) de microtomateiros submetida a interação entre diferentes genótipos (*au*, *hp1*, *hp2* e wt), juntamente com diferentes condições de cultivo (1: Controle - CONT; 2: Alta irradiância - AI; 3: Alta temperatura - AT; 4: Combinada - AI+AT). Os dados são médias ± EP (n=4). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de uma mesma condição, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para o mesmo genótipo entre as condições (Tukey, $p < 0,05$)59

Figura 02. Taxa fotossintética (A_n), condutância estomática (g_s), taxa transpiratória (E) e razão entre a concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a) de microtomateiros submetidos ao fator isolado condições de cultivo (1: Controle - CONT; 2: Alta irradiância - AI; 3: Alta temperatura - AT; 4: Combinada - AI+AT).....59

Figura 03. Rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm, A), taxa de transporte de elétrons (ETR, B) Taxa fotossintética (A_n), condutância estomática (g_s), taxa transpiratória (E) e razão entre a concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a) de microtomateiros submetidos ao fator isolado condições de cultivo (1: Controle -CONT; 2: Alta irradiância - AI; 3: Alta temperatura - AT; 4: Combinada - AI+AT) 60

Figura 04. Índice estomático adaxial (A) e densidade estomática adaxial (B) de microtomateiros submetidos ao fator isolado genótipo (1 - *au*, 2 - *hp1*, 3 - *hp2* e 4 - wt). Os dados são médias ± EP (n=16). Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..62

Figura 05. Espessura (µm) da epiderme adaxial (Ep. Ad.; A), abaxial (Ep. Ab.; B), parênquima paliçádico (PP, C), parênquima esponjoso (PE, D) e mesofilo (Me, E) de microtomateiros submetida a interação entre diferentes genótipos (*au*, *hp1*, *hp2* e wt), juntamente com diferentes condições de cultivo (1: Controle - CONT; 2: Alta irradiância - AI; 3: Alta temperatura - AT; 4: Combinada - AI+AT). Os dados são médias ± EP (n=4). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de uma mesma condição, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para o mesmo genótipo entre as condições (Tukey, $p < 0,05$)64

Figura 06. Concentração de malonaldeído (MDA) de microtomateiros submetida a interação entre diferentes genótipos (*au*, *hp1*, *hp2* e wt), juntamente com diferentes condições de cultivo (1: Controle - CONT; 2: Alta irradiância - AI; 3: Alta temperatura - AT; 4: Combinada - AI+AT). Os dados são médias ± EP (n=4). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de uma mesma condição, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para o mesmo genótipo entre as condições (Tukey, $p < 0,05$) 65

Figura 07. Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD, A), catalase (CAT, B), peroxidase do ascorbato (APX, C), peroxidase (POX, D) de microtomateiros submetida a interação entre diferentes genótipos (*au*, *hp1*, *hp2* e *wt*), juntamente com diferentes condições de cultivo (1: Controle - CONT; 2: Alta irradiância - AI; 3: Alta temperatura - AT; 4: Combinada - AI+AT). Os dados são médias \pm EP (n=4). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de uma mesma condição, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para o mesmo genótipo entre as condições (Tukey, $p < 0,05$) 66

Figura 08. Proteínas de microtomateiros submetida a interação entre diferentes genótipos (*au*, *hp1*, *hp2* e *wt*), juntamente com diferentes condições de cultivo (1: Controle - CONT; 2: Alta irradiância - AI; 3: Alta temperatura - AT; 4: Combinada - AI+AT). Os dados são médias \pm EP (n=4). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de uma mesma condição, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para o mesmo genótipo entre as condições (Tukey, $p < 0,05$) 68

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E UNIDADES

<i>A</i>	Taxa fotossintética	($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
<i>Cl a</i>	Clorofila <i>a</i>	($\mu\text{g cm}^{-2}$)
<i>Cl b</i>	Clorofila <i>b</i>	($\mu\text{g cm}^{-2}$)
CO_2	Dióxido de carbono	
<i>E</i>	Taxa transpiratória	($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
ETR	Taxa de transporte de elétrons	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
F_0	Fluorescência inicial	
FSII	Fotossistema II	
F_v/F_m	Rendimento quântico potencial do fotossistema II	
g_s	Condutância estomática	($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio	
MDA	Malonaldeído	(mmol/g MF)
TBA	Ácido tiobarbitúrico	
TCA	Ácido tricloroacético	
SOD	Dismutase do superóxido	
CAT	Catalase	
APX	Peroxidase do ascorbato	
POX	Peroxidase	
Ψ_w	Potencial hídrico	
CRA	Conteúdo relativo de água	
TLE	Taxa de liberação de eletrólitos	
<i>ETR/A</i>	Relação entre taxa aparente de transporte de elétrons e assimilação de CO_2	
Y_{NPQ}	Coefficiente de extinção não fotoquímica	
Φ_{PSII}	Rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no FSII	
AdEp	Epiderme adaxial	
AbEp	Epiderme abaxial	
PP	Parênquimas paliçádico	
PE	Parênquima esponjoso	
Me	Espessura do mesofilo	

RESUMO GERAL

CARNEVALE, ARIANA BERTOLA. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, agosto de 2021. **Estresses abióticos em microtomateiros: alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas.** Orientador: DSc. Alan Carlos da Costa. Coorientadores: DSc. Priscila Ferreira Batista, DSc. Adinan Alves da Silva.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar efeitos de estresses abióticos isolados e combinados em microtomateiros mutantes fotomorfogênicos e suas alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas. Para tanto, dois estudos foram conduzidos de forma independente. O primeiro foi em blocos ao acaso, esquema fatorial 2 x 2, sendo utilizados 2 genótipos de microtomateiro (wt selvagem e mutante - *high pigment1*- *hp1*) e 2 condições (Controle - 100% CC + 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e estresse - 40% CC + 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). No segundo estudo, utilizou-se 4 genótipos (um selvagem, wt e 3 mutantes, *aurea*, *hp1* e *hp2*), submetidos a 4 condições - 1) Controle (CONT), 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 25/20 °C; 2) Alta irradiância (AI), 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 25/20 °C; 3) Alta temperatura (AT), 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 40/20 °C; 4) Estresse combinado (AI+AT), 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 40/20 °C. Foram analisados os potenciais hídrico e osmótico, as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila *a*, as concentrações de prolina e malonaldeído (MDA), a atividade de enzimas antioxidantes, teores de pigmentos cloroplastídicos e de proteínas e a anatomia foliar. No Capítulo I, as combinações de alta irradiância e déficit hídrico acarretaram mudanças nos genótipos wt e *hp1*. Foi verificado que o *hp1* mesmo possuindo maior conteúdo de pigmentos cloroplastídicos em relação ao wt, não apresentou melhor desempenho fotossintético, havendo inclusive, decréscimo nas trocas gasosas diante dos estresses combinados. Os mecanismos de defesa do *hp1* não foram

ativados de forma efetiva, não sendo este genótipo capaz de minimizar o efeito do estresse combinado. Houve ajustes anatômicos aos estresses combinados, em que o wt sobressaiu em relação ao *hpl* para as características de espessuras do parênquima esponjoso e do mesofilo. A maioria das variáveis deste estudo não diferiram entre os genótipos de microtomateiros, mas somente para as condições impostas. O wt induziu maior número de mecanismos de defesa em resposta ao estresse, e o mutante *hpl* mostrou-se mais suscetível às condições de estresse impostas. No Capítulo II, as variáveis de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* não apresentaram interação significativa entre genótipos e condições, mas somente para o fator isolado condições. O índice estomático e a densidade estomática adaxial apresentaram diferença significativa para o fator isolado genótipos. Houve interação significativa entre genótipos e condições para a micromorfometria da epiderme, teores de pigmentos cloroplastídicos, de proteínas, de MDA e na atividade das enzimas do sistema antioxidante. Os resultados obtidos mostraram que a alta temperatura promoveu danos ao metabolismo das plantas de microtomateiros, mas, a alta irradiância contribuiu para reverter tais danos, sendo essa reposita observada quando estas condições foram impostas de forma combinadas. Ao serem expostos de forma isolada às condições do estudo, os genótipos mutantes desenvolveram diferentes estratégias de aclimação e/ou defesa, procurando superar os estresses.

PALAVRAS-CHAVE: *Solanacea*, micro-tom, alta irradiância, déficit hídrico, alta temperatura.

ABSTRACT

CARNEVALE, ARIANA BERTOLA. Goiano Federal Institute (Instituto Federal Goiano), Rio Verde Campus, Goiás State (GO), Brazil, August 2021. **Isolated and combined abiotic stresses on micro tomato plants:** physiological, biochemical, and anatomical changes. Advisor: Prof. DSc. Costa, Alan Carlos. Co-advisors: Prof. DSc. Batista, Priscila Ferreira; Prof. DSc. Silva, Adinan Alves.

This paper aimed to evaluate isolated and combined abiotic stresses on micro tomato plants and their physiological, biochemical, and anatomical changes. Two experiments were carried out independently; the first one was in randomized blocks, 2 x 2 factorial scheme, with two tomato genotypes [wt (wild and mutant); *hp1* (high pigment 1)] under two conditions [Control (100% CC + 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and stress (40% CC + 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)]. In the second experiment, four genotypes were used [one wild (wt) and three mutants (*aurea*, *hp1*, and *hp2*)], under four conditions: (a) Control (CONT), 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 25 °C/20 °C; (b) High irradiance (HI), 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 25 °C/20 °C; (c) High temperature (HT), 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 40 °C/20 °C; and (d) Combined stress (HI+HT), 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 40 °C/20 °C. Water and osmotic potentials, gas exchange, chlorophyll fluorescence, proline concentration, antioxidant enzyme activity, chloroplast pigments, leaf anatomy, electron transport rate, protein, and leaf malonaldehyde MDA were analyzed. In Chapter I, the combinations of high irradiance and water deficit caused changes in the wt and *hp1* genotypes. It was found that the photosynthetic performance was not significant with a decrease in gas exchange under the combined stresses, even with *hp1* genotype having a higher content of chloroplast pigments in relation to wt genotype. The *hp1* defense mechanisms were not activated in a precise way, not being able to minimize the effect of the combined stress. There were anatomical adjustments to the combined stresses, that is, wt stood out over *hp1* for the spongy parenchyma and mesophyll. Most of the variables in this study did not differ among the micro tomato plant genotypes under the conditions imposed. The wt caused a

greater number of defense mechanisms in response to stress, and the *hpl* mutant was more susceptible to the imposed stress conditions. In Chapter II, gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence showed no interaction between genotypes and conditions; there was significant difference only for the isolated factor conditions. The stomatal index and the adaxial stomatal density showed significant differences for the genotype isolated factor. There was an interaction between genotypes and conditions for the micromorphometry of the epidermis, chloroplast pigments, proteins, MDA, and in the enzyme activity of the enzymatic antioxidant system. Results obtained showed that the conditions used in these genotypes promoted greater plant acclimatization under the control condition ($450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) than under the combined condition of high irradiance ($1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and temperature ($40 \text{ }^\circ\text{C}$). This temperature caused damage to metabolism, but the high irradiance favored reversing such damage, when these conditions were imposed in combination; when they were exposed in isolation, they developed different acclimatization and/or defense strategies, seeking to overcome the imposed stress condition.

KEYWORDS: *Solanacea*; Micro tomato plant; High irradiance; High temperature; Water deficit.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A ocorrência simultânea de fatores de estresses ambientais vem aumentando ao longo dos anos, afetando intensamente os sistemas agrícolas. Essas combinações são únicas e a cada ano impactam a sobrevivência e o crescimento das plantas (Porfirio e Finnigan, 2018). Mesmo que se saiba como as plantas se aclimatam aos estresses individuais, pouco se conhece sobre suas respostas diante da combinação de fatores ambientais estressantes (Zhang e Sonnewald, 2017; Morales e Kaiser, 2020).

A agricultura usa um pequeno número de espécies agrícolas, transformadas geneticamente para otimizar a produtividade numa faixa estreita de variações ambientais (Kukul e Irmak, 2018). A incerteza nos padrões climáticos, impacta o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade de diversas culturas que sofrem com as flutuações proporcionadas pelas mudanças climáticas (Porfirio et al. 2018). Os efeitos combinados de estresses abióticos nas regiões de cultivo mostram que as próximas gerações de plantas cultivadas precisam ser mais eficientes no uso de água e ao mesmo tempo mais tolerantes às temperaturas elevadas e ao excesso de luminosidade, para demonstrarem rendimentos sustentáveis dentro de uma ampla variação das condições ambientais (Pareek; Dhankher; Foyer, 2020).

Diversos processos fisiológicos são afetados pelo déficit hídrico, estimulando respostas rápidas das plantas como o fechamento estomático, redução da transpiração, diminuição do suprimento de CO₂ para a fotossíntese, dissipação de excesso de energia (Flexas et al. 2018). Além do déficit hídrico o estresse térmico causado pelas altas temperaturas afeta o metabolismo das plantas, danificam os tecidos foliares, diminuem a taxa fotossintética e induz danos celulares (Gollan e Aro, 2020). A luz, enquanto a luz regula o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Pashkovskiy et al. 2021),

também pode se tornar um fator de estresse em determinadas condições, principalmente em ambientes com a combinação de fatores de estresses.

Por sua diversidade, a família Solanaceae contém várias espécies utilizadas tanto na agricultura, quanto na pesquisa. Neste grupo, de conhecida importância econômica, o tomate (*Solanum lycopersicum*) ocupa o segundo lugar na produção brasileira (CONAB, 2018).

A cultivar de tomateiro Micro-Tom, inicialmente produzida para finalidades ornamentais pelo cruzamento de duas cultivares anãs; destaca-se nas pesquisas como planta modelo, devido seu diminuto tamanho e ciclo reprodutivo curto (Martí et al. 2006). Suas características a tornaram uma planta modelo para estudos genéticos e fisiológicos, sendo uma alternativa à *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Gavassi et al. 2017). A utilização da mutação em plantas se torna uma abordagem interessante para elucidar os processos relacionados a diferentes mecanismos vegetais, sejam bioquímicos ou fisiológicos (Alves et al., 2016). Os mutantes “high pigment” (*hp*) de micro-tomateiro exibem uma resposta exagerada a luz, pois possui mutação em um repressor da via de transdução de sinais luminosos dos fitocromo (Dias et al. 2015). Já o *aurea* (*au*) apresenta deficiência na síntese do cromóforo do fitocromo (Muramoto et al. 2005).

Neste contexto, as integrações dos estresses além de serem mais representativos das condições comumente encontradas nos cultivos agrícolas, associados com o uso de mutantes fotomorfogênicos de microtomateiros podem contribuir de forma relevante na compreensão e mecanismos de respostas a estes fatores por espécies de importância agrônoma. Com isso, os resultados dessa pesquisa poderão contribuir para o desenvolvimento de cultivares mais aptas em tolerar estresses ambientais, mantendo sua capacidade produtiva, a fim de reduzir perdas econômicas e incrementar a produção de alimentos.

Referências Bibliográficas

Alves, F. R. R.; Melo, H. C.; Crispim-Filho, A. J.; Costa, A. C.; Nascimento, K. J. T.; & Carvalho, R. F. (2016). Physiological and biochemical responses of photomorphogenic tomato mutants (cv. Micro-Tom) under water withholding. *Acta Physiologiae Plantarum*. v. 38, p. 155-169. doi:10.1007/s11738-016-2169-8.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) (2018) Acompanhamento safra brasileira grãos, v. 6 Safra 2015/16 - Décimo Primeiro levantamento, Brasília, p. 1-140.

Dias, T.; Melo, H. C.; Alves, F. R. R.; Carvalho, R. F.; & Carneiro, K. S. (2015). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante em frutos de tomateiros mutantes fotomorfogênicos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 45, n. 5, p. 782-787.

Flexas J, Carriquí M, Nadal M (2018) Gas exchange and hydraulics during drought in crops: Who drives whom? *J Exp Bot* 69:3791–3795. doi: 10.1093/jxb/ery235

Gavassi, M., A., Monteiro, C., C., Campos, M., L., Melo, H., C., & Carvalho, R., F. Phytochromes are key regulators of abiotic stress responses in tomato. *Scientia Horticulturae*. 222, p.126–135, 2017. doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.

Gollan, P. J., & Aro, E. M. (2020). Photosynthetic signalling during high light stress and recovery: targets and dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375(1801), 20190406.

Martí, E., Gisbert, C., Bishop, G. J., Dixon, M. S., & García-Martínez, J. L. (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of experimental botany*, 57(9), 2037-2047. doi:10.1093/jxb/erj154.

Morales, A., & Kaiser, E. (2020). Photosynthetic Acclimation to Fluctuating Irradiance in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 268. doi.org/10.3389/fpls.2020.00268.

Muramoto, T.; Kami, C.; Kataoka, H.; Iwata, N.; Linley, P. J.; Mukougawa, K.; Yokota, A.; & Kohchi, T. (2005). The tomato photomorphogenetic mutant aurea is deficient in phytochromobilin synthase for phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* v. 46, ed. 4, p. 661-665.

Pareek, A.; Dhankher, O. P.; & Foyer, C. H. Mitigando o impacto das mudanças climáticas na produtividade da planta e na sustentabilidade do ecossistema, *Journal of Experimental Botany*, Volume 71, Issue 2, 7 January 2020, P 451–456. doi:10.1093/jxb/erz518.

Pashkovskiy, P., Kreslavski, V., Khudyakova, A., Ashikhmin, A., Bolshakov, M., Kozhevnikova, A., ... & Allakhverdiev, S. I. (2021). Effect of high-intensity light on the photosynthetic activity, pigment content and expression of light-dependent genes of photomorphogenetic *Solanum lycopersicum* hp mutants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, 91-100. doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.07.033

Porfirio, L. L.; Newth, D.; Finnigan, J. J.; & Cai, Y. Economic shifts in agricultural production and trade due to climate change. *Palgrave Communications*, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2018. https://doi.org/10.1057/s41599-018-0164-y.

Kukal, M. S.; & Irmak, S. Climate-driven crop yield and yield variability and climate change impacts on the US great plains agricultural production. *Sci. Rep.* 8: 1–18. 2018. doi: 10.1038 / s41598-018-21848-2.

Zandalinas, S. I.; Fritschi, F. B.; & Mittler, R. Global Warming, Climate Change, and Environmental Pollution: Recipe for a Multifactorial Stress Combination Disaster. *Trends in Plant Science*, 2021.

Zhang, J.; Stankey, R. J.; & Vierstra, R. D. Structure-Guided Engineering of Plant Phytochrome B with Altered Photochemistry and Light Signaling. *Plant Physiology*. v. 161, ed. 3, p. 1445-1457, 2013.

2 OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos do déficit hídrico, alta temperatura e alta luminosidade impostos de forma isolada e combinada nos processos fisiológicos, bioquímicos e anatômicos de microtomateiros mutantes fotomorfogênicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas dos microtomateiros após exposição aos estresses por déficit hídrico, alta irradiância e alta temperatura.
2. Descrever as alterações na anatomia foliar de microtomateiros submetidos aos estresses de forma isolada e combinada.
3. Avaliar se o déficit hídrico e alta irradiância isolados ou combinados induzem mudanças anatômicas e fisiológicas em genótipos de microtomateiros fotomorfogênicos promovendo aclimação ao estresse.
4. Avaliar se a alta irradiância e alta temperatura quando impostas de forma combinada induzem a mudanças fisiológicas e anatômicas nos microtomateiros fotomorfogênicos, diferentes de quando são impostas isoladas;
5. Verificar se genótipos com mutação quando expostos aos estresses possuem mecanismos de defesas mais atuantes em relação aos sem mutação.

CAPÍTULO I

ESTRESSES COMBINADOS ALTERAM A ANATOMIA E A FISIOLOGIA DE MICROTOMATEIROS MUTANTES FOTOMORFOGÊNICOS

RESUMO

Naturalmente, as plantas são expostas a diferentes tipos de estresses ao mesmo tempo, durante toda o seu ciclo de vida, o que requer uma maior compreensão do desempenho fisiológico, bioquímico e anatômico destas, sob condições de estresses combinados. Objetivou-se com este estudo verificar alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas em microtomateiros fotomorfogênicos, na presença do estresse combinado por alta irradiância e déficit hídrico. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento de plantas, em blocos ao acaso, esquema fatorial 2 x 2, sendo 2 genótipos de microtomateiro (wt selvagem e o mutante - *hp1* high pigment1) e 2 condições (controle - 100% da capacidade de campo (CC) do solo + 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e estresse - 40% CC do solo + 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com 5 repetições. Foram analisados os potenciais hídrico e osmótico, as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila *a*, a concentração de prolina, a atividade de enzimas antioxidantes, teores de pigmentos cloroplastídicos e a anatomia foliar. A combinação entre alta irradiância e déficit hídrico acarretou em mudanças nos genótipos wt e *hp1*. Mesmo possuindo maior conteúdo de pigmentos cloroplastídicos no *hp1* em relação ao wt, o desempenho fotossintético não foi maior, havendo decréscimo nas trocas gasosas diante dos estresses combinados. O fenótipo mutante do *hp1* não resultou em maior capacidade para minimizar os efeitos dos estresses combinados. Houve ajustes anatômicos aos estresses combinados, em que o wt se sobressaiu em

comparação ao *hp1* para as variáveis de espessuras do parênquima esponjoso e do mesofilo. A maioria das variáveis deste estudo não diferiram entre os genótipos de microtomateiros, mas somente para as condições impostas. O wt induziu maior número de mecanismos de defesa em resposta ao estresse, e o mutante *hp1* mostrou-se mais suscetível às condições de estresse impostas.

Palavras-chave: alta irradiância, déficit hídrico, anatomia, trocas gasosas, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Plants are naturally exposed to different types of stresses during their lifetime, which requires an understanding of their physiological, biochemical, and anatomical performance under conditions of combined stress. This study aimed to verify the physiological, biochemical, and anatomical changes in photomorphogenic micro tomato plants, in the presence of high irradiance combined stress and water deficit. The experiment was carried out in the plant growth chamber, in randomized blocks, 2 x 2 factorial scheme, with two tomato genotypes [wt (wild and mutant); *hp1* high pigment 1)], two conditions [control (100% CC + 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); stress (40% CC + 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)], and five replicates. The water (Ψ_w) and osmotic (Ψ_s) potentials, gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, proline concentration, antioxidant enzyme activity, chloroplast pigments, and leaf anatomy were analyzed. The combinations of high irradiance and water deficit caused changes in the wt and *hp1* genotypes. The photosynthetic performance was not significant with a decrease in gas exchange under the combined stresses, even with a higher content of chloroplast pigments in *hp1* genotype compared to wt genotype. The *hp1* defense mechanisms did not express the ability to minimize the combined stress effect. There were anatomical adjustments to the combined stresses, in which wt stood out over *hp1* for the spongy parenchyma and mesophyll. Most of the variables in this study did not differ among the microtomato plant genotypes, but only in relation to the conditions imposed. The wt led a greater number of defense mechanisms in response to stress, and the *hp1* mutant was more susceptible to the imposed stress conditions.

Keywords: Anatomy; Antioxidant enzymes; Gas exchange; High irradiance; Water deficit.

1 Introdução

As plantas precisaram desenvolver mecanismos específicos para sobreviver às diversas condições ambientais (Huang; Zhao; Chory, 2019). Um dos maiores desafios para a agricultura é minimizar o impacto econômico dos estresses abióticos na produtividade das culturas (Dutta et al. 2020). Sabe-se que o crescimento e produtividade são comprometidos tanto pelo déficit hídrico (Pereira et al. 2019), quanto pela alta irradiância (Sharma et al. 2019). Estes dois fatores são propensos a ocorrer de forma simultânea no ambiente, intensificando danos sobre a fisiologia e a anatomia das plantas (Do Carmo Araújo e Deminicis, 2009; Becklin et al. 2016).

A alta irradiância em combinação com o déficit hídrico pode intensificar as respostas das plantas ao estresse (Costa et al. 2015). Como exemplo, a redução da taxa fotossintética que ocorre devido ao fechamento estomático, reduzindo a assimilação de CO₂ (Jumrani e Bhatia, 2018; Castro et al. 2019) pela planta, limita seu crescimento. Essas alterações no processo fotossintético ocasionam redução dos pigmentos cloroplastídicos e dos genes que expressam a enzima Rubisco (Zhou et al. 2014). Isso reduz também a eficiência fotoquímica, causando estresse oxidativo celular, diminuição do crescimento e da produção das plantas (Jumrani e Bhatia, 2018; Castro et al. 2019).

Em resposta, as plantas aumentam a produção de substâncias que atuam como antioxidantes (Yao et al. 2017; Batista et al. 2018). Dentre essas, em razão de sua sensibilidade a condições de estresses, a prolina, que pode ser considerado um indicador bioquímico e fisiológico na proteção da célula, atenuando os efeitos dos estresses (Monteiro et al. 2014). Danos celulares são comuns em plantas sob de estresses. A quantificação do dos teores de malonaldeído, produto final da peroxidação lipídica, é utilizado na determinação dos níveis de danos causados nas membranas (Li et al. 2017; Batista et al. 2018).

Mediante o exposto, um ajuste fisiológico, estrutural ou bioquímico em resposta a um estímulo ambiental manifesta-se na planta por um determinado período (Morales e Kaiser, 2020). Este ajuste, conhecido como aclimação, pode envolver processos fisiológicos reversíveis ou irreversíveis (Violet-Chabrand et al. 2017). Para o entendimento dos processos bioquímicos, fisiológicos e uma série de outras respostas do desenvolvimento vegetal, tem-se usado nas pesquisas os microtomateiros (Alves et al. 2016), que são considerados planta modelo para o desenvolvimento de pesquisas dentro da família Solanacea (Shikata et al. 2016).

O microtomateiro devido ao tamanho reduzido, curto tempo de geração, facilidade no manejo (Martí et al. 2006; Huther et al. 2018) associados a técnicas de mutação (Shikata et al. 2016; Yano et al. 2019), tem sido considerado uma excelente planta modelo; tornando-o uma alternativa adequada à tradicional *Arabidopsis thaliana* (Campos et al. 2010; Gavassi et al. 2017).

Durante os últimos anos, algumas pesquisas com microtomateiros foram concentradas na compreensão da sinalização do fitocromo, revelando mecanismos relacionados às vias de sinalização (Klose; Nagy; Schäfer, 2020). Estas pesquisas possibilitaram avaliar a interferência da luz nas respostas aos estresses abióticos, e como isto afeta a morfologia, a fisiologia e o metabolismo (D'Amico-Damião, 2015). Estudos nesse sentido já foram realizados com déficit hídrico (Alves et al. 2016) e alta temperatura (Crispim-Filho et al. 2019). Diferente do que vem sendo desenvolvido, estudos combinando mais de um estresse, como déficit hídrico e alta irradiância são inéditos com os microtomateiros.

Diante do exposto, algumas hipóteses foram levantadas: (i) O genótipo mutante *hpl*, devido sua alta concentração de pigmentos nas suas folhas,, possui aparato fotossintético mais tolerante a estresses combinados, em relação ao microtomateiro selvagem wt; (ii) o genótipo *hpl* possui mecanismos de defesa aos estresses mais atuantes do que no wt; (iii) o estresse combinado por déficit hídrico e alta irradiância induzem mudanças anatômicas e fisiológicos em genótipos de microtomateiros fotomorfogênicos promovendo aclimação ao estresse. Para testar as hipóteses deste estudo, dois genótipos de Micro-Tom, wt e o mutante fotomorfogênicos *hpl*, foram expostos de forma simultânea aos estresses por déficit hídrico e alta irradiância, com o objetivo de caracterizar suas alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Material vegetal e condições experimentais

O experimento foi conduzido no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, em câmara de crescimento de plantas, sob condições controladas. Sementes de tomate, cultivar Micro-Tom (MT), tipo selvagem (wt) e do mutante *high-pigment 1 (hp1)*, foram obtidas junto ao “Laboratory of Hormonal Control of Plants Development” da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-Universidade de São Paulo.

Antes da sementeira, as sementes foram acondicionadas por 8h em água corrente para superação da dormência, e posteriormente semeadas em vasos de 8 L contendo substrato comercial Bioplant®. Os vasos foram mantidos em câmara de crescimento programada com temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $\pm 65\%$, radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas. Aos 15 dias após a sementeira, plantas selecionadas de acordo com a uniformidade e aspecto fitossanitário foram transplantadas para vasos de plástico com capacidade para 3 litros, contendo 3 L de substrato na proporção 2 (solo tipo Latossolo Vermelho Distrófico típico) :1 (areia), previamente adubado conforme resultado da análise química.

As plantas foram cultivadas na câmara de crescimento sob as mesmas condições da germinação e crescimento inicial, com a umidade do solo mantida em 100% da capacidade de campo (CC). Aos 30 dias após o transplante, plantas dos genótipos wt e *hp1* foram submetidas durante 7 (sete) dias às seguintes condições de disponibilidades hídricas e irradiâncias: 1) Controle - 100% CC + $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; e 2) Estresse combinado - 40% CC (déficit hídrico) + $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (alta irradiância). O estresse por $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi imposto, a partir das 10h, condição mantida por 6 horas. Após esse período, as plantas retornavam para as condições iniciais ($450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), permanecendo assim até novo ciclo no dia seguinte. Para controle da umidade do substrato, previamente foi determinada a sua CC pelo método gravimétrico, segundo Costa et al. 2015.

Durante o período de imposição dos tratamentos, os vasos foram pesados diariamente para reposição da água perdida por evapotranspiração. As condições de temperatura, umidade relativa, irradiância e fotoperíodo na câmara de crescimento foram monitoradas pelo software Lab View, (Instalafrio, Pinhais, PR, Brasil).

2.2.2 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, em esquema fatorial 2 x 2, sendo 2 genótipos de Micro-Tom (wt e *hp1*) e 2 condições de cultivo (controle - 100% CC + 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e estresse combinado - 40% CC + 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com 5 repetições, totalizando 20 unidades experimentais. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e, quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) por meio do Sistema de Análise de Variância (SISVAR – 5.4, 2010). Para a construção do dendrograma, os dados foram inicialmente submetidos à análise de variância multivariada. O dendrograma associado com heatmap foi baseado no algoritmo de distância de Mahalanobis, agrupamento pelo método de grupo de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA), de otimização de Tocher (Rao, 1952). As análises foram realizadas utilizando o software estatístico R Core Team (2019).

2.2.3 Avaliações

2.2.3.1 Potencial hídrico e potencial osmótico foliar

O potencial hídrico na antemanhã (Ψ_w) foi medido por meio de uma câmara de pressão do tipo Scholander (Scholander et al. 1965), em folhas completamente expandidas. Para a avaliação do potencial osmótico (Ψ_s), amostras foliares foram coletadas no período da antemanhã e congeladas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Na ocasião da análise, as amostras foram deixadas para descongelar em temperatura ambiente, e em seguida, maceradas com um bastão de vidro para a extração da seiva. Após centrifugação por 10 minutos a 5.000 rpm, realizou-se a leitura da osmolalidade em 10 μL do sobrenadante, num osmômetro de pressão de vapor (Vapro 5520 - Wescor, USA). Os valores de potencial osmótico foram obtidos a partir da osmolalidade (mmol kg^{-1}) da seiva do tecido foliar, mediante o uso da equação de Van't Hoff e os resultados convertidos para MPa.

2.2.3.2 Trocas Gasosas

As trocas gasosas das plantas foram avaliadas para registro da taxa fotossintética (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e da relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a). A eficiência intrínseca do uso da água ($E_i\text{UA}$) foi obtida pela divisão entre a taxa

fotossintética líquida e a condutância estomática (A/g_s). Estas avaliações foram realizadas utilizando um analisador de gases do infravermelho (IRGA), equipado com um fluorômetro, modelo LI-6800 (Licor, Nebraska, Estados Unidos), sempre numa folha completamente expandida, entre 08h e 11h.

2.2.3.2.1 Fluorescência da clorofila *a*

As variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram obtidas na mesma área da folha onde realizou-se as medidas das trocas gasosas, utilizando o fluorômetro acoplado ao IRGA. Inicialmente, as folhas foram adaptadas ao escuro para que os centros de reação estivessem completamente abertos (aceptores primários oxidados) com perda de calor mínima, permitindo obter as variáveis de indução da fluorescência: fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_m) (Genty et al. 1989).

A partir desses valores foi calculado o rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII; $F_v/F_m = (F_0 - F_m) / F_m$) (Genty et al. 1989). As variáveis da fase lenta foram obtidas após a aplicação de uma iluminação actínica, seguida de um pulso de luz actínica saturante para a determinação da fluorescência *steady-state* (F) e da fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F_m'), respectivamente, permitindo calcular o rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no FSII ($\Phi_{PSII} = (F_m' - F) / F_m'$) e o coeficiente de extinção não fotoquímico ($Y_{NPQ} = (F_m - F_m') / F_m'$) (Genty et al. 1989). O Φ_{PSII} foi utilizado ainda para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons ($ETR = \Phi_{PSII} \times PAR \times Leaf_{ABS} \times 0,5$) (Bilger et al. 1995), em que PAR é o fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha; $Leaf_{ABS}$ correspondente à fração de luz incidente absorvida pelas folhas e 0,5 à fração de energia de excitação distribuída para o FSII (Laisk e Loreto, 1996).

2.2.3.2.2 Concentração de malonaldeído (MDA) foliar

O conteúdo de MDA foi avaliado para determinar a peroxidação de lipídios utilizando o método proposto por Heath e Packer (1968). Foram maceradas aproximadamente 160 mg de folhas frescas em almofariz congelado com solução de extração de 2mL de TCA 0,1%. O extrato foi centrifugado a 12000 g, durante 15 minutos a 4°C e, posteriormente, 500 μL do sobrenadante foi adicionado a 1,5mL da solução TBA 0,5% + TCA 20% (p/v) e aquecidos em estufa a 90°C, em tubos hermeticamente fechados, por 20 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo por

um minuto, posteriormente foi centrifugado a 3000g por 4 minutos e as leituras realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (modelo Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific, Madison, EUA), a 440, 532 e 600 nm. A concentração do complexo malonaldeído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) produzido foi calculada, utilizando o coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heath e Packer, 1968) através da fórmula: $\text{MDA (nmol ml}^{-1}\text{)} = [(A_{532}-A_{600})/ 155000] 106$. Os dados de TBARS foram expressos em $\text{nmol TBA-MDA g}^{-1} \text{ MF}$.

2.2.3.5 Concentração de prolina

A determinação da concentração de prolina foi realizada de acordo com a adaptação da metodologia descrita por Bates (1973). Amostras de aproximadamente 30 mg de tecido foliar foram homogeneizadas em 6 mL de ácido sulfossalicílico 3% (p/v) e o extratos foram centrifugados a 7500 rpm por 10 min, a 4°C. Em seguida, foi coletado 2 mL do sobrenadante, no qual adicionou-se 2 mL de solução ácida de ninhidrina e 2 mL de ácido acético glacial, em tubos de vidro de 15 mL. As amostras foram incubadas a 100 °C por 1 h e em seguida, colocadas em gelo de forma a parar a reação. Após este período, foram adicionados 4 mL de tolueno aos tubos, seguido de agitação por 20s para a completa extração da prolina. Com o sobrenadante realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 520 nm, e as absorbâncias foram comparadas à curva-padrão de prolina (0 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados obtidos foram expressos em micromol de prolina por grama de massa fresca.

2.2.3.6 Extração enzimática

Os extratos enzimáticos para a determinação da atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e peroxidase (POX-EC 1.11.1.7) foram obtidos pela maceração de, aproximadamente 0,2 mg de folhas em 1 mL de meio de extração, constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8; EDTA 0,1mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e PVPP 1% (p/v). O extrato foi submetido à centrifugação a 12.000 rpm, por 15 min, à temperatura de 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação da atividade enzimática. As concentrações de proteína no extrato enzimático foram determinadas de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976).

2.2.3.6.1 Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD - EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada num meio de reação composto por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 mM; metionina 13 mM, pH 7,8 e de riboflavina 2 μ M, juntamente com o extrato enzimático (Giannopolitis e Ries, 1977). A reação foi iniciada pela exposição das amostras à luz fluorescente de 15 watts numa câmara fechada, durante 10 minutos. Após esse período, a quantificação da produção fotoquímica de azul de formazana (produto da reação) foi determinada a 560 nm. O branco consistiu de um meio de reação idêntico ao anterior, porém, mantido no escuro. Uma unidade de SOD foi considerada como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971). O resultado foi expresso em U SOD $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.2.3.6.2 Determinação da atividade da catalase (CAT - EC 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi determinada pela adição do extrato enzimático ao meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi avaliado a 240 nm, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Anderson et al. 1995) e expresso em μmol de H_2O_2 $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.2.3.6.3 Determinação da atividade da peroxidase (POX- EC 1.11.1.7)

A atividade da POX foi determinada pela adição de 0,10 mL do extrato enzimático bruto a 4,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8; pirogallol 20 mM e H_2O_2 20 mM (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm e temperatura de 25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em μmol de purpurogalina $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de proteína.

2.2.3.7 Concentração de pigmentos foliares

Os pigmentos foliares foram extraídos de 3 (três) discos foliares de 0,5 cm de diâmetro, utilizando-se 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com CaCO₃, durante 6 horas de incubação a 60°C. As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b*, e carotenoides foram determinadas em espectrofotômetro UV-visível, nos comprimentos de onda de 665, 649 e 480 nm, respectivamente, e calculadas de acordo com as equações propostas por Wellburn (1994), e os resultados foram expressos em µg cm².

2.2.3.8 Caracterização da micromorfometria foliar

Para as análises morfoanatômicas da epiderme adaxial (Ep. Ad.) e abaxial (Ep. Ab.), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE) e mesófilo (Me), amostras da região mediana de folhas completamente expandidas foram coletadas e armazenadas em Karnovsky (1965). Após, o material vegetal foi pré-lavado em tampão fosfato e desidratado em série etílica crescente, pré-infiltrado e infiltrado em historesina (Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Posteriormente, as amostras foram seccionadas transversalmente a 5 µm de espessura em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logen scientific, China) e os cortes corados com azul de toluidina – coloração policromática (0,05% tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8) (O'Brien et al., 1964). As imagens obtidas foram fotografadas em microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão), acoplado com câmera DP-72 utilizando opção de campo claro. As espessuras das áreas coradas foram obtidas com o auxílio do software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

3. Resultados

Os potenciais hídrico e osmótico das folhas variaram somente em função das condições de cultivo. A condição de estresse diminuiu os potenciais hídrico (Ψ_w) e osmótico (Ψ_s), em relação ao controle (Fig. 1 A - B).

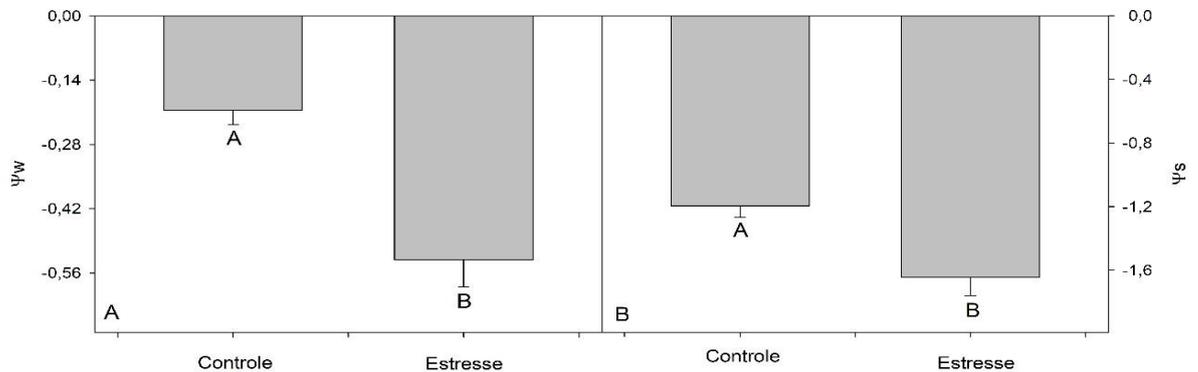


Figura 01. Potencial hídrico (Ψ_w , A) e potencial osmótico (Ψ_s , B) de dois genótipos de microtomateiros: wt e hpl, submetidos a duas condições contrastantes: controle e estresse, 7 dias após a imposição dos tratamentos (DAI). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados são médias \pm EP ($n=5$).

Em relação às trocas gasosas, houve diferença somente entre as condições de cultivo (Fig. 2). Observou-se redução na taxa fotossintética (A, Fig. 2 A), taxa transpiratória (E, Fig. 2 B), condutância estomática (gs, Fig. 2 C) e razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a , Fig. 2 D) nas plantas sob estresse. Houve aumento da eficiência intrínseca do uso da água (EiUA, Fig. 2 E), sendo bastante proeminente na condição de estresse em relação ao controle. Isso corrobora com a diminuição do C_i/C_a decorrente da limitação estomática, ou seja, o CO_2 não estava sendo absorvido devido à condição de estresse.

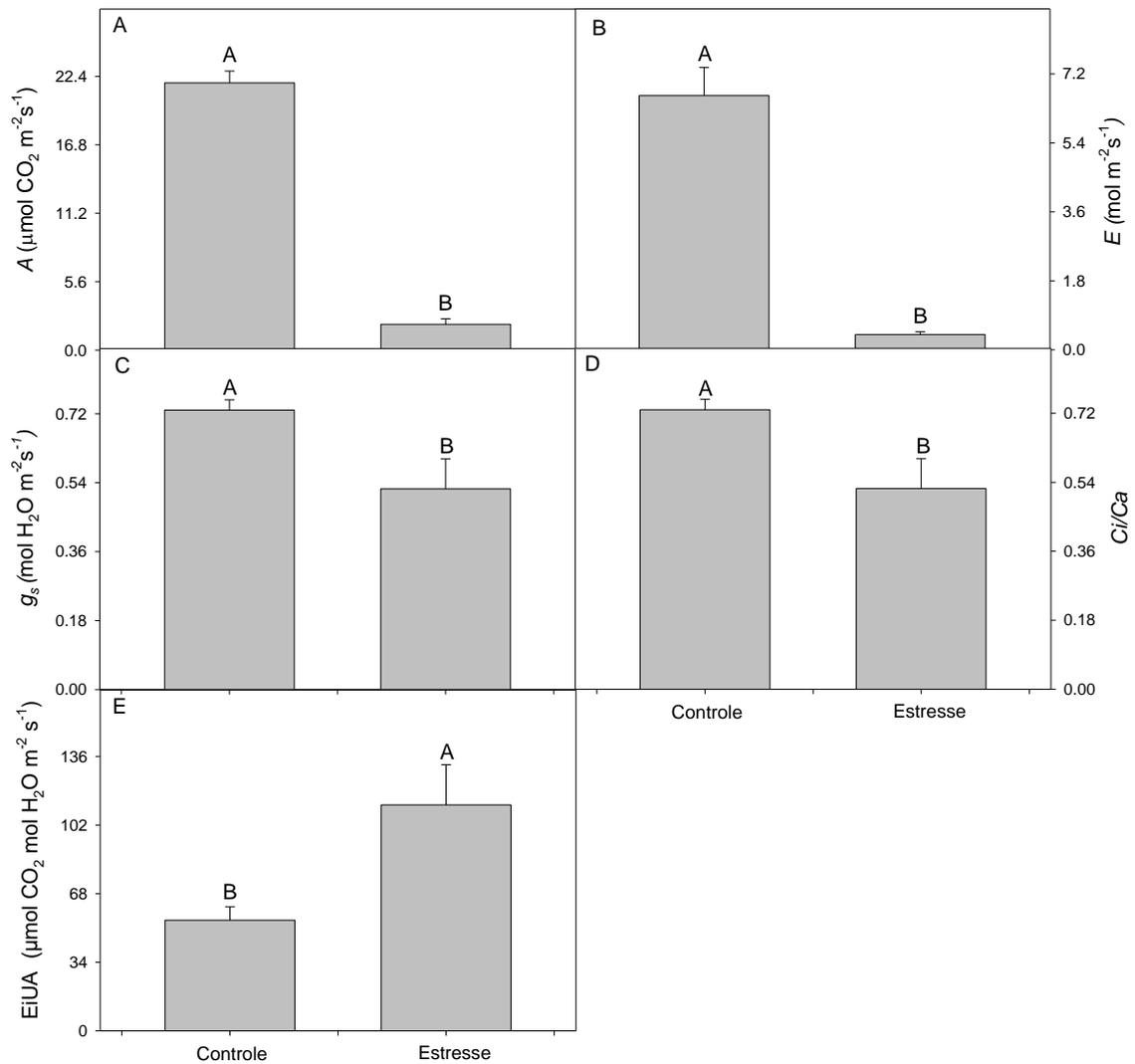


Figura 02. Taxa fotossintética (A, A), taxa transpiratória (E, B), condutância estomática (g_s , C), razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (Ci/Ca, D) e eficiência intrínseca do uso da água (EiUA, E) de 2 genótipos de microtomateiro: WT e *hpl*, submetidos a 2 condições contrastantes: controle e estresse, 7 DAI dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados são médias \pm EP ($n=5$).

Não houve diferença para nenhum dos fatores isolados, nem da interação entre eles sobre as variáveis rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), e os rendimentos quânticos de dissipação regulada (Y_{NPQ}) e não regulada (Y_{NO}) de energia (Tabela 01). Já as variáveis rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Y_{II} , Fig. 3 A) e taxa aparente de transporte de elétrons (ETR, Fig. 3 B), divergiram somente quanto ao fator condição, e ambas reduziram na condição de estresse.

Tabela 1. Análise de variância para as variáveis de fluorescência da clorofila *a*: rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), rendimento quântico da dissipação regulada de energia (Y_{NPQ}) e rendimento quântico da dissipação não regulada de energia (Y_{NO}) de 2 genótipos de microtomateiros: wt e *hpl1*, submetidos a 2 condições contrastantes: controle e estresse, aos 7 DAI dos tratamentos.

Genótipos	Condições	F_v/F_m	Y_{NPQ}	Y_{NO}
wt	Controle	0,821 ± 0,01	0,349 ± 0,06	0,388 ± 0,05
	Estresse	0,806 ± 0,01	0,534 ± 0,06	0,371 ± 0,06
<i>hpl1</i>	Controle	0,842 ± 0,00	0,379 ± 0,05	0,341 ± 0,05
	Estresse	0,812 ± 0,01	0,418 ± 0,17	0,465 ± 0,17
Genótipos		n.s.	n.s.	n.s.
Condições		n.s.	n.s.	n.s.
Genótipos x Condições		n.s.	n.s.	n.s.
Bloco		n.s.	n.s.	*
C.V. (%)		0,00	46,82	46,64

* significativo, n.s. não significativo pelo teste F ($p \leq 0,05$).



Figura 3. Rendimento quântico efetivo do fotossistema II [$Y_{(II)}$, A] e taxa de transporte de elétrons (ETR; B) de 2 genótipos de microtomateiros: wt e *hpl1*, submetidos a 2 condições contrastantes: controle e estresse, 7 DAI dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados são médias \pm EP ($n=5$).

Os fatores genótipos, condições de cultivo e as interações entre estes não alterou de forma significativa as variáveis MDA, Prolina, SOD e CAT (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações de malondialdeído (MDA) e prolina, atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) e catalase (CAT) de 2 genótipos de microtomateiros: wt e *hpl*, submetidos a 2 condições contrastantes: controle e estresse, 7 DAI dos tratamentos.

Genótipos	Condições	MDA (nmol g ⁻¹ MF)	Prolina (μmol g ⁻¹ MF)	SOD (U SOD min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína)	CAT (μmol H ₂ O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína)
wt	Controle	46,8 ± 2,49	3,74 ± 0,84	43,5 ± 5,76	53,2 ± 7,22
	Estresse	25,8 ± 6,15	7,36 ± 2,40	49,5 ± 5,71	88,9 ± 22,84
<i>hpl</i>	Controle	39,5 ± 6,47	3,67 ± 0,71	33,6 ± 3,54	64,5 ± 10,91
	Estresse	35,7 ± 8,23	3,16 ± 0,58	41,7 ± 3,05	47,1 ± 11,62
Genótipos		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Condições		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Genótipos x Condições		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bloco		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C.V. (%)		37,80	13,77	27,03	47,55

* significativo, n.s. não significativo pelo Teste de Tukey (p ≤ 0,05).

A figura 4 mostra a atividade da enzima peroxidase (POX) tanto para as condições de cultivo, quanto para os genótipos. Quanto aos genótipos, nota-se que o *hpl* teve uma menor atividade enzimática em relação ao wt (Fig. 4 A). Já na comparação entre as condições de cultivo, as plantas submetidas aos estresses combinados tiveram maior atividade da enzima POX do que as plantas controle (Fig 4 B).

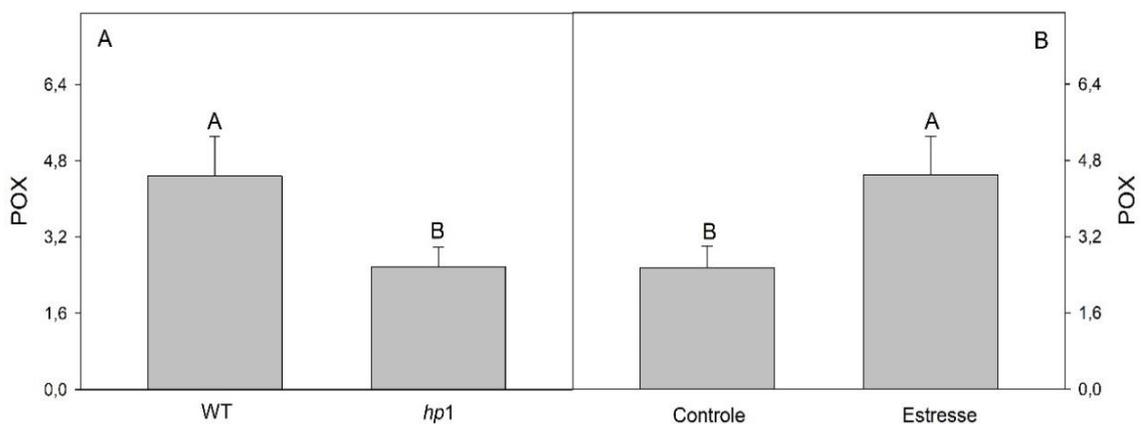


Figura 4. Atividade da enzima peroxidase (POX, μmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína) de 2 genótipos de microtomateiros: wt e *hpl*(A), submetidos a 2 condições contrastantes: controle e estresse (B), 7 DAI dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p ≤ 0,05). Os dados são médias ± EP (n=5).

Os pigmentos cloroplastídicos foram influenciados pelas características fenotípicas do genótipo mutante. O *hp1* apresentou maiores teores de clorofilas *a* (Fig.5A), *b* (Fig. 5B), clorofila total (Fig. 5C) e carotenoides (Fig. 5D) quando comparado ao genótipo selvagem (wt).

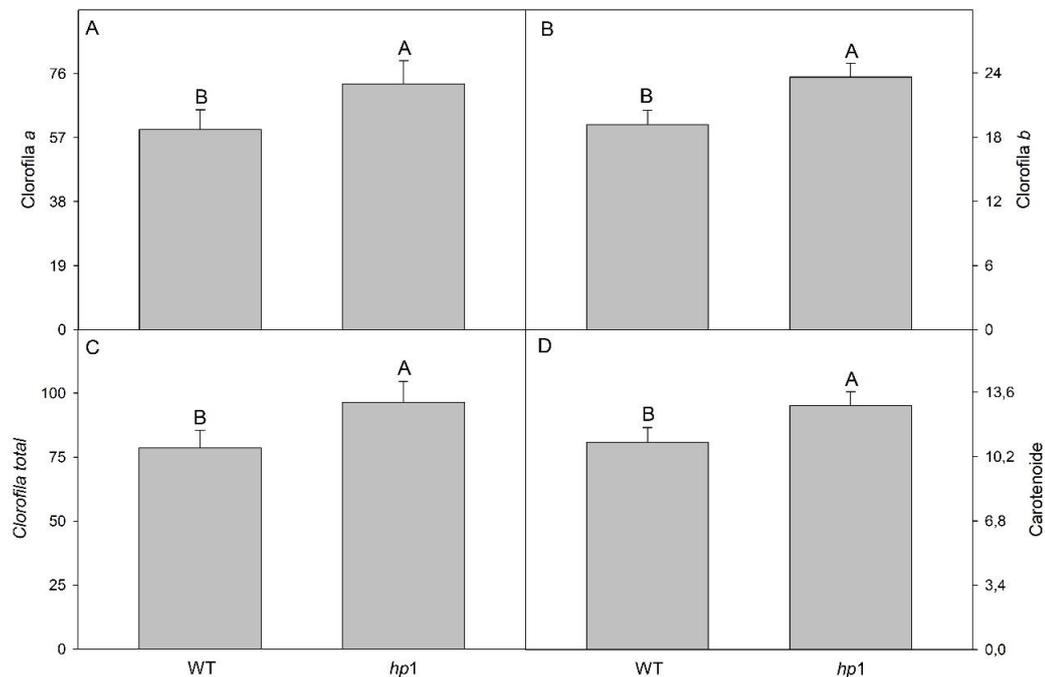


Figura 05. Clorofila *a* (Cl *a*, A), Clorofila *b* (Cl *b*, B) e clorofilas totais (Cl_t, C) Carotenoides (Crt, D) de dois genótipos de microtomateiro: wt e *hp1*, submetidos a duas condições contrastantes: controle e estresse, 7 DAI dos tratamentos. Médias seguida pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados são médias \pm EP ($n=5$).

A Tabela 3 mostra que não houve diferença para as variáveis epiderme adaxial (Ep. Ad.) e abaxial (Ep. Ab.), tanto para os genótipos e condições, quanto para a interação entre estes fatores. O parênquima paliçádico (PP), o parênquima esponjoso (PE) e a espessura do mesofilo (Me), diferiram diante da interação dos tratamentos (Tab. 3). Maior PP foi observado no mutante *hp1* em relação ao wt na condição controle, entretanto, o mesmo não ocorreu para a condição estresse. Foram observados resultados similares para o PE e Me, onde o *hp1* obteve maiores valores que o wt na condição controle, entretanto o oposto foi observado em condição de estresse (Tab. 3). Quando comparado um mesmo genótipo entre as condições de cultivo, observamos que em ambos o controle sobressaiu em relação as plantas estressadas para as características PP, PE e Me (Tab. 3).

Tabela 03. Micromorfometria da epiderme adaxial (Ep. Ad.) e abaxial (Ep. Ab.), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE) e mesófilo (Me) de 2 genótipos de microtomateiros: wt e *hp1*, submetidos a 2 condições contrastantes: controle e estresse, aos 7 DAI dos tratamentos.

Genótipos	Cond.	Ep. Ad. (μm)	Ep. Ab. (μm)	PP (μm)	PE (μm)	Me (μm)
wt	Controle	17,8 \pm 0,5	129,4 \pm 5,5	107,4 \pm 2,4 Ba	127,9 \pm 2,2 Ba	269,2 \pm 1,3 Ba
	Estresse	16,8 \pm 0,4	133,7 \pm 4,9	81,6 \pm 1,4 Ab	103,2 \pm 1,7 Ab	210,7 \pm 1,9 Ab
<i>hp1</i>	Controle	16,7 \pm 0,7	116,6 \pm 3,5	120,9 \pm 1,8 Aa	148,4 \pm 2,2 Aa	310,4 \pm 3,7 Aa
	Estresse	16,8 \pm 0,3	109,3 \pm 3,7	82,0 \pm 1,6 Ab	86,1 \pm 1,9 Bb	197,1 \pm 2,3 Bb
Genótipos		n.s.	n.s.	**	n.s.	**
Condições		n.s.	n.s.	**	**	**
Genótipos						
x		n.s.	n.s.	**	**	**
Condições						
Bloco		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C.V. (%)		11,74	10,57	6,94	5,58	3,51

Médias \pm EP (n = 5) seguida pela mesma letra, não diferiu significativamente entre si, letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma condição e letras minúsculas comparam genótipo entre diferentes condições conforme determinado pelo teste de Tukey (P > 0,05).

A análise de agrupamento dividiu os 4 tratamentos em 2 grupos distintos, sendo o grupo *a* formado pelos genótipos wt e *hp1*, ambos em condição de estresse combinado (40% CC + 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Logo, o grupo *b* foi constituído pelos dois genótipos sob condição controle (100% CC + 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). No grupo *a*, houve a tendência de incremento de diversas características em função do estresse, principalmente no wt. Isso, ocorreu principalmente nos mecanismos de defesa contra estresses, como atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e POX) e acúmulo de prolina. Outra resposta que se destacou foi a maior concentração de pigmentos no *hp1* e também do Y_{NO}. Entretanto, esses resultados não foram suficientes para separar os genótipos em condições de estresse num grupo distinto. No grupo *b*, que agrupa os genótipos na condição controle, observamos entre eles respostas semelhantes para variáveis de trocas gasosas e fluorescência. Entretanto, verificou-se níveis muito maiores de pigmentos fotossintéticos no *hp1*, da espessura de tecidos anatômicos foliares e da variável Fv/Fm. Assim como já comentado para o grupo *a*, diferenças observadas para o grupo *b* não foram capazes de separar os genótipos.

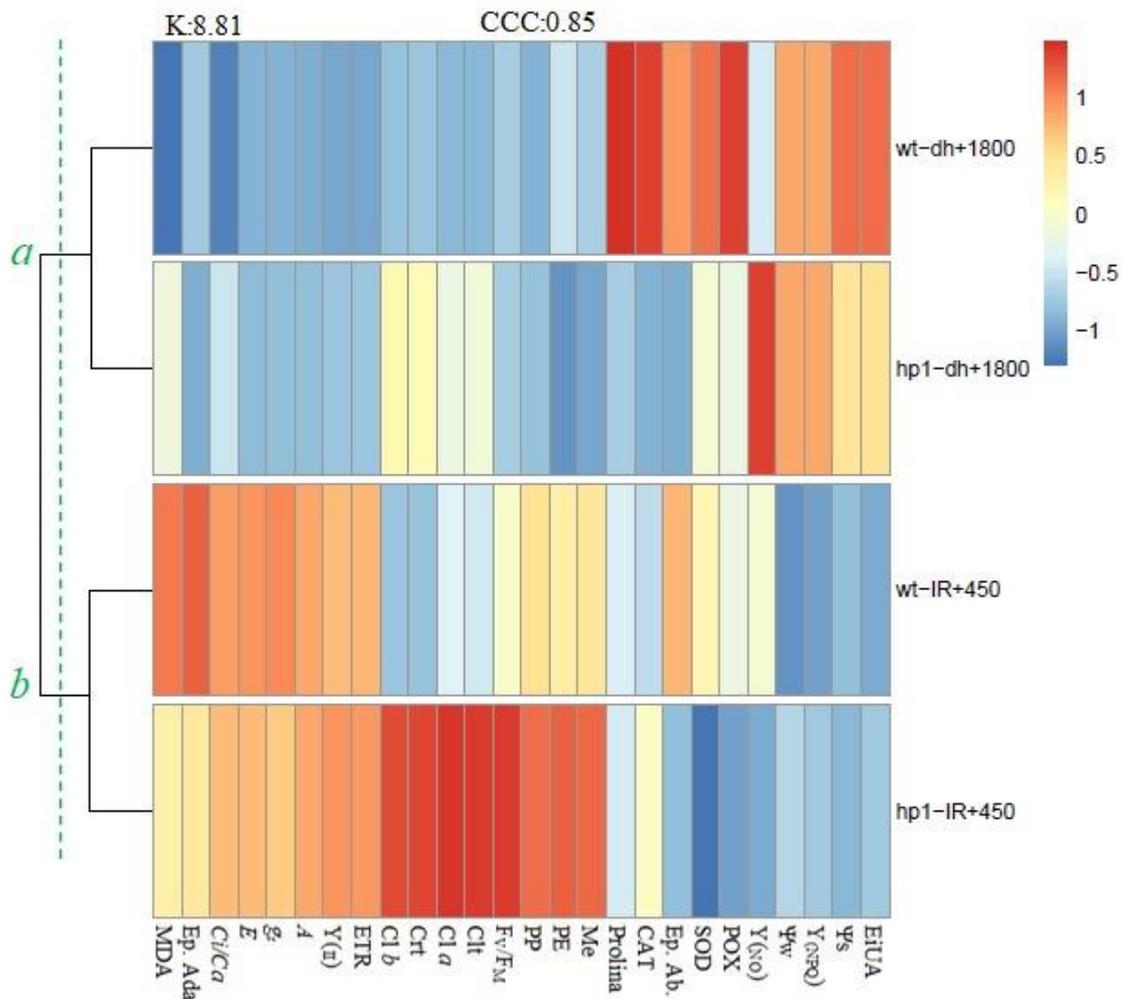


Figura 6. Dendrograma associado com *heatmap* para características anatômicas fisiológicas e bioquímicas de 2 genótipos de microtomateiros: wt e *hp1*, submetidos a 2 condições contrastantes: controle e estresse, aos 7 DAI dos tratamentos.

4. Discussão

Os genótipos de microtomateiro wt e *hp1* deste estudo reduziram tanto o potencial hídrico (Ψ_w) quanto o potencial osmótico (Ψ_s) foliar quando submetidos ao estresse combinado. Alves et al. (2016) também observaram diminuição no potencial hídrico nestes dois genótipos em condições somente do estresse pelo déficit hídrico. De acordo com Aghaie et al. (2018), quando expostas a estresses abióticos, as plantas podem ser levadas a respostas adaptativas e estratégias de aclimatação, como ajustamento osmótico (Turner, 2018). Neste estudo, apesar de ter ocorrido uma redução do Ψ_s nas plantas sob estresse, alcançando aproximadamente -1.6 Mpa, não é possível afirmar a ocorrência do ajustamento osmótico em função do acúmulo de prolina, pois este não foi significativo, divergindo do que normalmente é observado em resposta ao déficit hídrico em diversas espécies (Batista et al. 2018; Castro et al. 2019).

Entretanto, outros solutos, como as poliaminas, açúcares solúveis, cálcio, potássio, ácidos orgânicos e glicina também podem se acumular e contribuir para o ajustamento osmótico celular (Khan e Komatsu, 2016; Castro et al. 2019). A murcha observada nas folhas das plantas sob estresse dão suporte a hipótese de que a redução nos potenciais hídrico e osmótico dos microtomateiros ocorreu em função da redução no volume celular, em consequência do déficit hídrico (Monteiro et al. 2014; Tariq et al. 2018).

A forma e o tamanho das folhas mudam de acordo com a intensidade de luz (Ballaré, 1999), que juntamente com o déficit hídrico constituiu a combinação de fatores ambientais impostas das plantas deste estudo. Mishra et al. (2012), em experimentos com diferentes intensidades luminosas realizados com *Arabidopsis* em condições de campo e câmara climatizada, constataram diferenças na morfologia das folhas. Esses autores, ao verificarem as plantas cultivadas em alta irradiância, observaram folhas maiores e mais espessas, as quais tenderam a ter bordas mais onduladas e pecíolos mais curtos. Resultados semelhantes foram observados neste estudo com microtomateiros. De fato, várias são as respostas de aclimação foliar e ajustes que podem ocorrer desde a morfologia da planta até aquelas relacionadas à fotossíntese (Walters, 2005; Tezcan; Aslan; Kaman, 2019).

Dentre os efeitos fisiológicos a estresses, o fechamento estomático é uma resposta à aclimação dos genótipos ao déficit hídrico (Cirillo et al. 2017). A redução na taxa fotossintética, taxa transpiratória e na razão C_i/C_a mostraram inibição destes parâmetros devido ao fechamento estomático, evitando assim a perda de água, mas que ao mesmo tempo, resulta em menor assimilação de CO_2 e redução no crescimento (Rajabi et al. 2017; Jumrani e Bhatia, 2018; Castro et al. 2019).

Ao verificarmos os valores de eficiência intrínseca do uso da água, notou-se que este foi bastante proeminente nas condições de estresse quando comparado ao controle. Este resultado está vinculado à limitação da abertura estomática, a qual evita a perda de água da folha para o ambiente. Isso corrobora com a diminuição do C_i/C_a decorrente da limitação estomática, ou seja, o CO_2 não estava sendo absorvido em razão da combinação dos estresses sobre as plantas. De acordo com Buezo et al. (2019), a redução da concentração interna de CO_2 é mais um indicativo do fechamento estomático, e de que a limitação ao processo fotossintético não foi decorrente de dano evidente à enzima Rubisco (Castro et al. 2019).

Os parâmetros Ψ_w , Ψ_s , A , E , g_s , C_i/C_a e E_iUA mostraram que os genótipos *wt* e *hpl* trabalharam de forma semelhante para evitar os possíveis danos fisiológicos, quando estes estavam sob as condições de alta irradiância e déficit hídrico. Como não houve diferença entre os microtomateiros, podemos dizer que essa resposta de aclimatação é comum em ambos, o que corrobora com outros genótipos de tomate (Borba et al. 2017; Zhang et al. 2017; Tezcan; Aslan; Kaman, 2019).

A alta irradiância e o déficit hídrico limitam a função estomática impossibilitando a realização adequada da fotossíntese, induzindo estresse oxidativo e diminuindo a partição de elétrons destinados à carboxilação da Rubisco no ciclo de Calvin (Sousa et al. 2019; Sharma et al. 2019). Essas alterações se refletiram nos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*. Sob estresse hídrico severo, as plantas frequentemente desencadeiam efeito fotoinibitório, caracterizado por um decréscimo significativo do rendimento quântico do fotossistema II (FSII) (Sharma et al. 2019). O déficit hídrico, em combinação com altos níveis de irradiância (Gollan e Aron, 2020), podem causar significativa redução na eficiência fotossintética (do Carmo Araújo e Deminicis, 2009).

Os genótipos sob estresses combinados não tiveram diferenças para a variável rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m). Além disso, o F_v/F_m encontrada neste estudo ficou entre 0.80 e 0.82; valores que indicam que não houve fotoinibição crônica do fotossistema para ambos os genótipos de microtomateiros. Em ambos genótipos e condições não ocorreram diferenças significativas para os rendimentos quântico da dissipação regulada e não regulada de energia.

A eficiência fotoquímica das plantas foi afetada pelo estresse combinado, conforme visto pelas reduções no rendimento quântico efetivo do fotossistema II e na taxa aparente de transporte de elétrons. Tanto o déficit hídrico (Alves et al. 2016), quanto a alta irradiância (Yang, Tang, Yu, 2019) têm o potencial de causar esse efeito nas plantas. Entretanto esse efeito pode ser intensificado quando estes fatores ocorrem de forma conjunta (Sharma et al. 2019; Gollan e Aron, 2020), conforme evidenciado nesse estudo. A concentração mais elevada de pigmentos fotossintéticos não melhorou a eficiência fotoquímica do *hpl*, nem sob condições de controle ou estresse. Isso sugere que apenas a maior concentração de clorofilas não é suficiente para melhorar a eficiência da planta para aproveitar a energia luminosa disponível. Como a fixação de CO_2 está prejudicada pelo fechamento estomático, uma diminuição da fotoquímica atua como ajuste para reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Uma forma indireta de verificar o nível de estresse oxidativo em plantas é quantificar o teor de peroxidação de lipídios de membranas. Essas moléculas são os principais alvos das EROs em células de plantas sob estresses (Azmat e Moin, 2019). Em contrapartida neste estudo, a ausência de variações significativas de malonaldeído (MDA), cujo acúmulo indica danos em membranas, não foi observado. Componentes do sistema antioxidante, como a atividade das enzimas SOD e CAT, e também o teor de prolina, que além de osmolito atua como antioxidante não enzimático (Rivas et al. 2017) foram avaliados, porém não demonstram diferença entre os tratamentos. Por outro lado, a maior atividade da POX em plantas sob estresses combinados, bem como o seu maior nível no wt, sugere que tal enzima possui papel de defesa nas plantas, conseqüentemente, acarretando em ausência de variações significativas nos teores de MDA.

Ao mesmo tempo que a atividade da POX pode ter funcionado na defesa do WT contra o estresse, a maior concentração de pigmentos pode ter exercido esse papel no *hpl*. Conforme já esperado, os níveis de pigmentos cloroplastídicos foram influenciados pelas características fenotípicas do mutante utilizado. Assim, maiores valores de clorofila *a* e *b*, clorofila total e carotenoides foram verificados no *hpl*. Resultados semelhantes foram encontrados por Alves et al. (2016), comparando os genótipos *hpl* e *au..* O mutante *hpl* possui mutação na via de transdução de sinais, expressando hipersensibilidade nas respostas dos processos mediados pelo fitocromo (Peters et al. 1998). Kerckhoffs et al. (1997), encontraram no mutante *hpl* conteúdos elevados de clorofila, antocianinas e carotenoides em relação ao tipo selvagem. O mesmo foi relatado por Melo et al. (2009), que no seu experimento observou que o *hpl* obteve conteúdos de carotenoides, clorofila *a* e total, superiores ao WT.

A maior concentração de pigmentos do mutante *hpl* pode ser uma característica que determina as diferenças nas micromorfologia foliar entre os genótipos. O aumento no conteúdo de clorofilas e carotenoides no *hpl* na condição controle pode estar relacionado com o aumento do tamanho e densidade de seus plastídios, principalmente no parênquima paliçádico, o que provavelmente favorece a síntese e armazenamento destes pigmentos (Alves et al. 2016, Melo et al. 2011). O *heatmap* reforçou esses aspectos morfofisiológicos do *hpl*, de folhas mais espessas e acúmulo de pigmentos, mas como verificado neste estudo essas características não se traduzem em maior desempenho fotossintético. Quando expostos ao estresse, de modo geral, vimos que ambos genótipos foram afetados de forma similar, exibindo redução da espessura das

folhas. Com a redução da hidratação devido ao estresse, a expansão e o volume celular são diminuídos, as folhas murcham e isso reflete em redução na espessura dos tecidos foliares (Melo et al. 2011, Mirsha et al. 2012). Considerando esse aspecto, o *hpl* foi afetado de forma mais intensa do que o wt.

Respostas às condições abióticas como luz, regulam muitos aspectos diferentes do crescimento e desenvolvimento das plantas (Choudhury et al. 2018), e com as mudanças climáticas, muitas espécies enfrentam secas crescentes (Bartlett et al. 2014). Devido a estas condições, as plantas apresentam característica altamente plásticas, e assim mostram em distintas situações ambientais, respostas diferenciadas (Bartlett et al. 2014, Melo et al. 2011). Tanto o parênquima paliçádico quanto o parênquima esponjoso apresentam grande capacidade em responder a estímulos ambientais, afetando a espessura do limbo foliar. Portanto, estes parâmetros da micromorfometria dos microtomateiros também podem ter influenciado nas variáveis Ψ_w , Ψ_s , A , E , g_s , C_i/C_a e E_iU_A , discutidos anteriormente.

5. Conclusões

As combinações de alta irradiância e déficit hídrico acarretaram em mudanças nos genótipos wt e *hpl*, mas ambos apresentaram resultados semelhantes. Foi verificado que mesmo possuindo maior conteúdo de pigmentos cloroplastídicos no *hpl* em relação ao wt, o desempenho fotossintético do mesmo não foi melhor diante dos estresses combinados, havendo decréscimo nas trocas gasosas e eficiência fotoquímica.

Os mecanismos antioxidantes de defesa do *hpl* não foram ativados de forma mais intensa, sendo incapaz de minimizar o efeito do estresse combinado. Mesmo com aumento da atividade da POX para o wt, a imposição dos estresses combinados proporcionou mudanças na fisiologia dos genótipos. Houve ajustes anatômicos quando os genótipos foram expostos aos estresses combinados, onde o wt sobressaiu ao *hpl* para o parênquima esponjoso e o mesofilo.

A maioria das variáveis deste estudo não diferiram entre os genótipos de microtomateiros, mas somente para as condições impostas. Isso ficou claro também no dendrograma associado ao *heatmap*, pela divisão somente em dois grupos, um que inclui ambos genótipos na condição controle, e outro grupo com os genótipos condição estresse. Isso denota que os tratamentos afetaram as plantas de forma semelhante.

Embora o wt tenha induzido maior número de mecanismos de defesa em resposta ao estresse, o mutante *hp1* mostrou-se mais suscetível às condições de estresse impostas.

6. Referências

Alves, F. R. R., de Melo, H. C., Crispim-Filho, A. J., Costa, A. C., Nascimento, K. J. T., & Carvalho, R. F. (2016). Physiological and biochemical responses of photomorphogenic tomato mutants (cv. Micro-Tom) under water withholding. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(6), 155.

Aghaie, P., Hosseini Tafreshi, S. A., Ebrahimi, M. A., & Haerinasab, M. (2018). Tolerance evaluation and clustering of fourteen tomato cultivars grown under mild and severe drought conditions. *Scientia Horticulturae*, 232, 1–12. doi: 10.1016/j.scienta.2017.12.041.

Ashraf, M., Akram, N. A., Al-Qurainy, F., & Foolad, M. R. (2011). Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. In *Advances in Agronomy* (Vol. 111, pp. 249-296). Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-387689-8.00002-3.

Ballaré, C. L. (1999). Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. *Trends in plant science*, 4(3), 97-102. doi:10.1016/s1360-1385(99)01383-7.

Bates, L.S.; Waldren, R.P.; & Teare, E.D. Rapid determination of free proline for stress studies. *Plant Soil*, 39: 205–208, 1973.

Batista, P. F., Costa, A. C., Müller, C., Silva-Filho, R. O., Silva F. B., Merchant A, Mendes, G. C., & Nascimento, K.J.T. (2018). Nitric oxide mitigates the effect of water deficit in *Crambe abyssinica*. *Plant Physiol Biochem*, 129, 310-322.

Borba, M. E. A., Maciel, G. M., Júnior, E. F., Júnior, C. M., Marquez, G. R., Silva, I. G., & Almeida, R. S. (2017). Gas exchanges and water use efficiency in the selection of tomato geno-types tolerant to water stress. *Genetics and Molecular Research*, 16(2). doi: 10.4238/gmr16029685.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.

Castro, J. N., & Müller, C., Almeida, G. M., Costa, A. C. (2019). Physiological tolerance to drought under high temperature in soybean cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 13, 976-987.

Cirilo, C., De Micco, V., Roupheal, Y., Balzano, A., Caputo, R., & De Pascale, S. (2017). Morpho-anatomical and physiological traits of two *Bougainvillea* genotypes trained to two shapes under deficit irrigation. *Trees*, 31(1), 173-187. doi: 10.1007/s00468-016-1466-6.

Cruz, C.D. Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

Crispim-Filho, A.J.; Costa, A.C.; Alves, F.R.R.; Batista, P.F; & Rodrigues, A.A.; et al. Deficiency in phytochromobilin biosynthesis enhances heat-stress-induced impairments to the photosynthetic apparatus in tomato. *Biologia plantarum*, 63: 134-143, 2019. doi: 10.32615/bp.2019.016

Choudhury, FK, Devireddy, AR, Azad, RK, Shulaev, V. & Mittler, R. (2018). Respostas metabólicas locais e sistêmicas durante a sinalização sistêmica rápida induzida pela luz. *Fisiologia vegetal*, 178 (4), 1461-1472.

D'amico-Damião, V., Cruz, F. J. R., Gavassi, M. A., Santos, D. M. M., Melo, H. C., & Carvalho, R. F. (2015). Photomorphogenic modulation of water stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): the role of phytochromes A, B1, and B2. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90(1), 25-30.

Da Rosa Dorneles, K., Rebhahn, I., Ricardo Zeist, A., Deuner, S., & José Dallagnol, L. (2019). Aspectos morfofisiológicos e produção do tomateiro com incremento da concentração do CO₂ atmosférico. *Brazilian Journal of Agricultural Sciences/Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 14(1).

Dos Anjos Soares, L. A., de Sousa, J. R. M., Brito, M. E. B., Andrade, E. M. G., da Silva Sá, F. V., & da Silva, E. C. B. (2012). Respostas fisiológicas tomateiro na fase de floração sob estresse hídrico. *Agropecuária Científica no Semiárido*, 8(1), 51-55.

Genty, B., Briantais, J. M., & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 990, 87-92.

Gollan, P. J., & Aro, E. M. (2020). Photosynthetic signalling during high light stress and recovery: targets and dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375(1801). doi: 10.1098/rstb.2019.0406.

Huang, J., Zhao, X., & Chory, J. (2019). O transcriptoma de *Arabidopsis* responde específica e dinamicamente ao alto estresse luminoso. *Cell reports*, 29 (12), 4186-4199.

Herrmann, H. A., Schwartz, J. M., & Johnson, G. N. (2019). Metabolic acclimation—a key to enhancing photosynthesis in changing environments? *Journal of experimental botany*, 70(12), 3043-3056.

Huther, C. M., Martinazzo, E. G., Schock, A. A., Rombaldi, C. V., & Bacarin, M. A. (2018). Production components in transformed and untransformed 'Micro-Tom' tomato plants. *Revista Ciência Agronômica*, v. 49, n. 1, p. 85-92. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. ISSN 1806-6690. doi: 10.5935/1806-6690.20180010.

Jumrani, K., & Bhatia, V. S. (2018). Combined effect of high temperature and water-deficit stress imposed at vegetative and reproductive stages on seed quality in soybean. *Indian journal of plant physiology*, 23, 227-244.

- Li, J., Cang, Z., Jiao, F., Bai, X., Zhang, D., & Zhai, R. (2017). Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. *Journal of The Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16, 82-88. doi.org/10.1016/j.jssas.2015.03.001.
- Lombardini L., & Rossi L. (2019) Ecofisiologia de Plantas em Ambientes Secos. In: D'Odorico P., Porporato A., Wilkinson Runyan C. (eds) Dryland Ecohydrology. Springer, Cham doi: 10.1007/978-3-030-23269-6_4.
- Martí, E., Gisbert, C., Bishop, G. J., Dixon, M. S., & García-Martínez, J. L. (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of experimental botany*, 57(9), 2037-2047. doi:10.1093/jxb/erj154.
- Melo, H. C. D., Castro, E. M. D., Alves, E., & Perina, F. J. (2011). Anatomia foliar de microtomateiros fitocromo-mutantes e ultra-estrutura de cloroplastos. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(1), 11-18.
- Melo, H. C. D., Castro, E. M. D., Soares, Â. M., Oliveira, C. D., & Ramos, S. J. (2009). Physiological characteristics of micro-tomato (*Lycopersicon esculentum* P. Miller) phytochrome-mutants. *Ciência e Agrotecnologia*, 33(5), 1213-1219. doi:10.1590/S1413-70542009000500003.
- Mishra, Y., Jänkänpää, H. J., Kiss, A. Z., Funk, C., Schröder, W. P., & Jansson, S. (2012). Arabidopsis plants grown in the field and climate chambers significantly differ in leaf morphology and photosystem components. *BMC Plant Biology*, 12(1), 6. doi: 10.1186/1471-2229-12-6.
- Monteiro, J. G., Cruz, F. J. R., Nardin, M. B., & dos Santos, D. M. M. (2014). Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 49(1), 18-25. doi.org/10.1590/S0100-204X2014000100003.
- Morales, A., & Kaiser, E. (2020). Photosynthetic Acclimation to Fluctuating Irradiance in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 268. doi.org/10.3389/fpls.2020.00268.
- Pereira, A. I. A., Guimarães, J. D. J., Costa, J. V., de Cantuário, F. S., Salomão, L. C., de Oliveira, R. C., & Luz, J. M. Q. (2019). Growth of sweet pepper plants submitted to water tensions in soil and potassium silicate doses. *Horticultura Brasileira*, 37(1), 82-88.
- Rahbarian, R., Khavari-Nejad, R., Ganjeali, A., Bagheri, A., & Najafi, F. Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. (2011). *Acta Biol Cracoviensia Ser Bot* 53:47–56. doi: 10.2478/v10182-011-0007-2.
- Rajabi, A., Ehsanzadeh, P., & Razmjoo, J. (2019). Partial relief of drought-stressed fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) in response to foliar-applied zinc. *Pedosphere*, 29(6), 752-763. doi:10.1016/S1002-0160(17)60438-7.

- Rao, R.C. Advanced statistical methods in biometric research. New York: J. Wiley. 1952.
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Ramakrishnan, M., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., & Bakshi, P. (2019). Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: a review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-23.
- Scholander, P. F.; Hammel, H.T.; Bradstreet, E.D.; & Hemingsen, E.A. Sap pressure in vascular plants. *Science*, 148: 339 – 345, 1965.
- Smith, H. (1994). *Phytochrome transgenics: functional, ecological and biotechnological applications*. Seminars in Cell Biology. 5(5), 315–325. doi:10.1006/scel.1994.1038.
- Sousa, L. F., de Menezes-Silva, P. E., Lourenço, L. L., Galmés, J., Cruvinel Guimarães, A., Ferreira da Silva, A., & dos Santos Farnese, F. (2019). Improving water-use efficiency by changing hydraulic and stomatal characteristics in soybean exposed to drought: the involvement of nitric oxide. *Physiologia plantarum*. doi.org/10.1111/ppl.12983.
- Tariq, A., Pan, K., Olatunji, O. A., Graciano, C., Li, Z., Sun, F. & Huang, D. (2018). Phosphorous fertilization alleviates drought effects on *Alnus cremastogyne* by regulating its antioxidant and osmotic potential. *Scientific reports*, 8(1), 5644. doi.org/10.1038/s41598-018-24038-2.
- Tzcan, A., Aslan, G. E., & Kaman, H. (2019). Avaliação do estresse seca sobre o conteúdo de clorofila das plantas: uma revisão da família de Solanaceae. *Fresenius Boletim Ambiental*. Vol. 28, nº 6. pág 4636-4061.
- Turner, N. C. (2018) Turgor maintenance by osmotic adjustment: 40 years of Progress. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 69, No. 13 pp. 3223–3233. doi:10.1093/jxb/ery181.
- Walters, R. G. (2005). Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of experimental botany*, 56(411), 435-447. doi:10.1093/jxb/eri060.
- Yao, X., Zhou, H., Zhu, Q., Li, C., Zhang, H., Wu, J. J., & Xie, F. (2017). Photosynthetic response of soybean leaf to wide light-fluctuation in maize-soybean intercropping system. *Frontiers in plant science*, 8, 1695.
- Violet-Chabrand, S., Matthews, J. S., Simkin, A. J., Raines, C. A., & Lawson, T. (2017). Importance of fluctuations in light on plant photosynthetic acclimation. *Plant Physiology*, 173(4), 2163-2179. doi: 10.1104/pp.16.01767.
- Zhang, J., Liu, J., Zhao, T., & Xu, X. (2017). Effects of drought stress on chlorophyll fluorescence in tomato. *Molecular Plant Breeding*, 8. doi: 10.5376/mpb.2017.08.0007.

CAPÍTULO II

EFEITOS DA IRRADIÂNCIA E TEMPERATURA EM MICROTOMATEIROS MUTANTES FOTOMORFOGÊNICOS

RESUMO

A ocorrência de condições de estresses abióticos aumenta a cada ano, tornando-se um dos problemas de grande relevância para a agricultura. Conhecer como as plantas reagem diante da combinação de fatores estressantes é de fundamental importância para o sistema agrícola. Neste estudo, o objetivo foi analisar os efeitos de intensidades luminosas e de temperaturas contrastantes nos processos fisiológicos, bioquímicos e anatômicos de microtomateiros mutantes fotomorfogênicos. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, em esquema fatorial 4 x 4, sendo 4 genótipos - um selvagem, wt e 3 mutantes (au, *hp1* e *hp2*), expostos a 4 condições - 1) Controle (CONT), 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 25/20 °C (dia/noite); 2) Alta irradiância (AI), 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 25/20 °C; 3) Alta temperatura (AT), 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 40/20 °C; 4) Estresses combinados (AI+AT), 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 40/20 °C, com 4 repetições. Estas condições foram impostas por 7 dias em câmara climatizada de crescimento de plantas. Analisou-se as trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, anatomia foliar, pigmentos cloroplastídicos, concentração de proteínas e demalonaldeído (MDA) foliar, atividade das enzimas antioxidantes. Para as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* não houve interação entre genótipos e condições de estresse, mas somente diferença significativa para o fator isolado condições. O índice estomático e a densidade estomática adaxial apresentaram diferença significativa para o fator genótipo. Houve

interação entre genótipos e condições para a micromorfometria da epiderme, pigmentos cloroplastídicos, proteínas, MDA e na atividade das enzimas do sistema antioxidante. Os resultados obtidos mostraram que a condição controle foi mais propícia às plantas do que a condição combinada de alta irradiância ($1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura ($40 \text{ }^\circ\text{C}$). O estresse térmico promoveu danos ao metabolismo das plantas, mas, a irradiância mais elevada, ao contrário do esperado, contribuiu para reverter tais danos, favorecendo a aclimação dos microtomateiros à alta temperatura.

Palavras-chave: Estresse abiótico; Micro-Tom; luz; temperatura; *Solanum lycopersicum*.

ABSTRACT

Abiotic stress conditions have increased each year throughout the cycle of a crop, becoming one of the current problems of great relevance in agriculture. Knowing how plants react to the combination of stressful factors is of fundamental importance in the agricultural system. Thus, this study aimed to analyze the effects of different light intensities and contrasting temperatures on the physiological, biochemical, and anatomical processes of photomorphogenic mutant micro tomato plants. The experimental design was in randomized blocks, 4 x 4 factorial scheme, with four genotypes [one wild (wt) and three mutants (*au*, *hp1*, and *hp2*)] exposed to four conditions: (a) Control (CONT), $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and $40 \text{ }^\circ\text{C}/20 \text{ }^\circ\text{C}$; (b) High irradiance (HI), $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and $25 \text{ }^\circ\text{C}/20 \text{ }^\circ\text{C}$; (c) High temperature (HT), $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $40 \text{ }^\circ\text{C}/20 \text{ }^\circ\text{C}$; and (d) Combined stress (HI+HT), $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and $40 \text{ }^\circ\text{C}/20 \text{ }^\circ\text{C}$, and four replicates. These conditions were applied for seven days under an acclimatized plant growth chamber. Gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, electron transport rate, leaf anatomy, chloroplast pigments, protein, leaf malonaldehyde (MDA) concentration, and antioxidant enzyme activity were analyzed. There was no interaction between genotypes and stress conditions for gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence; there was a significant difference only in relation to the isolated factor conditions. The stomatal index and the adaxial stomatal density showed a significant difference for the genotype factor. There was an interaction between genotypes and conditions for the micromorphometry of the epidermis, chloroplast pigments, proteins, MDA and in the enzyme activity of the enzymatic antioxidant system. Results obtained

showed that the conditions used in these genotypes promoted greater plant acclimatization under the control condition ($450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) than under the combined condition of high irradiance ($1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and temperature ($40 \text{ }^\circ\text{C}$). This temperature caused damage to metabolism, but the high irradiance favored reversing such damage, when these conditions were imposed in combination; when they were exposed in isolation, they developed different acclimatization and/or defense strategies, seeking to overcome the imposed stress condition.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; Abiotic stress; Light; Micro Tomato; Temperature.

1 Introdução

Estresses combinados podem proporcionar reduções de produtividade em todo o mundo, como também a redução da área plantada. Os efeitos dos danos causados por essas combinações vêm tornando-se um dos maiores problemas enfrentados atualmente pela agricultura (Godoy et al. 2021). Dentre tais estresses, destacamos a alta irradiância e alta temperatura, condições comuns no campo, muito observadas durante os eventos de veranicos (Magalhães et al. 2020).

Luz e temperatura são fatores essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Ambas se complementam e dirigem processos fundamentais como germinação, florescimento e fotossíntese (Chory et al. 1996). Porém, a intensidade luminosa acima da capacidade de utilização eficiente pela planta, torna-se um fator de estresse. O mesmo se observa em temperaturas elevadas ($\geq 30^{\circ}\text{C}$), que dependendo da intensidade e duração da condição e também, do estágio de desenvolvimento que a planta se encontra, afetam os processos fisiológicos e reprodutivos, levando a perda de rendimento (Prasad et al. 2017).

Tanto o excesso de luz, quanto de temperatura, induz danos oxidativos celulares (Szymańska et al. 2017), causado pela geração de radicais livres nas células, como ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais são espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas substâncias são oxidantes dos componentes celulares e causam danos aos lipídios, às proteínas e também, danificam a estrutura do fotossistema II (PSII), podendo levar a planta a uma fotoinibição crônica (Choudhury et al. 2017). Quando em condições normais, os processos de geração e eliminação das EROs encontram-se em equilíbrio nas plantas; no entanto, sob estresses, o incremento dessas substâncias tóxicas pode superar a capacidade do sistema de defesas antioxidante. Os componentes enzimáticos de defesa antioxidante, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e alguns não enzimáticos, por exemplo,

prolina, flavonoides e carotenoides, são importantes para se determinar a capacidade de reação da planta aos estresses impostos (Khan et al. 2017).

Os estresses por alta irradiância e alta temperatura prejudicam o metabolismo e fazem com que as plantas desenvolvam estratégias para aperfeiçoar seu desempenho fotossintético. Dentre as medidas que podem ser adotadas para aclimatar-se aos estresses, alterações na estrutura foliar, como na espessura da epiderme (Ren et al. 2019), na densidade, tamanho e forma dos estômatos (Driesen et al. 2020), mostram-se altamente plásticas. As diferenças anatômicas podem explicar as variações fotossintéticas entre espécies distintas ou na mesma espécie, sob diferentes condições ambientais (Tsukaya, 2018).

Os microtomateiros tornaram-se uma valiosa ferramenta como planta modelo, para verificar como fatores do ambiente atuam nos processos fisiológicos e bioquímicos dos vegetais (Shikata e Ezura, 2016). Nesse sentido, mutantes fotomorfogênicos de microtomateiro podem revelar papéis ainda não descobertos das respostas a luz na tolerância ou sensibilidade das plantas aos fatores de estresses abióticos (Alves et al. 2016; Crispim-Filho et al. 2019).

Alguns genótipos possuem respostas contrastantes a luz, como o mutante *aurea* (*au*), com falha em perceber a luz para fotomorfogênese devido não produzir o cromóforo fitocromobilina, sendo deficiente no *pool* de fitocromos (Muramoto et al. 2005). Já os mutantes “*high pigment*” (*hp*) exibem uma resposta exagerada a luz. Neste grupo encontram-se os genótipos *high pigment 1* (*hp1*) e *high pigment 2* (*hp2*), super responsivos a eventos mediados pela luz. Eles possuem mutação em um repressor da via de transdução de sinais luminosos do fitocromo (Dias et al. 2015), e assim, expressam uma hipersensibilidade nas respostas dos processos mediados pelo fitocromo (Peters et al. 1998).

Perante ao exposto, neste estudo, algumas hipóteses foram levantadas: (i) alta irradiância e alta temperatura quando impostas de forma combinada induzem mudanças fisiológicas e anatômicas nos microtomateiros fotomorfogênicos, diferentes de quando são impostas isoladas; (ii) os genótipos *au*, *hp1* e *hp2* quando expostos aos estresses possuem mecanismos de defesas mais atuantes do que o wt; (iii) o genótipo *au* por ter uma falha ao perceber a luz para a fotomorfogênese se aclimata diferente dos genótipos *hp1* e *hp2*; (iv) com alta concentração de pigmentos nas folhas os genótipos *hp1* e *hp2* respondem melhor ao estresse combinado de alta irradiância e alta temperatura. Diante destas hipóteses, um genótipo selvagem (wt) e 3 mutantes fotomorfogênicos (*au*, *hp1* e

hp2) foram expostos de forma isolada e combinada a irradiâncias e temperaturas contrastantes, com o objetivo de verificar se os genótipos desenvolvem mecanismos nos quais os estresses supracitados regulam as respostas de defesa e de aclimação das plantas.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal, desenho experimental e condições experimentais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, em câmara de crescimento de plantas, sob condições controladas, utilizando quatro genótipos de microtomateiros, cultivar (cv.) Micro-Tom, sendo um tipo selvagem (wt) sem mutação, e três mutantes fotomorfogênicos: *high-pigment 1 (hp1)*, *high pigment 2 (hp2)* e *aurea (au)*. Foram conduzidos dois experimentos independentes e para tal, dois lotes de plantas foram cultivados para a obtenção dos dados, cada um com 32 plantas. O primeiro experimento consistiu da exposição dos quatro genótipos a duas condições, controle e alta irradiância, e no segundo, as plantas foram expostas a alta temperatura e à combinação de alta irradiância com alta temperatura, conforme descrito abaixo.

Antes do plantio, as sementes foram acondicionadas por 8h em água corrente para quebra da dormência. Posteriormente, semeadas em vasos de 8L contendo substrato comercial Bioplant® permaneceram na casa de vegetação, até germinarem. Após 21 dias, as plântulas foram selecionadas de acordo com o aspecto fitossanitário e uniformidade do tamanho. Em seguida, uma planta foi transplantada para vasos de plástico com capacidade de 2 L, contendo uma mistura na proporção 2:1 de solo (Latosolo Vermelho Distrófico típico) e areia, adubado conforme resultado da análise química.

Em seguida os vasos foram levados para câmara de crescimento (Intalafrio, Pinhais, PR, Brasil), e mantidos por 7 dias para aclimação, sob as seguintes condições: temperatura de 25/20 °C (dia/noite), umidade relativa (UR) do ar de 60%, radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas (7h-19h). Após esse período foram impostos tratamentos mediante as seguintes condições de PAR e de temperaturas (dia/noite): 1) Controle (CONT) - 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 25/20 °C; 2) Alta irradiância (AI) - 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 25/20 °C; 3) Alta temperatura (AT) - 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 40/20 °C; 4) Combinada - 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 40/20 °C. A alta irradiância

e a alta temperatura, tanto de forma isolada quanto combinada foram impostas durante 7 dias consecutivos e ao final, foram realizadas avaliações não destrutivas das plantas, bem como a coleta de material vegetal (folhas) para as análises posteriores.

O período diário de imposição das condições de estresse (AI e AT) foi de 6 horas (10h até 16h). Após esse período, as plantas retornavam para as condições iniciais de PAR ($450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), permanecendo assim até novo ciclo no dia seguinte. As plantas foram irrigadas diariamente para manutenção das condições ótimas de umidade do substrato. A UR e o fotoperíodo foram mantidos constantes durante todo o período experimental. As condições ambientais na câmara de crescimento foram controladas por meio do software Lab View, (Intalafrio, Pinhais, PR, Brasil).

2.2. Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, em esquema fatorial 4×4 , sendo 4 genótipos de microtomateiros expostos a 4 condições, com 4 repetições cada tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e, quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) por meio do Sistema de Análise de Variância (SISVAR – Versão 5.4, 2010).

2.3. Detalhamento das avaliações

2.3.1. Trocas Gasosas

As trocas gasosas das plantas foram avaliadas para registro da taxa fotossintética (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e da relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a). Estas avaliações foram realizadas utilizando um analisador de gases do infravermelho (IRGA), equipado com um fluorômetro, modelo LI-6800 (Licor, Nebraska, Estados Unidos), sempre utilizando uma folha completamente expandida.

2.3.2. Fluorescência da clorofila *a*

As variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram obtidas na mesma área da folha onde realizou-se as medidas das trocas gasosas, utilizando o fluorômetro acoplado ao IRGA. Inicialmente, as folhas foram adaptadas ao escuro para que os centros de reação estivessem completamente abertos (aceptores primários oxidados) com perda de

calor mínima, permitindo obter as variáveis de indução da fluorescência: fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_m) (Genty et al. 1989).

A partir desses valores foi calculado o rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII; $F_v/F_m = (F_0 - F_m) / F_m$) (Genty et al. 1989). As variáveis da fase lenta foram obtidas após a aplicação de uma iluminação actínica, seguida de um pulso de luz actínica saturante para a determinação da fluorescência *steady-state* (F) e da fluorescência máxima em amostras adaptada à luz (F_m'). A partir dessas variáveis foram calculados o rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no FSII ($\Phi_{PSII} = (F_m' - F) / F_m'$). O Φ_{PSII} foi utilizado ainda para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons ($ETR = \Phi_{PSII} \times PAR \times Leaf_{ABS} \times 0,5$) (Bilger et al. 1995), em que PAR é o fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha; $Leaf_{ABS}$ correspondente à fração de luz incidente absorvida pelas folhas e 0,5 à fração de energia de excitação distribuída para o FSII (Laisk e Loreto, 1996).

2.3.3. Caracterização da micromorfometria foliar

Para as análises morfoanatômicas da epiderme adaxial e abaxial, parênquima paliçádico e lacunoso e mesofilo. Amostras da região mediana de folhas completamente expandidas foram coletadas e armazenadas em Karnovsky (1965) por 24h. As amostras foram desidratadas em séries etílicas crescentes e em seguida, infiltradas em historesina, de acordo com as recomendações do fabricante. Após 72 horas, os blocos foram seccionados em micrótomo de rotação automática, em secções de $5\mu\text{M}$. Os cortes foram corados com o corante policromático azul de toluidina, preparado segundo O'Brien et al. (1964). Lâminas permanentes para cada amostra foram montadas contendo 6 secções transversais por lâmina. Observações das lâminas foram realizadas em microscópio Olympus com câmera digital acoplada (modelo BX61, Tokyo, Japan).

Para visualização da epiderme vegetal, realizou-se a técnica de impressão epidérmica, utilizando uma folha bem desenvolvida de cada planta. Numa lâmina de microscopia, uma gota de adesivo instantâneo universal (éster de cianoacrilato) foi adicionado, onde a região de interesse da folha foi pressionada por cerca de 10s, tempo necessário para que o adesivo espalhe e seque. Após a folha foi retirada com delicadeza, ficando na lâmina apenas a impressão epidérmica. Foi realizado esse procedimento para ambos os lados da folha. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio Olympus com câmera digital acoplada (modelo BX61, Tokyo, Japan).

2.3.4. Concentração de pigmentos foliares

Os pigmentos foliares foram extraídos de 3 (três) discos foliares de 0,5cm de diâmetro, utilizando-se 5mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com CaCO₃, durante 6 horas de incubação a 60°C. As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b*, e carotenoides foram determinadas em espectrofotômetro UV-visível, nos comprimentos de onda de 665, 649 e 480 nm, respectivamente. As concentrações de pigmentos foram calculadas de acordo com as equações propostas por Wellburn (1994), e os resultados foram expressos em $\mu\text{g cm}^2$. A concentração de clorofila total refere-se a soma das concentrações de clorofilas *a* e *b*.

2.3.5. Determinação de proteínas totais

Amostras foliares de 100 mg foram submetidas à extração etanólica em três etapas sequenciais, nas concentrações de 98%, 80% e 50%. O pellet resultante da extração foi homogeneizado em 400 μL de hidróxido de sódio 0,1 M (NaOH) e incubado a 95 ° C por 1 h, conforme descrito por Gibon et al. (2004). Em seguida, 5 μL do sobrenadante foram adicionados a 295 μL do reagente de Bradford (Bradford 1976) e a absorbância medida a 595 nm. As concentrações de proteínas solúveis totais nas amostras foram determinadas por meio de curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) (0-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

2.3.6. Concentração de malonaldeído (MDA) foliar

O conteúdo de MDA foi avaliado para determinar a peroxidação de lipídios utilizando o método proposto por Heath e Packer (1968), com modificações. Foram maceradas aproximadamente 160 mg de folhas frescas em almofariz congelado com solução de extração de 2 mL de TCA 0,1%. O extrato foi centrifugado a 12000 rpm, durante 15 minutos a 4°C e, posteriormente, 500 μL do sobrenadante foi adicionado a 1,5mL da solução TBA 0,5% + TCA 20% (p/v) e aquecidos em estufa a 90 °C, em tubos fechados, por 20 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo por um minuto, posteriormente foi centrifugado a por 4 minutos e as leituras realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (modelo Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific, Madison, EUA), a 440, 532 e 600nm. A concentração do complexo malonaldeído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) produzido foi calculada, utilizando o coeficiente de extinção molar de 155mM⁻¹ cm⁻¹ (Heath e Packer, 1968) através da fórmula: MDA

(nmol ml⁻¹) = [(A532-A600)/ 155000] 106. Os resultados foram expressos em nmol TBA-MDA g⁻¹ MF.

2.3.7. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Os extratos enzimáticos para a determinação da atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e peroxidase do ascorbato (APX) foram obtidos pela maceração de, aproximadamente 0,2 mg de folhas em 1 mL de meio de extração, constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8; EDTA 0,1mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e PVPP 1% (p/v). O extrato foi submetido à centrifugação a 12.000 RPM, por 15 min, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação da atividade enzimática.

A atividade da SOD foi determinada num meio de reação composto por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75mM; metionina 13 mM (pH 7,8) e de riboflavina 2µM, juntamente com o extrato enzimático (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi considerada como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971). O resultado foi expresso em U SOD min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A atividade da CAT foi determinada pela adição do extrato enzimático ao meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi avaliado a 240 nm, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al. 1995) e expresso em µmol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A atividade da POX foi determinada pela adição de 0,10 mL do extrato enzimático bruto a 4,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8; pirogallol 20 mM e H₂O₂ 20 mM (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420nm e temperatura de 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em µmol de purpurogalina min⁻¹ g⁻¹ de proteína.

Para atividade da APX foi utilizada a metodologia proposta por Nakano e Asada (1981). A reação foi iniciada após a adição de 50 µl do extrato enzimático bruto em 1,95ml do meio de reação contendo tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH6,0),

H₂O₂ (1 mM) e ascorbato (0,8 mM). A atividade da APX foi medida pela taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm durante um minuto a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (Nakano e Asada, 1981) foi utilizado para calcular a atividade da APX.

A determinação da concentração de proteínas nos extratos utilizados na avaliação da atividade enzimática foi realizada pela metodologia proposta por Bradford (1976) no comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão da proteína albumina sérica bovina (BSA).

3. Resultados

Para as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* (Figura 01 e 02), não houve interação significativa entre genótipos e condições de estresse, mas somente para o fator condições de cultivo. Observou-se redução na taxa fotossintética (*A*) (Figura 01, A) e condutância estomática (*g_s*) (Figura 01, B) na condição de AT, mas sem diferir das plantas controle. A taxa transpiratória (*E*) (Figura 01, C) e razão entre a concentração interna e externa de CO₂ (*C_i/C_a*) (Figura 01, D) dos microtomateiros na condição de AT apresentaram valores menores, quando comparado a condição combinada.

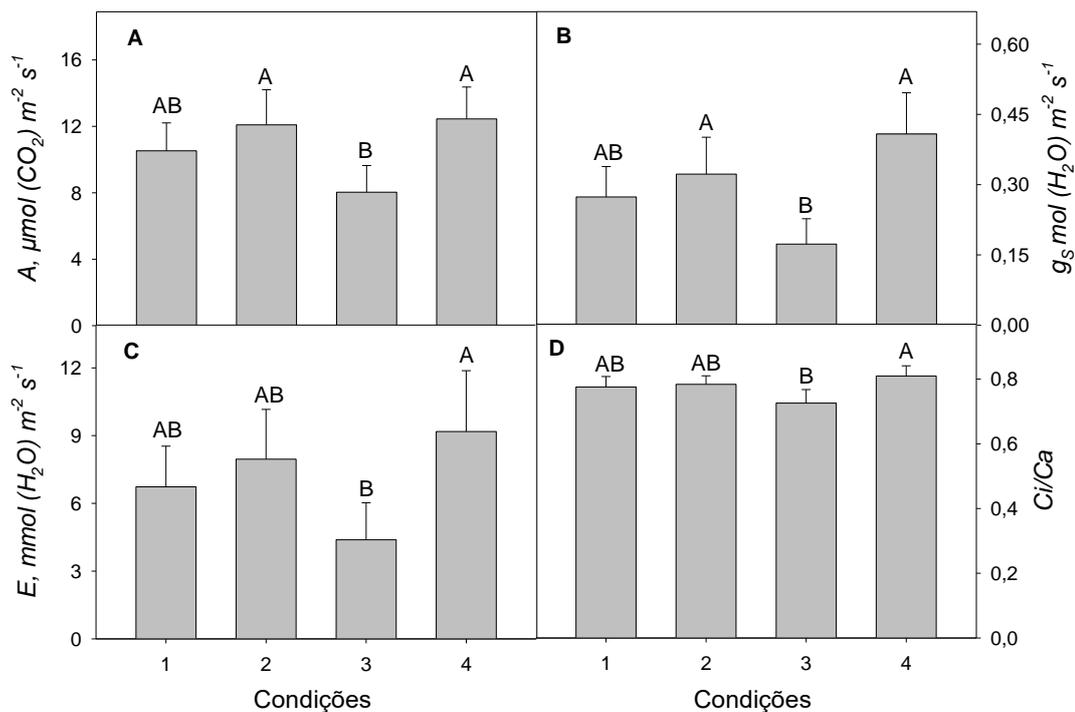


Figura 1. Taxa fotossintética (*A*, A), condutância estomática (*g_s*, B), taxa transpiratória (*E*, C), razão entre a concentração interna e externa de CO₂ (*C_i/C_a*, D) de microtomateiros submetidos durante 7 dias às seguintes condições: 1) Controle (CONT) - 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 25/20 °C; 2) Alta irradiância (AI) - 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 25/20 °C; 3)

Alta temperatura (AT) - $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $40/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 4) Combinada (AI+AT) - $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $40/20 \text{ }^\circ\text{C}$. Os dados são médias \pm EP (n=16). Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Houve diferença significativa somente para as condições, nas variáveis rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm) e taxa de transporte de elétrons (ETR). Para a variável Fv/Fm (Figura 02, A), não houve diferença entre as condições AT e CONT. Já a ETR (Figura 02, B) foi maior nas condições AI e AI+AT, quando comparadas ao CONT.

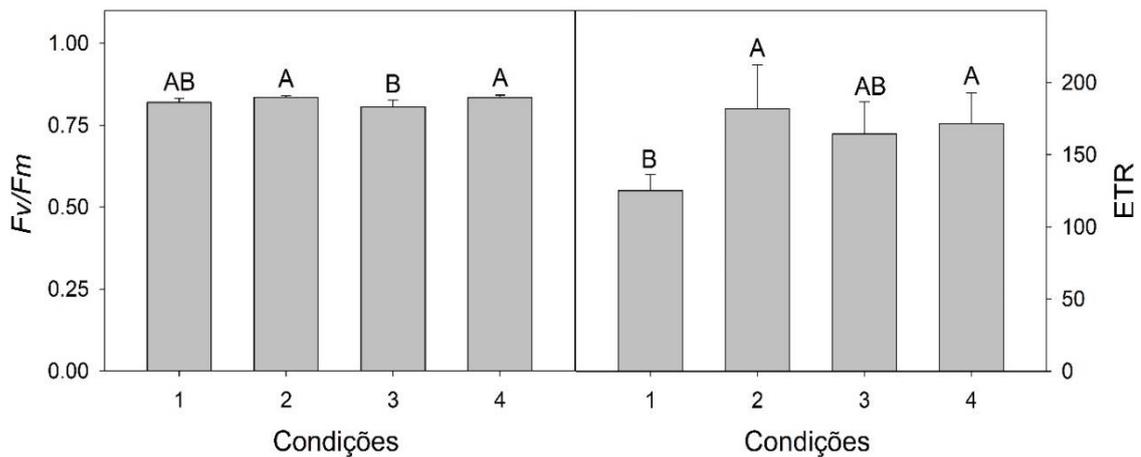


Figura 2. Rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm, A), taxa de transporte de elétrons (ETR, B) de microtomateiros submetidos durante 7 dias às seguintes condições: 1) Controle (CONT) - $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $25/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 2) Alta irradiância (AI) - $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $25/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 3) Alta temperatura (AT) - $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $40/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 4) Combinada (AI+AT) - $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $40/20 \text{ }^\circ\text{C}$. Os dados são médias \pm EP (n=16). Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para o índice estomático adaxial e a densidade estomática adaxial, observamos diferença significativa somente entre os genótipos. Maiores valores dessas características foram observados para o genótipo *hp2* em relação ao wt (Figura 03).

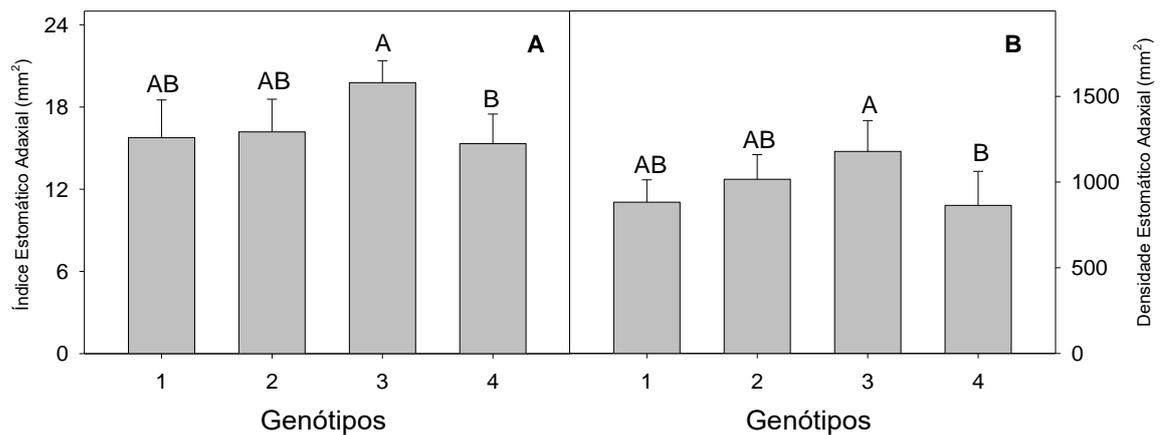


Figura 3. Índice estomático adaxial (IEad, A), Densidade estomática adaxial (DEad; B) de microtomateiros: 1- *aurea*, 2- *hp1*, 3- *hp2* 4- *wt*, após 7 dias de imposição das condições: CONT, AI, AT e combinada (AI+AT). Os dados são médias \pm EP (n=16). Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os resultados da análise estatística para os dados da estrutura anatômica foliar mostraram interação significativa entre genótipos e condições para a micromorfometria da epiderme adaxial (Ep. Ad), abaxial (Ep. Ab), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE) e mesofilo (Me) (Figura 04). A espessura da Ep. Ad não diferiu entre os genótipos, dentro das condições AI, AT e AI+AT. Na condição CONT, o genótipo *au* apresentou menor espessura da Ep. Ad, em relação aos demais genótipos (Figura 04, A). Comparando um mesmo genótipo entre as condições, os genótipos *hp1* e *hp2* não diferiram significativamente. O *wt* demonstrou maior espessura da Ep. Ad na condição CONT e AI, já para o *au*, os maiores valores foram observados nas condições de AT e AI+AT (Figura 04, A).

Quanto a espessura da Ep. Ab, na condição CONT, o genótipo *wt* e o *aurea* apresentaram menor valor em relação ao *hp2*, enquanto na condição AI, foram o *wt* e o *hp1* que apresentaram menor Ep. Ab em relação ao *hp2*. O *hp1* em AT apresentou menor espessura da Ep. Ab em relação ao *aurea* e *hp2*. Já na condição combinada, a Ep. Ab foi menor no *wt* em relação ao genótipo *hp2* (Figura 04, B). Comparando os genótipos entre as condições, não houve diferença significativa para espessura da Ep. Ab, nos genótipos *au*, *hp2* e *wt*. Somente para o genótipo *hp1* que a espessura da Ep. Ab foi maior no CONT, nas condições AI e AI+AT (Figura 04, B).

Na Figura 04-C, observamos que a espessura do PP na condição de AT não diferiu entre os genótipos. Na condição CONT, o *hp2* e o *wt* obtiveram maior espessura

do PP do que o *hp1*. O *hp2* exibiu maior espessura do PP na condição AI do que os demais genótipos, enquanto na condição AI+AT, o mesmo foi verificado no *hp1*. Comparando o mesmo genótipo entre as condições, o genótipo *aurea* e wt não diferiam estatisticamente entre as condições. O *hp1*, apresentou menor espessura nas condições CONT, AI e AT e o *hp2* no CONT, AT e AI+AT (Figura 04, C). Para o PE, o genótipo *hp2* nas condições CONT, AT e AI+AT apresentou maior espessura, quando comparado aos demais genótipos. Já na condição de AI, os genótipos *hp2* e wt demonstraram maior espessura do PE (Figura 04, D). Comparando o mesmo genótipo entre as condições, maior espessura de PE foi verificado que para o genótipo *au* nas condições estressantes (Figura 04, D). Já para o *hp1* maiores valores de PE foram observados na condição AI+AT, enquanto resultado contrário foi observado para o *hp2*, em que a condição AI+AT obteve menores valores de PE (Figura 04, D). Para o genótipo wt, a espessura de PE foi observada na condição AI+AT (Figura 04, D).

Para a espessura do Me, maiores valores no CONT foram observados no *hp2*, em comparação com o *au* e *hp1*. Logo, para a condição AI, os genótipos *hp1* e o wt, demonstraram maior Me. Sob AT, o *hp2* apresentou maior espessura do Me em relação aos demais genótipos. Na condição AI+AT, maior espessura de Me foi verificada para o *hp1* (Figura 04, E). Comparando o mesmo genótipo entre as condições, os genótipos *au* e *hp2* não diferiram estatisticamente. Menor espessura de Me para o *hp1* ocorreu nas condições CONT, AI e AT. O wt, apresentou menor espessura de Me sob AT e na condição AI+AT (Figura 04, E).

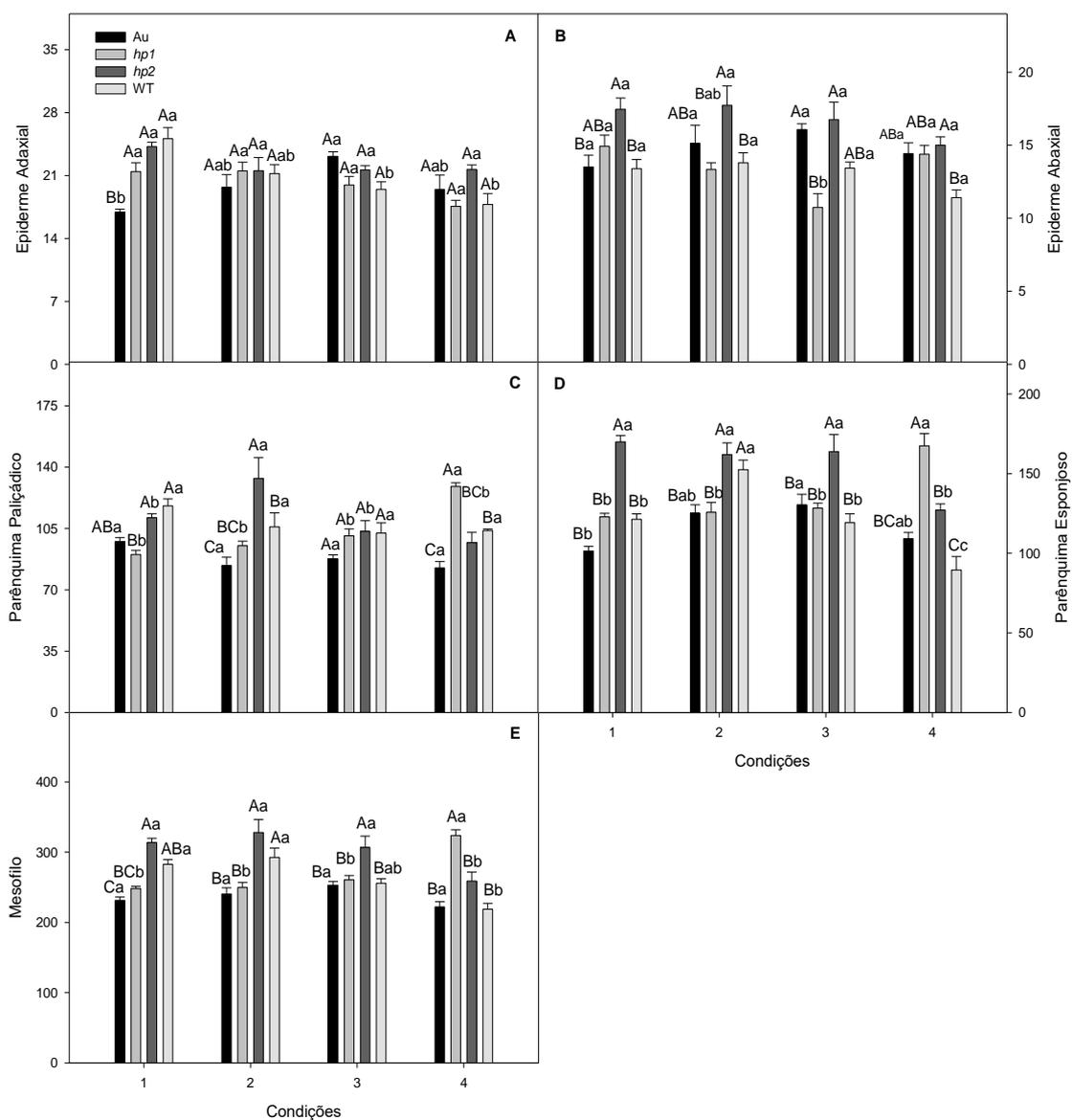


Figura 4. Espessuras (μm) da epiderme adaxial (Ep. Ad.; A), abaxial (Ep. Ab.; B), parênquima paliçádico (PP, C), parênquima esponjoso (PE, D) e mesofilo (Me, E) de microtomateiros submetidos durante 7 dias às seguintes condições: 1) Controle (CONT) - $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $25/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 2) Alta irradiância (AI) - $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $25/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 3) Alta temperatura (AT) - $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $40/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 4) Combinada (AI+AT) - $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $40/20 \text{ }^\circ\text{C}$. Os dados são média \pm EP (n=4). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de uma mesma condição, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre as condições (Tukey, $p < 0,05$).

Neste estudo, houve interação significativa entre as condições e genótipos para os pigmentos cloroplastídicos. Foram observadas menores concentrações de pigmentos cloroplastídicos (Figura 05) no genótipo *aurea* (*au*), em relação aos demais. Quando verificamos as condições, no controle (CONT), maiores concentrações de clorofila *a* foram observadas no genótipo *hp2*, em contrapartida para os estresses combinados

(AI+AT), o *hp1* demonstrou maior concentração (Figura 05, A). Já em alta irradiância (AI) e alta temperatura (AT), os genótipos *hp1* e *hp2* apresentaram maiores concentrações de clorofila *a* (Figura 05, A). Ao analisarmos os genótipos dentro das condições, o *au* não diferiu entre as condições, já para o *hp1*, maiores valores foram para o AT e AI+AT em relação as demais condições (Figura 05, A). Maiores valores de clorofila *a* para o *hp2* foram observados na condição AT, logo para o wt as condições CONT, AT e AI+AT obtiveram maiores valores (Figura 05, A).

Maiores valores de clorofila *b* foram observados para os genótipos *hp1* e *hp2* nas condições CONT, AI e AT (Figura 05, B). Já na condição AI+AT, as concentrações de clorofila *b* foram maiores no genótipo *hp1*, enquanto os menores valores dentro de todas as condições foram observados para o genótipo *au* (Figura 05, B). Quando comparados os genótipos dentro das condições, observamos maiores valores de clorofila *b* para o CONT e AT no genótipo *au*. Para os genótipos *hp1*, *hp2* e wt, os maiores valores de clorofila *b* foram para as condições AT em relação as demais (Figura 05, B).

Para clorofila total, o *au* apresentou menores concentrações em relação aos demais genótipos nas condições CONT e AI. Para as condições AT e AI+AT, os maiores valores foram para os genótipos *hp1* e *hp2* (Figura 05, C). Quando verificamos as variações das concentrações de clorofila total dos genótipos dentro das condições, observamos que para o *au* e o wt não houve diferença entre as condições, enquanto para o *hp1* foi maior na condição AT e AI+AT. Maiores valores de clorofila total foram registrados sob AT o *hp2* (Figura 05, C). Maior concentração de carotenoides no genótipo *hp2* foi observado nas condições CONT, AT e AI+AT. Na condição AI, maiores valores foram evidentes para os genótipos *hp1* e *hp2* (Figura 05, D). Quando comparado os genótipos dentro das condições, para o *au* não houve diferença significativa. Já para os genótipos *hp1* e wt, maiores valores foram para as condições AT e AI+AT, e no genótipo *hp2*, a maior concentração de carotenoides foi verificada na condição AT (Figura 05, D).

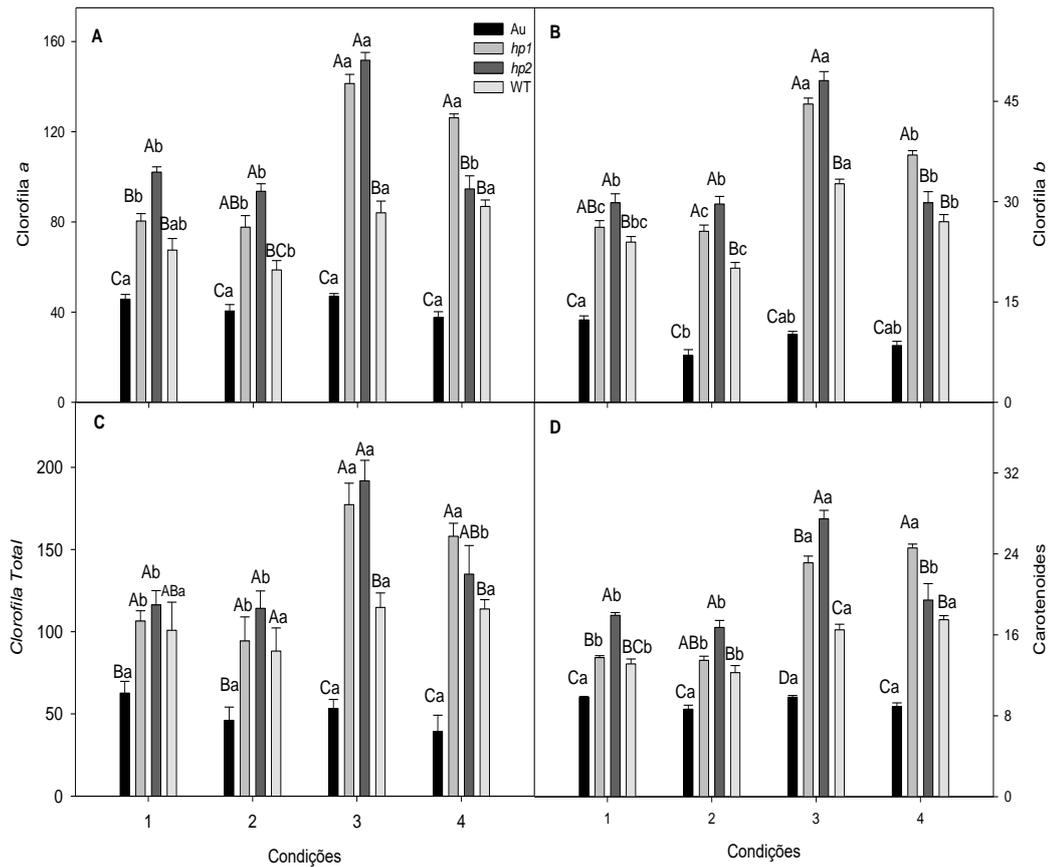


Figura 5. Clorofila *a* (Cl *a*, A), Clorofila *b* (Cl *b*, B), Clorofila total [*a*+*b*] (Clt, C) e Carotenoides (Crt, D) de microtomateiros submetidos durante 7 dias às seguintes condições: 1) Controle (CONT) - 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 25/20 °C; 2) Alta irradiância (AI) - 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 25/20 °C; 3) Alta temperatura (AT) - 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 40/20 °C; 4) Combinada (AI+AT) - 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 40/20 °C. Os dados são média \pm EP (n=4). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de uma mesma condição, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre as condições (Tukey, $p < 0,05$).

Houve interação significativa entre genótipos e condições para os teores de proteínas totais (Figura 06). Os genótipos *hp1* e *hp2* apresentaram maiores teores de proteínas nas condições CONT, AI e AI+AT. Sob AT, o *hp2* demonstrou maior teor de proteínas em relação aos demais genótipos (Figura 06). Ao verificarmos os genótipos entre as condições, o *au* apresentou maior teor de proteínas sob AT. Já *hp1*, os maiores valores foram para CONT, AT e AI+AT (Figura 06). O genótipo *hp2* na condição AT demonstrou maior teor de proteínas, enquanto o *wt* exibiu maiores teores sob AI, AT e AI+AT (Figura 06).

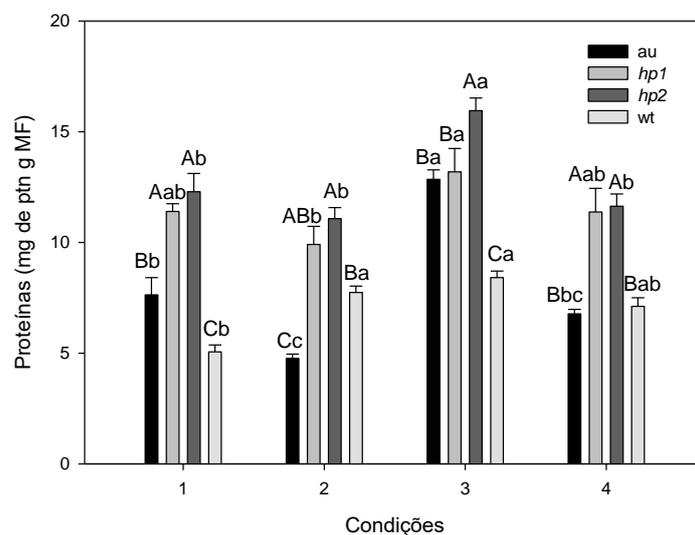


Figura 6. Teor de proteínas totais em folhas de microtomateiros submetidos durante 7 dias às seguintes condições: 1) Controle (CONT) - $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $25/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 2) Alta irradiância (AI) - $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $25/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 3) Alta temperatura (AT) - $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $40/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 4) Combinada (AI+AT) - $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $40/20 \text{ }^\circ\text{C}$. Os dados são média \pm EP (n=4). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de uma mesma condição, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre as condições (Tukey, $p < 0,05$).

Houve interação significativa entre genótipos e condições para concentração de malonaldeído (MDA) (Figura 07). As concentrações de MDA nos genótipos não diferiu nas condições de AT e AI+AT, e mesmo na condição CONT o *hp1* apresentou maior concentração de MDA. Já na condição de AI, o *hp1* e *wt* tiveram maiores concentrações de MDA (Figura 07). Ao observarmos os genótipos entre as condições, verificou-se que o *hp1* e o *wt* apresentaram maiores concentrações de MDA na condição CONT e AI. Para os genótipos *au* e *hp2*, maiores valores de MDA foram observados para a condição CONT, seguida da condição de AI (Figura 07).

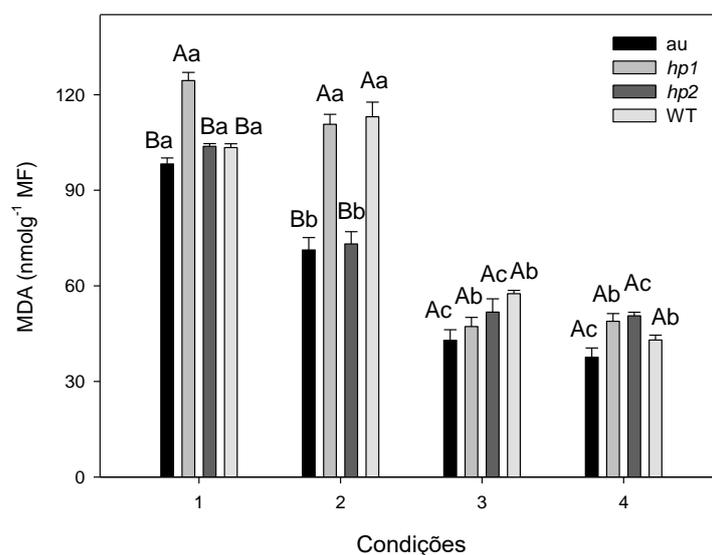


Figura 7. Concentração de malonaldeído (MDA) em folhas de microtomateiros submetidos durante 7 dias às seguintes condições: 1) Controle (CONT) - $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $25/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 2) Alta irradiância (AI) - $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $25/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 3) Alta temperatura (AT) - $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $40/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 4) Combinada (AI+AT) - $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $40/20 \text{ }^\circ\text{C}$. Os dados são média \pm EP (n=4). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de uma mesma condição, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre as condições (Tukey, $p < 0,05$).

Houve interação significativa entre genótipos e condições para atividade das enzimas do sistema antioxidante enzimático (Figura 08). Na condição CONT, a atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD) não diferiu entre os genótipos (Figura 08, A). Já para a condição, AI o genótipo *hp1* apresentou maior atividade da SOD em relação ao *hp2* e wt, enquanto que na condição de AT foi maior no wt em relação ao demais genótipos. Na condição AI+AT, os genótipos *au* e *hp1* tiveram maior atividade da SOD em relação ao *hp2* (Figura 08, A). Verificando-se o comportamento dos genótipos entre as condições, para o genótipo *au* os maiores valores da SOD foram observados para AI+AT em relação a condição de AT (Figura 07, A). Já o genótipo *hp1* obteve maiores valores de SOD nas condições CONT, AI e AI+AT. Para o genótipo *hp2* não foi observado diferença entre as condições, enquanto o wt, teve maior atividade da SOD para as condições CONT e AT (Figura 08, A).

Na Figura 07-B observamos maior atividade da catalase (CAT) no *hp1* na condição CONT. Este mesmo genótipo, juntamente com o *au* e o wt, apresentaram maior atividade da CAT em relação ao *hp2* sob a condição AI (Figura 08, B). Em AT os genótipos não diferiram entre si. Já sob a condição AI+AT, o *hp2*, demonstrou maior

atividade da CAT do que o *au* e wt (Figura 08, B). Quando comparada a atividade da CAT para um mesmo genótipo entre as condições, o wt apresentou atividade semelhante para todas as condições. Para o *au*, maiores valores de atividade da CAT foram observados para as condições CONT e AI (Figura 08, B). Quando verificamos o genótipo *hp1*, maiores valores de CAT ocorreram na condição CONT, enquanto para o *hp2* ocorrem sob condições AT e AI+AT (Figura 08, B).

Para a atividade da peroxidase do ascorbato (APX), não houve diferença entre os genótipos nas condições CONT, AI e AI+AT. Entretanto, na condição AT o wt expressou maior atividade da APX do que os demais genótipos (Figura 08, C). Ao se verificar as diferenças significativas para um mesmo genótipo entre as condições, o *au* apresentou maior atividade da APX na condição AI+AT. Nos mutantes *hp1* e *hp2*, as menores atividades de APX foram observadas no CONT (Figura 08, C). O wt expressou maior atividade da APX sob AT, seguida da condição AI+AT, em relação as demais condições (Figura 08, C). Para a atividade da peroxidase (POX), os genótipos não diferiram estatisticamente na condição CONT. Em condição de AI, o *hp1* apresentou maior atividade da POX. Sob AT, o genótipo wt mostrou maior atividade da POX, enquanto que na condição AI+AT, o genótipo *au* demonstrou maior atividade desta enzima em relação aos demais (Figura 08, D). Verificando-se a diferenças significativas para o mesmo genótipo entre as condições, observamos que o *au* apresentou maior atividade na condição AI+AT, enquanto o wt teve maior atividade da POX na condição de AT (Figura 08, D). Em contrapartida, o genótipo *hp1* na condição AI apresentou maior atividade da POX, em relação as demais condições. Para o *hp2*, diferenças na atividade da POX foi observada entre as condições CONT e AI, sendo maior nesta última (Figura 08, D).

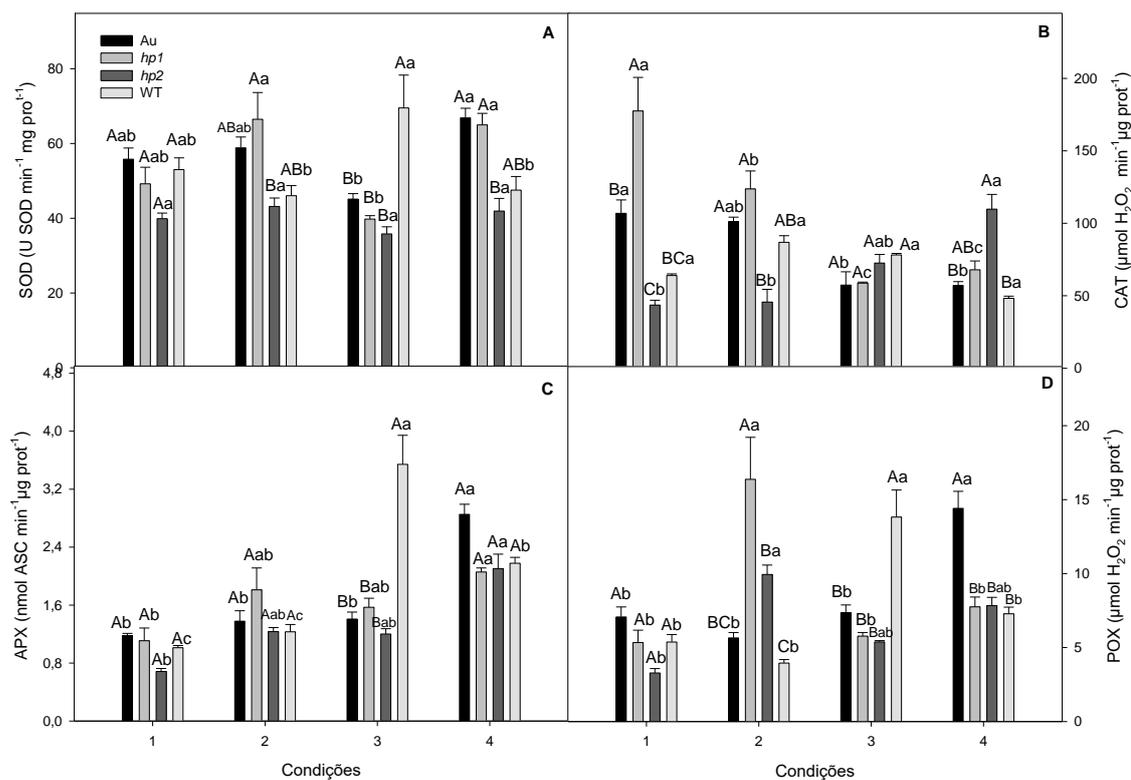


Figura 8. Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD, A), catalase (CAT, B), peroxidase do ascorbato (APX, C) e peroxidase (POX, D) de microtomateiros submetidos durante 7 dias às seguintes condições: 1) Controle (CONT) - $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $25/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 2) Alta irradiância (AI) - $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $25/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 3) Alta temperatura (AT) - $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $40/20 \text{ }^\circ\text{C}$; 4) Combinada (AI+AT) - $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $40/20 \text{ }^\circ\text{C}$. Os dados são média \pm EP (n=4). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de uma mesma condição, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre as condições (Tukey, $p < 0,05$).

4. Discussão

Neste estudo, mostramos que plantas de wt e os mutantes fotomorfogênicos *au*, *hp1* e *hp2* utilizam estratégias diferentes para se aclimatarem aos estresses por alta irradiância e alta temperatura isolados e/ou combinados. De forma isolada, a alta temperatura reduziu as taxas fotossintéticas (A) das plantas de microtomateiros devido seu efeito direto na condutância estomática (*gs*). A redução da taxa fotossintética (A) corrobora com Zhang e Sonnewald (2017), que em seu estudo observaram que a alta temperatura reduziu a eficiência fotossintética. A exposição a AI combinada com a AT, além de diminuir a A e a eficiência quântica do FSII, podem ainda afetar reações bioquímicas (Costa et al. 2015). A fotossíntese é um processo termossensível da planta, que tolera temperaturas entre $30\text{-}35 \text{ }^\circ\text{C}$, mas acima de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ é inibida (Kaushal et al.

2016). Resultados similares de redução da taxa fotossintética também foram observados em plantas de tomate em estágio de floração e pré-floração a 32 °C (Islam, 2011).

O tomateiro possui folha anfiestomáticas e a redução na condutância estomática (g_s) pode estar relacionada a essa característica. O aumento da absorção de CO₂ embora associado à anfistomia, pode beneficiar plantas de crescimento rápido, quando estas são expostas a ambientes com muita luz e com água suficiente (Muir, 2015), mas a regulação simultânea dos estômatos em ambas superfícies das folhas, pode levar à ineficiência das trocas gasosas. Outra desvantagem deste tipo de folha é a diferença da g_s , pois, se as superfícies variam em condições que influenciam o grau de abertura/fechamento estomático, a g_s também será afetada. Mesmo sendo anfiestomáticos, luz e temperatura influenciaram a resposta estomática dos genótipos estudados sob as condições impostas. A diminuição na C_i/C_a reforça o efeito da temperatura na g_s indicando que não houve dano evidente ao ciclo de Calvin Benson e, em consequência, da atividade enzimática da RuBISCO (Castro et al. 2019).

Apesar do efeito da AT na fotossíntese, a atividade do FSII não foi afetada, conforme evidenciado pela estabilidade nos valores de Fv/Fm e na eficiência do transporte de elétrons (ETR). É possível que a ativação de mecanismos aliviadores de estresse, como a maior concentração de pigmentos fotoprotetores (carotenoides *hp1* e *hp2*), sistemas enzimáticos antioxidantes (maior atividade da SOD, APX e POX no wt) e de proteínas (*au*, *hp1* e *hp2*) protegeram o aparato fotossintético contra os danos oxidativos da AT, com observado pela menor concentração de MDA nestas plantas.

O aumento de carotenóides em mutantes *hp* geralmente são acompanhadas por um aumento na concentração de pigmentos fotossintéticos (Levin et al. 2006). Os carotenoides estão localizados nos cloroplastos e podem atuar como um filtro óptico ao converter o excesso da energia de excitação das clorofilas em dissipação térmica, além de seu efeito na eliminação de EROs aliviando os efeitos danosos de estresses na cadeia transportadora de elétrons. Juntamente ao aumento de carotenoides, a maior quantidade de proteínas nos *hps* e *au* sob AT pode estar relacionado com os maiores níveis de pigmentos encontradas nestes mutantes, bem como a maior concentração de proteínas envolvidas nas etapas do processo fotossintético. Pode-se presumir também que, sob estresse térmico, há necessidade de aumentar o acúmulo de proteínas que induzem a termotolerância como a superexpressão de proteínas de choque térmico (HSPs), comumente encontradas em plantas em resposta a AT. As HSPs atuam em vários

processos para proteger as células do estresse térmico através do desdobramento e exportação de proteínas danificadas (Wang et al. 2019).

O calor afeta os fotossistemas (FSI e FSII), inibindo a absorção da energia luminosa e com isso, prejudica a distribuição de energia e o transporte de elétrons (Ahammed et al. 2018). O PSII por ser mais sensível ao estresse térmico pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), afetar a cadeia de transporte de elétrons e a atividade da RuBISCO (Kaushal et al. 2016). Apesar da alta temperatura ter afetado as trocas gasosas, quando avaliamos a razão F_v/F_m , não houve diferença na condição AT quando comparado ao controle. Os valores médios de 0,80 obtidos nas condições, mostram que o aparato fotossintético não sofreu fotoinibição crônica. Quando analisamos as condições AI e a combinada para a taxa de transporte de elétrons (ETR), essas condições não podem ser consideradas estressantes para estes genótipos, pois valores maiores de ETR foram obtidos em relação ao controle.

Normalmente sob estresse combinado de luz e temperatura, os cloroplastos são mais afetados, devido a diminuição do desempenho na cadeia de transportes de elétrons (Kalaji et al. 2018), onde o PSII é sobrecarregado com o excesso de energia, levando à fotoinibição (Murchie e Ruban, 2020). Porém, neste estudo, para os genótipos utilizados, esses efeitos não foram observados. O metabolismo fotossintético depende diretamente de luz e os nossos resultados revelaram que os genótipos de microtomateiros conseguem lidar com uma intensidade maior de luz do que a oferecida na condição controle ($450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Isso foi observado quando sob alta irradiância ($1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), os genótipos mutantes mostraram que esta condição é mais adequada, não sendo uma condição de estresse, mesmo quando imposta de forma combinada com a alta temperatura. Inclusive, reforçam essa afirmação a ausência de alterações significativas em outras variáveis, como o rendimento quântico efetivo do PSII e a dissipação não fotoquímica.

A abertura estomática é significativamente influenciada pelas condições ambientais, tanto a curto como a longo prazo (Driesen et al. 2020). Ao observamos o comportamento dos genótipos sob as condições impostas, verificou-se que o genótipo *hp2* diferiu do wt para as variáveis índice estomático adaxial e densidade estomática adaxial. Auge et al. (2012), estudando os genótipos wt, *fitocromo A (phyA)* e *fril-1*, verificaram que a densidade estomática foi semelhante entre os genótipos. Enquanto Melo et al. 2011, observou maior densidade estomática na epiderme adaxial, para o genótipo *hp1*. Os mutantes *hps*, por serem super-responsivos a eventos mediados por

fitocromo (Kendrick et al. 1994), são influenciados de forma diferente pelas condições quando comparamos com o genótipo wt, o qual não tem mutação. Há um investimento em tecido vascular devido à capacidade de fornecer água simultaneamente para ambas as superfícies das folhas (Buckley et al. 2015).

De forma geral, as condições de AI, AT e a combinação destas, induziram incrementos nas espessuras da epiderme abaxial (Ep. Ab) e adaxial (Ep. Ad), do parênquima paliçádico e esponjoso e do mesofilo, para todos os genótipos de microtomateiros. De fato, variações de luz e temperatura no ambiente proporcionam alterações na morfologia das folhas e a relação entre a arquitetura foliar e a fotossíntese permite que a planta aumente a eficiência fotossintética em condições de estresse, mediante adaptações na sua anatomia foliar (Ren et al. 2019).

Os genótipos de microtomateiros moldaram suas epidermes, de acordo com as condições que lhes foram impostas. Isto demonstra que a plasticidade da espessura da epiderme é responsiva a diferentes condições ambientais (Melo et al. 2011). Os parênquimas foliares possuem uma grande capacidade de resposta aos estímulos luminosos, influenciando na espessura do limbo foliar. Nas condições impostas as espessuras do PP, PE e Me foram observados principalmente nos mutantes *hps* em relação ao *aurea*. A diferença estrutural dos genótipos *hps*, e do *aurea* com deficiência na síntese do cromóforo do fitocromo (Muramoto et al. 2005) são influenciadas pelo requerimento diferenciado de luz, que caracterizam suas mutações (Liu et al. 2012). O formato colunar do PP facilita a penetração da luz na folha, enquanto o PE, em formato esférico juntamente com os espaços intercelulares, dispersa e reflete a luz (Ren et al. 2019). Essa resposta sugere a participação dos fitocromos na determinação da espessura da epiderme foliar (Melo et al. 2011).

A menor quantidade de pigmentos cloroplastídicos foi observado no *aurea*, sendo uma característica do mutante. Da radiação incidente sobre as folhas do *aurea*, 35% é refletida, uma vez que a menor quantidade de clorofila *b* associada ao FSII, diminui a sua capacidade de captar luz (Becker et al. 1992). Os genótipos *hp1* e *hp2* apresentaram maiores concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* sob AT. Esta mesma condição proporcionou uma maior concentração de carotenoides no genótipo *hp2*. Como a variação luminosa está intimamente relacionada às respostas térmicas, essas condições também interferem na quantidade de pigmentos cloroplastídicos encontrados nas plantas, sendo os mesmos sintetizados ou degradados (Rego e Possamai, 2011).

A maior concentração de pigmentos cloroplastídicos nos *hps* está relacionada com o aumento da densidade de seus plastídeos no PP, fornecendo assim um aumento do compartimento para a síntese e armazenamento destes pigmentos (Kim et al. 2013). Em mutantes *hp1*, a concentração dos pigmentos cloroplastídicos são mais elevados, em relação ao wt (Kerckhoffs et al. 1997). Os genótipos *hps* apresentaram maior quantidade de proteínas nas condições estudadas. Este resultado pode estar relacionado a maior quantidade de pigmentos encontradas nestes mutantes, que demanda maior concentração de proteínas envolvidas no processo fotossintético.

Aos serem expostos a AT, os genótipos de microtomateiro aumentaram a quantidade de proteínas. Quando submetidas a altas temperaturas, uma série de genes responsivos ao estresse por calor são induzidos para a ativação de proteínas essenciais para a termotolerância da planta (Ding et al 2020). Como não foi observado fotoinibição do PSII, supõe-se que as EROs, tóxicas as plantas (Qi et al. 2018), não foram o suficiente para promover danos celulares nos microtomateiros sob temperatura e irradiância estudadas. Ou seja, sob calor, há necessidade de aumentar o acúmulo de proteínas de defesa e tolerância. Essas plantas geralmente aumentam a tolerância ao calor pela expressão de genes de proteínas de choque térmico (HSPs), comumente encontradas em plantas sujeitas a altas temperaturas (Wang et al. 2019). Segundo este autor, as proteínas são usadas em vários processos para proteger as células do estresse térmico, como por exemplo dobramento e exportação de proteínas e replicação de DNA.

A quantificação do teor de malonaldeído (MDA) é realizada para determinar os níveis de danos causados às membranas (Li et al. 2016). Na célula, a membrana plasmática é mais sensível ao calor, sendo o principal local de danos (Blum, 1988, Ding et al. 2020). Sob este estresse, sua estrutura se altera de sólido-gel para líquido-cristalina flexível, resultando em aumento da fluidez da membrana (Savchenko, 2002). Em nosso estudo, o maior acúmulo de MDA nos genótipos mutantes *hps* sob irradiância mais alta pode ser um resultado indireto de suas maiores concentrações de pigmentos. A maior absorção de luz, e conseqüentemente, transporte de elétrons entre fotossistemas, são fatores que favorecem o acúmulo de EROs, que por sua vez, aumentam os danos em membranas (Lu et al. 2017). Maior concentração de MDA em tomate sob temperatura elevada (35°C) e irradiância de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, foi observado por Lu et al. (2017).

As enzimas do sistema antioxidante foram ativadas diante das condições impostas. Sabe-se que a SOD é a enzima antioxidante primária na defesa contra danos

causados pelas EROs geradas na etapa fotoquímica (Kaushal, 2016). Os genótipos mutantes sob AT demonstraram maior atividade da SOD em relação ao wt. Diferente do observado neste estudo, em experimento realizado com tomate a 35 °C e irradiância de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a atividade SOD e da POX foram inibidas em comparação com o controle. Plantas de tomate expostas a alta temperatura aumentaram a atividade de CAT e da APX (Lu et al. 2017). Além da CAT, a APX e a POX também atuam na remoção do H_2O_2 (Abedi e Pakniyat, 2010). O sistema antioxidante mostrou-se efetivo frente as condições estudadas, removendo as EROs. As plantas possuem diferentes formas de defesa contra os estresses ambientais, buscando sempre equilíbrio, para evitar fotooxidação, fotobranqueamento e até mesmo a morte celular (Lu et al. 2017).

5. Conclusão

Os microtomateiros fotomorfogênicos expostos a alta irradiância e alta temperatura de forma isolada e combinada apresentaram diversas mudanças nos seus processos fisiológicos, bioquímicos e anatômicos. Apesar da proposição de serem impostas condições estressantes no presente estudo, para estes genótipos, os resultados revelaram que a condição controle ($450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) promoveu maior aclimação das plantas do que a condição combinada de alta irradiância ($1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura (40°C). A temperatura elevada promoveu danos no metabolismo das plantas, mas, a alta irradiância contribuiu para reverter tais danos, quando estas condições foram impostas de forma combinadas.

Estes resultados mostram que as respostas dos genótipos aos estresses impostos são únicas e não representa simplesmente a soma das respostas destes a combinação de fatores. Ainda, quando foram expostos de forma isolada aos fatores de estresse, diferentes genótipos apresentaram diferentes estratégias de aclimação e/ou defesa, procurando superar a condição imposta.

6. Referências

- Abedi, T., & Pakniyat, H. (2010). Antioxidant enzymes changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 46(1), 27-34.
- Alves, F. R. R., De Melo, H. C., Crispim-Filho, A. J., Costa, A. C., & Nascimento, K. J. T., Carvalho, R. F. (2016). Physiological and biochemical responses of photomorphogenic tomato mutants (cv. Micro-Tom) under water withholding. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(6), 155.
- Ahammed, G. J., LI, X., Zhou, J., Zhou, Y. H., & Yu, J. Q. (2016). Role of hormones in plant adaptation to heat stress. In *Plant hormones under challenging environmental factors* (pp. 1-21). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7758-2_1.
- Ahammed, G. J., Xu, W., Liu, A., & Chen, S. (2018). COMT1 silencing aggravates heat stress-induced reduction in photosynthesis by decreasing chlorophyll content, photosystem II activity, and electron transport efficiency in tomato. *Frontiers in plant science*, 9, 998. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00998>.
- Auge, G. A., Rugnone, M. L., Cortés, L. E., González, C. V., Zarlavsky, G., Boccalandro, H. E., & Sánchez, R. A. (2012). Phytochrome A increases tolerance to high evaporative demand. *Physiologia plantarum*, 146(2), 228-235. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01625.x.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44, 276-287.
- Becker, T. W., Foyer, C., & Caboche, M. (1992). Light-regulated expression of the nitrate-reductase and nitrite-reductase genes in tomato and in the phytochrome-deficient aurea mutant of tomato. *Planta*, 188(1), 39-47. doi: 10.1007/BF00198937. PMID: 24178197.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- Castro, J. N., Müller, C., Almeida, G. M., & Costa, A. C. (2019). Physiological tolerance to drought under high temperature in soybean cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 13, 976-987. doi: 10.21475/ajcs.19.13.06. p1767
- Chance, B., & Maehley, A.C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, v.2, p.764-775.
- Chand, J. B., Hewa, G., Hassanli, A., & Myers, B. (2021). Deficit irrigation on tomato production in a greenhouse environment: A review. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering*, 147(2), 04020041. <https://doi.org/10.3390/agriculture10070297>.
- Chen, Y. E., Zhang, C. M., Su, Y. Q., Ma, J., Zhang, Z. W., Yuan, M., & Yuan, S. (2017). Responses of photosystem II and antioxidative systems to high light and high temperature co-stress in wheat. *Environmental and Experimental Botany*, 135, 45-55.

- Chory, J., Chatterjee, M., Cook, R. K., Elich, T., Fankhauser, C., Li, J., & Reed, J. (1996). From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22), 12066-12071.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867.
- Crispim-Filho, A., Costa, A. C., Alves, F. R. R., Batista, P. F., Rodrigues, A. A., Filho, S. V., & Nascimento, K. J. T. (2019). Deficiency in phytochromobilin biosynthesis enhances heat-stress-induced impairments to the photosynthetic apparatus in tomato. *Biologia Plantarum*, 63, 134-143.
- Driesen, E., Van den ende, W., De Proft, M., & Saeys, W. (2020). Influence of environmental factors light, CO₂, temperature, and relative humidity on stomatal opening and development: A review. *Agronomy*, 10(12), 1975. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121975>.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2003). Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119, 355-364. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00223.x>.
- Genty, B., Briantais, JM., & Baker, NR. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990: 87-92.
- Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, 59, 309-314.
- Godoy, F.; Olivos-Hernández, K.; Stange, C.; & Handford, M. (2021). "Estresse Abiótico em Espécies de Culturas: Melhorando a Tolerância pela Aplicação de Metabólitos de *Plantas* " *Plants* 10, no. 2: 186. <https://doi.org/10.3390/plants10020186>.
- Islam, M. T. (2011). Effect of temperature on photosynthesis, yield attributes and yield of aromatic rice genotypes. *International journal of sustainable crop production*, 6(1), 14-16.
- Havir, E. A., & Mchale, N. A. (1987). Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84, 450-455.
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125, 189-198.
- Kalaji, H., M., Račková, L., Paganová, V., Swoczyna, T., Rusinowski, S., & Sitko, K. (2018). Os parâmetros de fluorescência da clorofila-a podem ser usados como bioindicadores para distinguir entre seca e estresse salino na fábrica de *Tilia cordata*? *Botânica ambiental e experimental*, 152, 149-157. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.11.001>.

Karnovsky, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 27: 137-138, 1965.

Kaushal, N., Bhandari, K., Siddique, K. H., & Nayyar, H. (2016). Food crops face rising temperatures: an overview of responses, adaptive mechanisms, and approaches to improve heat tolerance. *Cogent food & agriculture*, 2(1), 1134380. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1134380>.

Kerckhoffs, L. H. J., De Groot, N. A. M. A., Van Tuinen, A., Schreuder, M. E. L., Nagatani, A., Koornneef, M., & Kendrick, R. E. (1997). Physiological characterization of exaggerated-photoresponse mutants of tomato. *Journal of Plant Physiology*, 150(5), 578-587. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(97\)80322-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(97)80322-7).

Kendrick, R.E.; Peters, J.L.; Kerckhoffs, L.H.J.; Van Yuinen, A.; & And Koornneef, M. Photomorphogenic mutants of tomato. *Biochemical Society Symposia*, v. 60, p. 249-256, 1994.

Khan, M. I. R., & Khan, N. A. (Eds.). (2017). *Reactive oxygen species and antioxidant systems in plants: role and regulation under abiotic stress*. Singapore: Springer.

Kim, S., & Dale, B. (2005). Life cycle assessment study of biopolymers (Polyhydroxyalkanoates)-Derived from No-Tilled Corn (11 pp). *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 10(3), 200-210. <https://doi.org/10.1065/lca2004.08.171>.

Kim, C., & Apel, K. (2013). Singlet oxygen-mediated signaling in plants: moving from flu to wild type reveals an increasing complexity. *Photosynthesis Research*, 116(2), 455-464. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9876-4>.

Laisk, A., & Loreto, F. (1996). Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence (ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase specificity factor, dark respiration in the light, excitation distribution between photosystems, alternative electron transport rate, and mesophyll diffusion resistance. *Plant Physiology*, 110, 903-912.

Li, H., Ahammed, G. J., Zhou, G., Xia, X., Zhou, J., Shi, K., & Zhou, Y. (2016). Unraveling main limiting sites of photosynthesis under below-and above-ground heat stress in cucumber and the alleviatory role of luffa rootstock. *Frontiers in plant science*, 7, 746. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00746>.

Li, Y. T., Yang, C., Zhang, Z. S., Zhao, S. J., & Gao, H. Y. (2021). Photosynthetic acclimation strategies in response to intermittent exposure to light intensity in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 181, 104275.

Liu, Y. F., Qi, M. F., & And Li, T. L. (2012). Photosynthesis, photoinhibition, and antioxidant system in tomato leaves stressed by low night temperature and their subsequent recovery. *Plant Sci*. 196, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.005>.

Lu, T., Meng, Z., Zhang, G., Qi, M., Sun, Z., Liu, Y., & Li, T. (2017). Sub-high temperature and high light intensity induced irreversible inhibition on photosynthesis

system of tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.). *Frontiers in plant science*, 8, 365. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00365>.

Magalhães, A. J., Alves, J. M. B., Silva, E. M. D., Nunes, F. T., Barbosa, A. C. B., Santos, A. C. S. D., & Sombra, S. S. (2020). Veranicos no Brasil: Observações e Modelagens (CMIP5). *Revista Brasileira de Meteorologia*, 34, 597-626. <https://doi.org/10.1590/0102-7786344072>.

Melo, H. C. D., Castro, E. M. D., Alves, E., & Perina, F. J. (2011). Anatomia foliar de microtomateiros fitocromo-mutantes e ultra-estrutura de cloroplastos. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 11-18. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000100001>.

Murchie, E. H., & Ruban, A. V. (2020). Dynamic non-photochemical quenching in plants: from molecular mechanism to productivity. *The Plant Journal*, 101(4), 885-896. <https://doi.org/10.1111/tpj.14601>.

Muramoto, T.; Kami, C.; Kataoka, H.; Iwata, N.; Linley, P. J.; Mukougawa, K.; Yokota, A.; & Kohchi, T. (2005). The tomato photomorphogenetic mutant aurea is deficient in phytochromobilin synthase for phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* v. 46, ed. 4, p. 661-665.

Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22, 867-880.

O'brien, T.P., Feder, N., & Mccully, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59: 368-373,1964.

Peters, J. L., Van Tuinen, A., Adamse, P., Kendrick, R. E., & Koornneef, M. (1989). High pigment mutants of tomato exhibit high sensitivity for phytochrome action. *Journal of Plant Physiology*, 134(6), 661-666. [doi.org/10.1016/S0176-1617\(89\)80024-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80024-0).

Prasad, P. V., Bheemanahalli, R., & Jagadish, S. K. (2017). Field crops and the fear of heat stress—opportunities, challenges and future directions. *Field Crops Research*, 200, 114-121.

Ren, T., Weraduwege, S. M., & Sharkey, T. D. (2019). Prospects for enhancing leaf photosynthetic capacity by manipulating mesophyll cell morphology. *Journal of Experimental Botany*, 70(4), 1153-1165. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery448>

Sanchez, S. E., Rugnone, M. L., & Kay, S. A. (2020). Light perception: a matter of time. *Molecular plant*, 13(3), 363-385. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.02.006>.

Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Ramakrishnan, M., Sidhu, G. P. S., BALI, A. S., & Bakshi, P. (2019). Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: a review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-23.

Sharma, R., López-Juez, E., Nagatani, A., & Furuya, M. (1993). Identification of photo-inactive phytochrome A in etiolated seedlings and photo-active phytochrome B in

green leaves of the aurea mutant of tomato. *The Plant Journal*, 4(6), 1035-1042. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04061035.x>.

Shikata, M., & Ezura, H. (2016). Micro-Tom Tomato as an alternative plant model system: Mutant collection and efficient transformation. In *Plant Signal Transduction* (pp. 47-55). Humana Press, New York, NY.

Szymańska, R., Ślesak, I., Orzechowska, A., & Kruk, J. (2017). Physiological and biochemical responses to high light and temperature stress in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 139, 165-177.

Tsukaya, H. (2018). Leaf shape diversity with an emphasis on leaf contour variation, developmental background, and adaptation. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 79, pp. 48-57). Academic Press.

Terashima, I., Hanba, Y. T., Tholen, D., & Niinemets, Ü. (2011). Leaf functional anatomy in relation to photosynthesis. *Plant physiology*, 155(1), 108-116. <https://doi.org/10.1104/pp.110.165472>.

Terry, M. J., & Kendrick, R. E. (1999). Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient aurea and yellow-green-2 mutants of tomato. *Plant Physiology*, 119(1), 143-152. doi: 10.1104/pp.119.1.143.

Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144, 307-313.

Yin, z. H., & Johnson, G. N. (2000). Photosynthetic acclimation of higher plants to growth in fluctuating light environments. *Photosynthesis Research*, 63(1), 97-107.

Zhang, H., & Sonnewald, U. (2017). Differences and commonalities of plant responses to single and combined stresses. *The Plant Journal*, v. 90, n. 5, p. 839-855.

5. CONCLUSÃO GERAL

A descoberta mais interessante deste estudo foi que, embora esperássemos que cada um dos diferentes estresses aplicados individualmente ou de forma combinada aos genótipos lhes causasse um efeito prejudicial, verificamos que cada um dos genótipos conseguiu se aclimatar e responder aos efeitos dos estresses. Isso demonstra que os estresses podem impactar as áreas agrícolas de maneiras que não podemos prever imediatamente, no entanto, uma vez entendido como esses comportamentos ocorrem

podemos gerar informações para prevenir e diminuir tais impactos na produtividade agrícola.

Apesar de serem recentes, estudos como esse pode potencialmente levar a novas e instigantes descobertas, bem como revelar novas estratégias para diminuir o impacto das condições estressantes que ocorrem no ambiente a todo tempo. E com isso, desenvolver estratégias de manejo dos sistemas agrícolas para que estes consigam enfrentar as mudanças climáticas globais e as intervenções humanas.