

FRANKLIN MAGNUM DE OLIVEIRA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA
RESPIRAÇÃO E POTENCIALIZAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE EM FOLHAS DE
TOMATE**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

FRANKLIN MAGNUM DE OLIVEIRA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA
RESPIRAÇÃO E POTENCIALIZAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE EM FOLHAS DE
TOMATE**

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

APROVADA:

Dr. Thomas Christopher Rhys Williams

Prof. Leonardo Lopes Bhering

Prof. Fábio Murilo DaMatta
(Co-orientador)

Prof. Wagner Luiz Araújo
(Co-orientador)

Prof. Adriano Nunes Nesi
(Orientador)

A Assis e Guia, meus avós, por todo carinho e exemplo de vida;

Aos meus pais, Francisco Cosmo (*in memoriam*) e Maria José; por tudo o que representam para mim.

A Flávio, meu irmão, por acreditar em mim,

Com alegria

Dedico

A meus sobrinhos, Letícia e Mateus;

A todos os meus tios e tias, primos e primas,

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos concedidas ao longo do curso e durante a realização deste trabalho.

Aos meus avós (Assis e Guia), por todos os ensinamentos. Vocês são responsáveis por esta conquista.

Aos meus pais, Francisco Cosmo (*in memoriam*) e Maria José, pelas belas lições de vida.

Ao meu Irmão, Flávio, por sempre acreditar no meu potencial.

A todos os meus tios e tias, primos e primas, por todo o apoio e carinho. Obrigado por acreditarem em mim.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade para realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Adriano Nunes Nesi, pela orientação, amizade, apoio e, principalmente, pela dedicação durante todas as horas de que necessitei. A você serei eternamente grato.

Ao meu Co-orientador, Wagner Luiz Araújo, por instigar um pensamento mais crítico durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores, Fábio e Leonardo, pela orientação na elaboração desse trabalho.

A família Belo, por todo carinho e apoio. Serei eternamente grato.

A Talita Oliveira de Araújo, pela paciência, carinho e dedicação durante o desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigado “pequena”!

A minha grande amiga Kelly, pelos ensinamentos científicos. Obrigado.

Aos meus amigos de república: Silvano, Bruno, Henrique, Samuel, Caio, Cassio, Fernando e Evaldo. Obrigado família Viçosa.

Ao meu grande amigo e irmão, “Luizão”, por todo apoio na realização desse trabalho. Essa conquista é nossa.

A minha amiga Jô, por todo apoio.

Aos meus amigos e orientadores, Valdinei e Giovani, por toda confiança. Serei eternamente grato.

A todos os professores e amigos do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos, amizade e paciência.

Aos meus irmãos de trabalho, Danielle e Laíse, pelos bons momentos dentro e fora do laboratório.

Aos meus grandes amigos: Luiz, Nívea, Larise e Cristiano, pela sincera amizade em todos os momentos e, também, por terem transformado Viçosa em um lugar tão bom de se viver.

A todos os colegas da Fisiologia Vegetal.

A todos os brasileiros, por financiarem meus estudos. Muito obrigado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	4
2.1. Material vegetal, condições de cultivo e desenho experimental.....	4
2.2. Parâmetros de fluorescência	6
2.3. Parâmetros de trocas gasosas	6
2.4. Análises bioquímicas.....	7
2.4.1. Processamento e extração das amostras foliares.....	8
2.4.2. Determinação de açúcares	8
2.4.3. Determinação de malato e fumarato	9
2.4.4. Determinação de amido.....	9
2.4.5. Determinação de nitrato.....	10
2.4.6. Determinação dos pigmentos.....	11
2.4.7. Determinação de aminoácidos totais.....	11
2.4.8. Determinação de proteína.....	12
2.5. Mapeamentos das regiões cromossômicas envolvidas com alterações nos parâmetros avaliados e no conteúdo dos metabólitos.....	12
2.6. Análise Estatística.....	13
3. RESULTADOS.....	13
3.1. Identificação de fatores genéticos associados ao crescimento e a produção de biomassa seca.....	13
3.2. Identificação de fatores genéticos associados a fluorescência da clorofila <i>a</i>	17
3.3. Identificação de fatores genéticos relacionados com parâmetros de trocas gasosas.....	17
3.4. Identificação de fatores genéticos relacionados com o metabolismo do carbono.....	21
3.4.1. Conteúdo de açúcares.....	21

3.4.2. Conteúdo de malato.....	21
3.4.3. Conteúdo de amido.....	23
3.5. Identificação de fatores genéticos relacionados com o metabolismo do nitrogênio.....	26
3.5.1. Conteúdo de Nitrato.....	26
3.5.2. Conteúdo de Pigmentos.....	27
3.5.3. Conteúdo de Aminoácidos.....	27
3.5.4 Conteúdo de Proteína.....	27
3.5.5 Metabolismo do Nitrato.....	30
3.6. Mapeamento das regiões cromossômicas envolvidas com alterações nos parâmetros avaliados e no conteúdo dos metabólitos.....	32
3.7. Análise de Correlação.....	32
3.8. Análise de Componentes Principais (ACP).....	34
3.9. Análise de agrupamento.....	36
4. Discussão.....	38
4.1. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	38
4.2. Metabolismo do carbono.....	40
4.3 Metabolismo do nitrogênio.....	40
4.4 Análises de componentes principais (ACP) e análise de agrupamento.....	42
5. CONCLUSÃO.....	43
6. REFERÊNCIAS.....	44
ANEXOS.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

A = taxa de assimilação líquida de carbono

g_s = condutância estomática

PPM = parte por milhão

C_i = concentração interna de CO₂

C_a = concentração ambiente de CO₂

RD = taxa de respiração no escuro

rpm = rotação por minuto

G6PDH = glicose 6-fosfato desidrogenase

ATP = adenosina trifosfato

U = unidade

ΔOD = delta da densidade ótica

NADPH = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato desidrogenase

NAD = nicotinamida adenina dinucleotídeo

P2 = placa 1

P1 = placa 2

TCR = taxa de crescimento relativo

DC = diâmetro do caule

MSH = massa seca da haste

MSR = massa seca da raiz

MSF = massa seca da folha

MST = massa seca total

F₀ = fluorescência mínima no escuro

F_m = fluorescência máxima no escuro

F₀' = fluorescência mínima no escuro

F_m' = fluorescência máxima no escuro

Φ_{FSII} = rendimento quântico do transporte de elétrons

qp = coeficientes de extinção fotoquímica

NPQ = coeficientes de extinção fotoquímica não-fotoquímica

ETR = taxa de transporte de elétrons

MF = massa fresca

IL = linhagem introgridida
NO₃ = nitrato
PROT = proteína
NITR = nitrato
MAL = malato
AA = aminoácidos
N = nitrogênio
GLIC = glicose
FRU = frutose
SAC = sacarose
CLO *a* = clorofila *a*
CLO *b* = clorofila *b*
ACP = análise de componentes principais
UPGMA = método de agrupamento da distância média

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática da população de linhagens introgridas (ILs) de <i>S. pennellii</i> em fundo genético de <i>S. lycopersicum</i> , desenvolvido por Eshed e Zamir (1995).....	2
Figura 2. Representação esquemática do desenho experimental.....	5
Figura 3. Biomassa acumulada nas ILs e no M82.....	14
Figura 4. Biomassa acumulada nas ILs e no M82.....	15
Figura 5. Taxa fotossintética líquida, condutância estomática e eficiência intrínseca do uso da água das ILs e do M82.....	18
Figura 6. Taxa respiratória no escuro das ILs e do M82.....	19
Figura 7. Conteúdo de açúcares nas ILs e no M82 ao meio dia (12 horas).....	21
Figura 8. Conteúdo de malato nas ILs e no M82 ao meio dia (12 horas).....	22
Figura 9. Conteúdo de amido ao longo dia nas ILs e no M82.....	24
Figura 10. Conteúdo de nitrato nas ILs e no M82 ao meio dia (12 horas).....	25
Figura 11. Conteúdo de pigmentos nas ILs e no M82 ao meio dia (12 horas).....	27
Figura 12. Conteúdo de aminoácidos totais nas ILs e no M82 ao meio dia (12 horas).....	28
Figura 13. Conteúdo de proteína nas ILs e no M82 ao meio dia (12 horas).....	28
Figura 14. Eficiência no metabolismo do nitrato (NO ₃) das ILs e do M82.....	30
Figura 15. Mapa de cores para análise de correlação de Person.....	32

Figura 16. Representação gráfica da Análise de Componentes Principais.....	34
Figura 17. Dendograma obtido através da medida de distância de Mahalanobis e método de agrupamento UPGMA.....	36

RESUMO

SILVA, Franklin Magnum de Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2012. **Identificação de fatores genéticos envolvidos no controle da respiração e potencialização da fotossíntese em folhas de tomate.** Orientador: Adriano Nunes Nesi. Co-orientadores: Fábio Murilo DaMatta e Wagner Luiz Araújo

Para identificar regiões genômicas envolvidas na regulação de importantes parâmetros fisiológicos como fotossíntese, respiração e processos relacionados. Sessenta e seis linhagens introgridas de *S. pennellii* em fundo genético de *S. lycopersicum*, foram cultivadas em condições semicontroladas até o estágio vegetativo. Nesse estudo, examinaram-se os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, acúmulo de biomassa e o conteúdo de alguns metabólitos relacionados com o metabolismo do carbono e do nitrogênio. 23 ILs apresentaram taxas fotossintéticas superiores ao parental M82. Essa maior assimilação líquida de CO₂ foi fortemente correlacionada com condutância estomática. Em adição, uma correlação positiva entre a fotossíntese e os parâmetros de fluorescência sugere que maior taxa fotossintética pode estar associada a alterações nos parâmetros de fluorescência. Quanto ao metabolismo do carbono, verificou-se uma alta correlação negativa entre a produção de biomassa e o acúmulo de amido indicando que amido também pode atuar como um importante metabólito integrador na regulação do crescimento vegetativo. Em relação ao metabolismo do nitrogênio, constatou-se que a maior eficiência na incorporação do N inorgânico esteve fortemente relacionada ao acúmulo de amido. Por meio de análises multivariadas, foi possível identificar 21 ILs que diferiram da espécie parental *S. lycopersicum*. Dentre estas, a IL 7-5 diferiu de modo mais relevantes das demais ILs e do M82. Em virtude de estudos anteriores relatarem um alto rendimento de frutos por parte desta IL, esta região cromossômica torna-se promissora na identificação de fatores genéticos envolvidos no controle da respiração e potencialização da fotossíntese em folhas de tomate.

ABSTRACT

SILVA, Franklin Magnum de Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2012. Identification of genetic factors involved in the control of respiration and optimization of photosynthesis in tomato leaf. Adviser: Adriano Nunes Nesi. Co-advisers: Fábio Murilo DaMatta and Wagner Luiz Araújo.

To identify genomic regions involved in the regulation of important physiological parameters such as photosynthesis, respiration and related processes. Sixty-six introgression line (ILs) of *S. pennellii* in genetic background of *S. lycopersicum* were cultivated in partially controlled conditions to the vegetative stage. In this study, we examined the parameters of gas exchange and chlorophyll a flowering, biomass accumulation and content of some metabolites related to the metabolism of carbon and nitrogen. 23 ILs showed photosynthetic rates higher than the parental M82. This increased net CO₂ assimilation was strongly correlated with stomatal conductance. In addition, a positive correlation between photosynthesis and fluorescence parameters suggests that higher photosynthetic rate may be associated with changes in fluorescence parameters. The metabolism of carbon, there was a high negative correlation between biomass production and accumulation of starch indicating that starch can also act as an important metabolite in the regulation of integrating vegetative growth. In relation to nitrogen metabolism, it was found that the more efficient incorporation of inorganic N was strongly related to the accumulation of starch. Through multivariate analyzes, we identified 21 ILs that differ from the parental species *S. lycopersicum*. Among these, IL 7-5 differed in more relevant to other ILs and M82. Because previous studies have reported a high yield of fruit from this IL, this chromosomal region becomes promising in identifying genetic factors involved in the control of the potentiation of respiration and photosynthesis in tomato leaves.

1. Introdução

O tomateiro cultivado, *Solanum lycopersicum* L., pertencente à família Solanaceae, originou-se na região andina. Acredita-se que a região de Vera Cruz – Pueblano México seja o sítio de domesticação e fonte das introduções mais primitivas do tomateiro atualmente cultivado por todo o mundo (Rick, 1978; Esquinas-Alcazar, 1981).

As variedades de tomate modernas descendem de uma pequena fração da diversidade de tomate levada para a Europa durante a exploração do Novo Mundo e posteriormente reintroduzida nas áreas produtoras das Américas. Assim, as linhas de tomate atualmente cultivadas incorporam apenas uma fração da diversidade genética dessa espécie (Rick, 1978).

O processo de domesticação de espécies cultivadas, como o tomate, levou a um aumento significativo da produtividade, entretanto este aumento na produtividade, após várias gerações, teve como custo a redução na diversidade genética (Zamir, 2001). Registre-se, assim, que a diversidade genética natural fornece um recurso poderoso e complementar para analisar redes metabólicas complexas (Hansen et al., 2008; Stitt et al., 2010) além de representar uma importante fonte de diversidade para o melhoramento vegetal clássico. Neste contexto, a coleção de linhagens introgridas (ILs) desenvolvida por Zamir e colaboradores, é um exemplo de como variabilidade genética pode ser reintroduzida em uma cultivar de tomate melhorado para a produtividade. Essa população é constituída por 76 linhagens introgridas nas quais segmentos definidos do genoma de *Solanum pennellii* (LA716) substituem regiões homólogas em um fundo genético de *S. lycopersicum* (Figura 1). Em conjunto, essas linhagens representam uma cobertura completa do genoma de *S. lycopersicum* e os fragmentos substituídos são densamente delimitados por marcadores moleculares (<http://www.sng.cornell.edu/maps/pe.pl>), separando o genoma em 107 *bins* (Eshed e Zamir, 1995).

Essa população de linhagens introgridas tem sido amplamente empregada no estudo de características quantitativas, como peso do fruto, teor de sólidos solúveis, rendimento (Eshed e Zamir, 1995), bem como na determinação dos conteúdos de carotenóides (Liu et al., 2003). Estes

estudos permitiram a identificação e a clonagem de genes relacionados ao crescimento determinado de plantas e a identificação de mutações nas cores dos frutos (Pnueli et al., 1998; Ronen et al., 1999; Isaacson et al., 2002). Em adição, o emprego dessa população de ILs permitiu a identificação de QTLs relacionados com os teores de açúcares em frutos (Fridman et al., 2000) e ao peso do fruto (Frary et al., 2000). Verifica-se então que, em função da sua estrutura genômica, as ILs se apresentam como uma ferramenta poderosa para melhor compreender os determinantes genéticos envolvidos nos caracteres quantitativos, uma vez que todas as diferenças fenotípicas entre as ILs e *S. lycopersicum* são explicadas apenas pelo fragmento de *Solanum pennellii* introgridido.

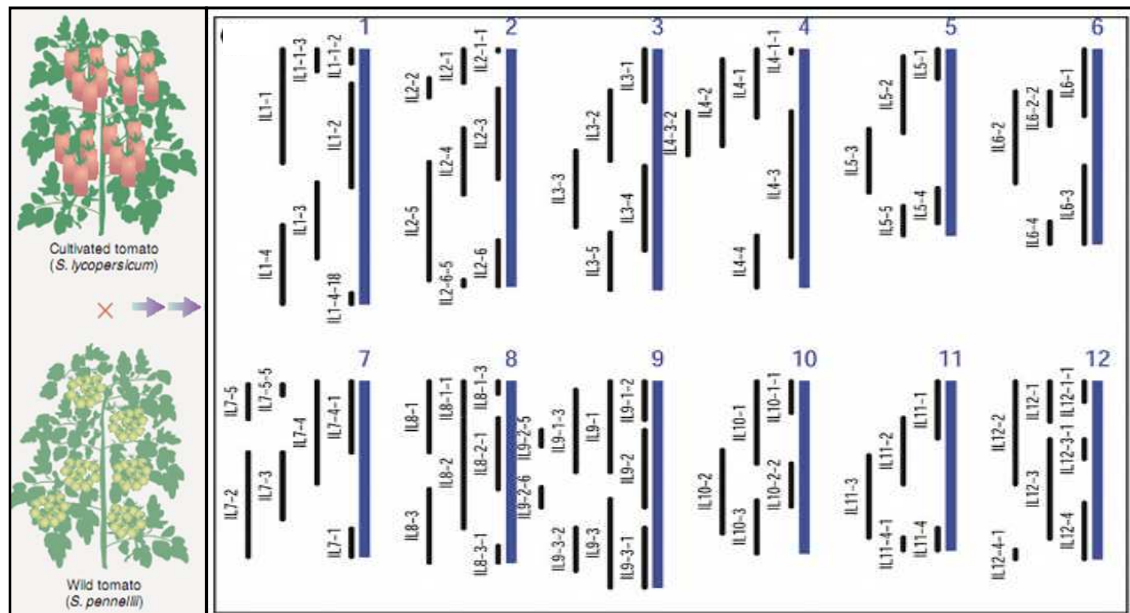


Figura 1. Representação esquemática da população de linhagens introgrididas (ILs) de *S. pennellii* em fundo genético de *S. lycopersicum*, desenvolvido por Eshed e Zamir (1995). As linhas pretas representam o fragmento de *S. pennellii* contido em cada linhagem. Junto ao fragmento se indica o nome das linhagens, totalizando 76 ILs. Fonte: Lippman et al.(2007)

Recentemente, abordagens envolvendo populações de ILs têm sido utilizadas na identificação de fatores genéticos relacionados com parâmetros fisiológicos (Price et al., 1997; Frei et al., 2008; Khowaja e Price, 2008; Gu et al., 2012). Avaliando parâmetros fotossintéticos de uma população composta por 94 ILs, obtidas do cruzamento do arroz de várzea com o arroz de sequeiro, em diferentes fases de desenvolvimento e diferentes condições de cultivo, Gu e colaboradores identificaram um segmento do cromossomo 9 envolvido na regulação das taxas fotossintéticas, condutância estomática,

taxa de transporte de elétrons, rendimento quântico do fotossistema II e F'_v/F'_m . Assim, estes resultados demonstraram que o uso combinado de ferramentas fisiológicas e genéticas pode auxiliar programas de melhoramento e biotecnológicos que visam a obtenção de genótipos com capacidade fotossintética elevada em condições de estresses abióticos. Ademais, abordagens como estas permitem a identificação de genes que possam ser utilizados em programas de melhoramento para aumentar simultaneamente a tolerância a seca e a fotossíntese (Gu et al., 2012).

No caso particular do tomate, verifica-se que inúmeras abordagens utilizando populações de ILs têm sido empregadas na tentativa de melhorar a composição metabólica de plantas para atender às exigências de interesse industrial e nutricional em frutos de tomate (Fridman et al., 2000; Frary et al., 2000; Liu et al., 2003; Schauer et al., 2006). Entretanto, até o momento poucos estudos tem buscado identificar QTLs para características associadas a processos metabólicos como respiração e fotossíntese (Xu et al., 2008; Teng et al., 2004; Adachi et al., 2011). Provavelmente, isto se deve às dificuldades associadas a análise desses parâmetros em condições de campo e a influência ambiental sobre esses parâmetros durante o crescimento (Flood et al., 2011). Apesar disso, em função da importância da fotossíntese e respiração, bem como da interação entre os dois processos (Nunes-Nesi et al., 2011), na determinação do crescimento e desenvolvimento vegetal (Pnueli et al., 1998), a identificação de QTLs envolvidos na regulação de tais processos pode permitir a identificação de genes relacionados com estas vias metabólicas. Essa estratégia é suportada por recentes evidências que demonstram existir grande variação genética nas taxas fotossintéticas entre os germoplasmas disponíveis (Flood et al., 2011) e que aumentos recentes na produção final de cereais são diretamente associados com aumentos na fotossíntese (Fischer e Edmeades, 2010).

Diante do exposto, o presente trabalho busca através da utilização de uma população de ILs em tomate (*Solanum lycopersicum*), previamente desenvolvidas (Eshed e Zamir, 1995), identificar regiões genômicas envolvidas na regulação de importantes parâmetros fisiológicos como fotossíntese, respiração e processos relacionados, que possam

eventualmente ser utilizados nos programas de melhoramento ou em estudos genéticos orientados a fim de se obter uma maior compreensão dos mecanismos que envolvem os processos fisiológicos e bioquímicos vinculados ao desempenho produtivo da planta. De maneira complementar, outro aspecto relevante desse estudo seria a identificação de novos mecanismos de regulação do metabolismo mitocondrial que resultem em alterações na capacidade fotossintética, uma vez que estudos recentes que objetivaram a determinação do papel das enzimas integrantes do ciclo dos ácidos tricarbóxicos em tomate revelaram que esse ciclo também participa da regulação da abertura estomática (Nunes-Nesi et al., 2007; Araújo et al., 2011; Nunes-Nesi et al., 2011), da assimilação/metabolismo do nitrogênio (Sienkiewicz-Porzucek et al., 2008; Sienkiewicz-Porzucek et al., 2010; Sulpice et al., 2010; Nunes-Nesi et al., 2010) e de níveis de poder redutor em folhas iluminadas de tomate (Krömer, 1995; Scheibe, 2004; Scheibe et al., 2005). No presente estudo, analisando em conjunto parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, acúmulo de biomassa e o conteúdo de alguns metabólitos relacionados com o metabolismo do carbono e do nitrogênio, foi possível identificar 21 linhagens introgridas que diferiram da espécie parental *S. lycopersicum*.

2. Material & Métodos

2.1. Material vegetal, condições de cultivo e desenho experimental

As sementes de cada IL mais o controle M82 foram primeiramente desinfestadas e germinadas em um meio MS contendo sais e vitaminas conforme Murashige e Skoog (1962), suplementado com 2% de sacarose (*p/v*) e cultivadas em uma sala de crescimento ($250 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 22°C), 16-h-luz/8-h-escuro, exatamente como descrito em Carrari et al. (2003) e Nunes-Nesi et al. (2005 e 2007). Em virtude da baixa germinação, apenas 66 ILs foram avaliadas no presente estudo, das 76 ILs desenvolvidas por Eshed e Zamir (1995). Uma vez enraizadas em meio MS, as plântulas foram transferidas para vasos de plástico de 1,16 L (11 cm de altura e 14,5 cm de diâmetro na parte superior), contendo substrato comercial Plantmax[®],

suplementado com 15 g de 4-14-8 (NPK), por vaso. Após a transferência para vasos, as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação sob condições semicontroladas sendo irrigadas diariamente a fim de manter-se a umidade do substrato nos vasos próxima à capacidade de campo. Nestas condições as plantas foram mantidas por um período de quatro semanas até a determinação dos parâmetros de fluorescência e trocas gasosas e coleta de material vegetal para as análises bioquímicas. O experimento foi montado e analisado sob delineamento em blocos casualizados, com seis repetições. Sendo considerada como unidade parcela experimental uma planta por vaso. Devido ao grande número de ILs analisadas o experimento foi dividido em três etapas. Na primeira e segunda etapa foram analisadas 44 ILs juntamente com o cultivar M82 utilizado como genótipo controle, distribuídas em três blocos cada. Enquanto na terceira etapa, foram analisadas as demais 22 ILs distribuídas e seis blocos de modo a complementar as 66 ILs avaliadas no presente estudo (Figura 2).

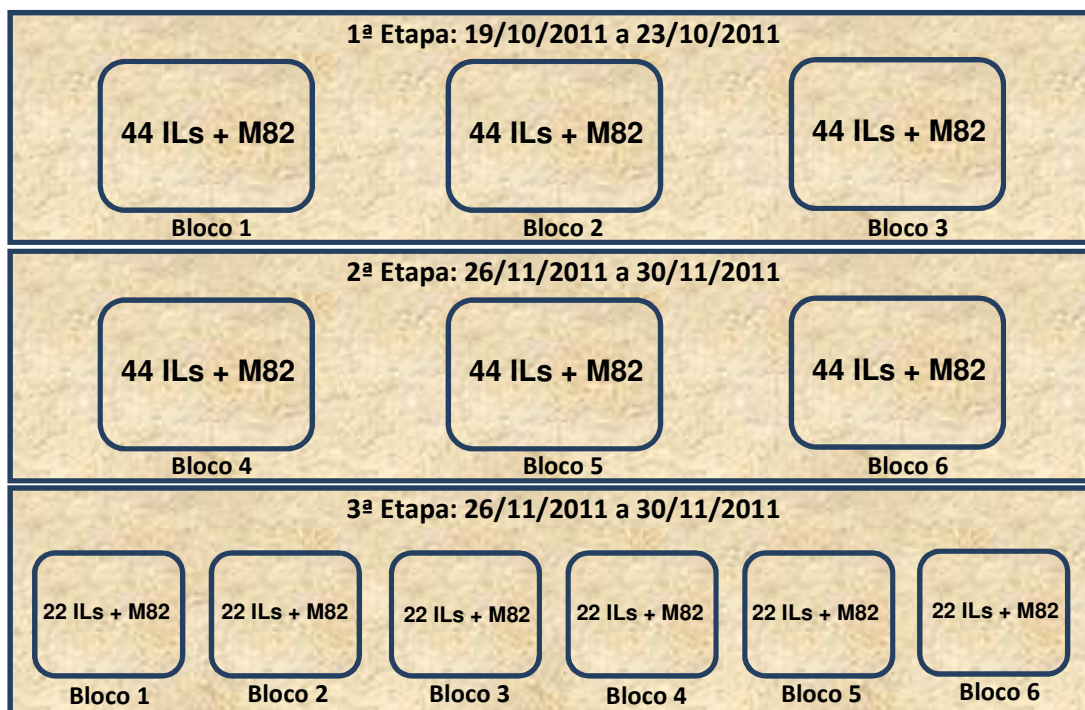


Figura 2. Representação esquemática do desenho experimental.

Para cada etapa são apresentadas as respectivas datas nas quais foram conduzidos os experimentos, o número de ILs avaliadas bem como a disposição das mesmas sob delineamento em blocos casualizados.

No decorrer do experimento foram realizadas avaliações diárias da altura da planta e diâmetro do caule. Ao final das avaliações fisiológicas descritas abaixo, as plantas foram cortadas na altura do colo, separando-se as raízes da parte aérea. A parte aérea por sua vez foi separada em haste e folhas. As raízes foram lavadas sob água corrente, para eliminação do substrato, e colocadas em sacos de papel do tipo Kraft, devidamente identificados e levados à estufa de ventilação forçada a 70°C até obterem o peso seco constante para determinação da biomassa seca. Com os dados de crescimento foram determinadas as taxas de crescimento relativo (TCR); (Hunt, 1982) e com a massa seca dos órgãos foram determinadas a alocação de matéria seca para os diversos órgãos constituintes da planta para cada IL.

2.2. Parâmetros de fluorescência

A fluorescência da clorofila a foi avaliada utilizando-se um fluorômetro com amplitude de pulso modulado (FMS2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido). Após serem adaptados ao escuro, por 1 hora, o segundo folíolo da terceira folha completamente expandida foi inicialmente exposta a um fraco pulso de luz vermelho-distante ($1-2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para a determinação da fluorescência mínima de folhas adaptadas à escuridão (F_0). Em seguida, a um pulso de luz saturante, com irradiância de $6000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e duração de 1 s, para estimar-se a fluorescência máxima da clorofila nas folhas adaptadas ao escuro (F_m). Quanto a fluorescência mínima de folhas adaptadas à luz (F_0') e a fluorescência máxima da clorofila (F_m'), estas foram determinadas, utilizando o mesmo equipamento, concomitantemente a coleta dos dados de trocas gasosas. Procedeu-se, ainda, à estimação da eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m), do rendimento quântico do transporte de elétrons (Φ_{FSII}), dos coeficientes de extinção fotoquímica (q_p) e não-fotoquímica (NPQ) e da taxa de transporte de elétrons (ETR), conforme descrito em DaMatta et al. (2002) e em Lima et al. (2002).

2.3. Parâmetros de trocas gasosas

Por meio de um analisador de gases a infravermelho, dotado de uma câmara que possui uma área amostral de 6 cm^2 (Li 6400R, Li-Cor, Lincoln,

EUA), a taxa de assimilação líquida do carbono (A), a condutância estomática (g_s), e a razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) foram aferidas. As medições foram feitas no segundo folíolo da terceira folha completamente expandida em plantas com quatro semanas de idade, no período compreendido entre 8 e 13h, de acordo com experimentos prévios onde a variação diária da fotossíntese foi determinada no genótipo M82. As medidas foram tomadas sob condições padrão de 400 PPM de CO_2 , e irradiância em uma intensidade luminosa de $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com 10% de luz azul. A temperatura n\u00e3o foi controlada, entretanto a mesma manteve-se constante entre $25 \pm 27 \text{ }^\circ\text{C}$. De modo a ter um maior controle das varia\u00e7\u00f5es clim\u00e1ticas e das fisiol\u00f3gicas ao longo das avalia\u00e7\u00f5es, os dados de trocas gasosas no M82 foram repetidos a cada 30 min, totalizando cerca de nove leituras ao t\u00e9rmino de cada bloco da primeira e segunda etapa e cerca de quatro leituras ao t\u00e9rmino de cada bloco da terceira etapa. Al\u00e9m das medi\u00e7\u00f5es de A , g_s e C_i/C_a , dados obtidos como descrito anteriormente, tamb\u00e9m foram quantificadas as taxas de respira\u00e7\u00e3o no escuro (RD), utilizando o analisador de gases a infravermelho mencionado, no per\u00edodo de 21h a 0h, no mesmo fol\u00edolo utilizado para determinar a assimila\u00e7\u00e3o líquida do carbono.

2.4. An\u00e1lises bioqu\u00edmicas

Para as an\u00e1lises bioqu\u00edmicas, tubos de 1,5 ml foram previamente pesados e identificados. Ap\u00f3s a pesagem dos tubos, dois discos foliares do segundo fol\u00edolo da terceira folha totalmente expandida foram coletados em tr\u00eas hor\u00e1rios distintos do dia, in\u00edcio da manh\u00e3 (6h), meio dia (12h) e final da tarde (18h). Ap\u00f3s a coleta, todo o material foi imediatamente congelado em nitrog\u00eanio l\u00edquido e, em seguida, armazenado a -80°C , at\u00e9 a realiza\u00e7\u00e3o das an\u00e1lises. Uma vez coletadas, as amostras foram pesadas em balan\u00e7a de precis\u00e3o, para obter-se o valor do peso total constitu\u00eddo pelo tubo e discos foliares. De posse do peso dos tubos, previamente obtidos, calculou-se o peso fresco de cada amostra de discos foliares.

2.4.1. Processamento e extração das amostras foliares

Às amostras contidas nos tubos de 1,5ml, cerca de 30mg de tecido, foram pulverizadas em nitrogênio e posteriormente os metabólitos foram extraídos em etanol conforme Gibon et al. (2004) e Nunes-Nesi et al. (2005 e 2007). A cada tubo foram adicionadas 250 µl de etanol 98%, seguido de uma homogeneização, incubação e agitação por 20 min a 80°C. Logo após as amostras foram centrifugadas por 5min a 13.000 rpm a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi para um tubo devidamente identificado e o precipitado submetido a duas novas extrações consecutivas com 150 µl e 250 µl de etanol 80% e 50%, respectivamente. Os três sobrenadantes foram reunidos para posterior quantificação dos metabólitos e o precipitado para a quantificação de amido e proteína total insolúvel conforme metodologia descrita por Gibon et al. (2004) e detalhada abaixo.

2.4.2. Determinação de Açúcares

Os teores de glicose, frutose e sacarose foram determinados na fração solúvel em etanol segundo Fernie et al. (2001). Para uma placa de 96 poços foi preparada uma mistura contendo 15,5 ml de tampão (HEPES/KOH 1M, MgCl₂ 30 mM pH 7,0) 0,1X, 480 µl de ATP [60mg/ml], 480 µl de NADP [36mg/ml] e 80 µl de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) [5 mg/ml]. Uma vez preparada a mistura, 160 µl da mesma foi adicionada a cada poço de uma microplaca acrescidos de mais 25 µl do extrato etanólico e 25 µl de etanol 80%. Utilizando um leitor de microplacas, modelo OptiMax Tunable Microplate Reader, foram feitas leituras de absorbâncias das respectivas amostras a 340nm em intervalos de um minuto. Uma vez estabilizada a densidade ótica (OD) foram adicionadas sucessivamente 5µl de hexoquinase [1,5U/poço], 5µl de fosfoglicose isomerase [1,5U/poço] e 5 µl de invertase [5U/poço]. Para calcular a concentração dos respectivos açúcares, foi utilizada a equação [1].

$$\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD} / (2,85 * 6,22) \quad [1]$$

2.4.3. Determinação de malato e fumarato

Em uma microplaca foram adicionados em cada poço 25 µl de tampão (Tricine/KOH 0,4M), 10 µl de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio 10 Mm), 5 µl de NAD⁺ [60 mM], 2 µl de fenazinaetosulfato [20 mM], 10 µl de Triton X100 10%(v/v), 22 µl de H₂O e 20 µl do extrato etanólico. Em seguida, através de um leitor de elisa, mencionado anteriormente, foram lidas as absorvâncias das respectivas amostras a 570 nm em intervalos de um minuto. Uma vez estabilizado a densidade ótica (OD) foram adicionadas sucessivamente 3 µl de malato desidrogenase [1000 U/ml em tampão] e 3 µl de fumarase [100U/ml em tampão]. Para calcular a concentração de malato e fumarato nas amostras uma curva utilizando ácido Málico e ácido fumárico foi construída com as seguintes concentrações: 0,1,5, 3,0, 4,5, 6,0,e 8,0 nmol. Uma vez calculado as concentrações de malato e fumarato nos poços, os valores foram normalizados pelo peso fresco do tecido vegetal.

2.4.4. Determinação de Amido

Aos tubos contendo o precipitado suspenso em NaOH utilizado na determinação de proteína, foram adicionados 70 µl de ácido acético 1M para a neutralização do extrato. Os tubos foram então agitados com auxílio de um agitador de tubos e em seguida 40 µl da suspensão foram coletadas e dispostas em microplacas. Para degradação do amido, foi preparada uma mistura contendo 100 µl de amiloglicosidase (0,14U/µl), 1 µl de α-amilase (0,01U/µl) e 4899 µl de acetato de sódio 0,5M pH 4,9, a qual foi adicionado 60 µl aos 40 µl da suspensão previamente adicionados nos poços. Em seguida, a placa foi selada com uma fita de alumínio resistente a alta temperatura e incubada por 1 hora a 55 °C. Passada esta etapa, as placas foram centrifugadas por 10 segundos a 10.000 rpm e em seguida 40 µl da suspensão foi transferida para uma nova placa onde foram adicionadas a cada poço 160 µl de uma mistura contendo 15,5 ml de tampão HEPES/KOH 1M, MgCl₂ 30 mM pH 7,0, 480 µl de ATP [60mg/ml], 480 µl de NADP [36mg/ml] e 80 µl de glicose-6-fosfato desidrogenase (0,7U/µl). Por meio do um leitor de microplacas, mencionado anteriormente, foram lidas as

absorbâncias das respectivas amostras a 340 nm em intervalos de um minuto. Uma vez estabilizado o OD foram adicionados 2µl de hexoquinase [2U/poço]. Para calcular a concentração de glicose e por sua vez o conteúdo de amido, foi utilizada a equação [2] e os valores normalizados pelo peso fresco dos discos foliares.

$$\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD}/(2,85*6,22) [2]$$

2.4.5. Determinação de Nitrato

O conteúdo de nitrato foi realizado seguido o protocolo descrito por Fritz et al.(2006). Em uma microplaca (P1) foram adicionados em cada poço 10 µl de tampão, constituído de tampão fosfato 1M, pH 7,5 e 0,5 µl de NADPH na concentração de 50 mM preparado em NaOH 5 mM, 1µl de nitrato redutase [0,005U/Poço preparada em tampão fosfato 0,1M], 83,5 µl de H₂O e 5 µl do extrato etanólico. Na presença da nitrato redutase, o nitrato é reduzido a nitrito. De modo a descontar o conteúdo de nitrito já presente nas amostras e quantificar apenas o conteúdo de nitrito oriundo da redução do nitrato a nitrito, outra microplaca (P2) foi montada, desta vez substituindo o 1µl de nitrato redutase por H₂O. Uma vez montada as duas placas, estas foram incubadas no escuro por 30 min a 25 °C. Passado este tempo, foram adicionados a cada poço das respectivas placas 15 µl de fenazinametossulfato 0,25mM e em seguida incubada novamente por mais 20 min a 25 °C, onde foram adicionados em seguida 60 µl de sulfanilamida 1% (p/v em ácido fosfórico 3M) e 60 µl de Dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,02% p/v. Por fim, ambas as placas foram incubadas por mais 10 min a 25 °C e em seguida lidas em um leitor de microplacas a 540 nm. Para determinar apenas o conteúdo de nitrato presente nas amostras, o valor absorbância de cada amostra da microplaca P1 foi subtraído do valor da absorbância da microplaca P2.

Para a determinação do conteúdo total de nitrato nas amostras, foi realizada uma curva de calibração de nitrato utilizando KNO₃ nas seguintes concentrações: 0, 0,4, 0,8 e 1,6 µM. Uma vez calculado as concentrações de nitrato nos poços, os valores foram normalizados pelo peso fresco da amostra.

2.4.6. Determinação dos Pigmentos

Para quantificação dos pigmentos em tecido foliar foi utilizado o protocolo descrito por Porra et al. (1989). Em uma microplaca de 96 poços foram homogeneizados 25µl do extrato etanólico, 25µl de etanol 80% e 120µl de etanol 98%. Por meio de um leitor de microplacas, anteriormente mencionado, foram feitas leituras de absorbâncias de cada amostra a 645 e 665nm. Uma vez obtidas as absorbâncias foram calculadas as concentrações de clorofilas a e b pelas equações [3] e [4] e o conteúdo total normalizado pelo peso fresco da amostra.

$$\text{Clorofila } a = 5,21 * \text{Abs}_{665} - 2,07 * \text{Abs}_{645} \text{ [3]}$$

$$\text{Clorofila } b = 9,29 * \text{Abs}_{645} - 2,74 * \text{Abs}_{665} \text{ [4]}$$

2.4.7. Determinação de aminoácidos totais

Para quantificação do conteúdo de aminoácidos totais foi utilizado o protocolo descrito por Gibon et al. (2004). Em uma microplaca foram adicionados em cada poço 50 µl de tampão citrato 1M pH 5,2 com ácido ascórbico 0,2%, 25 µl do extrato etanólico, 25 µl de etanol 70% e 100 µl de solução de ninhidrina 1% (p/v em etanol 70%). Em seguida, a placa foi selada com uma fita de alumínio, resistente a alta temperatura (3M[®] Modelo 425 HD) e incubada por 20 min a 95 °C. Após a incubação as placas foram centrifugadas por 10 segundos a 10.000 rpm. Posteriormente as amostras foram transferidas para uma nova microplaca e foram feitas leituras em um leitor de microplacas a 570 nm.

Para a determinação do conteúdo total de aminoácidos nas amostras, foi realizada uma curva padrão de Leucina nas seguintes concentrações: 0, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1 e 0,25 mM. Uma vez estimadas as concentrações de aminoácidos no poço, os valores foram normalizados pelo peso fresco da amostra.

2.4.8. Determinação de Proteína

Para quantificação do conteúdo de proteína total foi utilizado o protocolo descrito por Gibon et al. (2004). Aos tubos contendo o precipitado, correspondente a fração insolúvel em etanol, das respectivas amostras foram adicionados 400 µl de NaOH 0,1M. Após ressuspender o precipitado, as amostras foram incubadas por 1 hora a 95 °C sob agitação de 500 rpm. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos e em seguida 10 µl do sobrenadante foi coletado e diluído 10x em NaOH 0,1 M. Após esse procedimento, em uma microplaca de 96 poços foram colocados em cada poço 200 µl de solução do corante azul brilhante de Coomassie (reagente de Bradford) e 3 µl da amostra diluída. Em um leitor de microplacas as absorbâncias foram determinadas a um comprimento de onda de 595 nm. Quanto ao conteúdo de proteína de cada amostra, esta foi determinada através de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) composta com as seguintes concentrações: 0, 0,24, 0,48, 0,72, 0,96, 1,2, 1,8 e 2,4 µg de proteína e o conteúdo de proteína normalizado pelo peso fresco da amostra.

2.5. Mapeamentos das regiões cromossômicas envolvidas com alterações nos parâmetros avaliados e no conteúdo dos metabólitos

A partir do Sol Genomics Network Map 2000 (www.sgn.cornell.edu), foi delimitada as regiões cromossômicas (*bins*), e seus respectivos marcadores e anotações genômicas, dos fragmentos de *S. pennellii* que promoveram um aumento ou um decréscimo nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, acúmulo de biomassa e o conteúdo de alguns metabólitos relacionados com o metabolismo do carbono e do nitrogênio para as linhagens Introgredidas (Anexo 4) que diferiram do parental M82.

2.6. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Genes (Cruz, 2007). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). Além do teste de médias, procedeu-se a análise de correlação de Person por meio do programa Genes e o software MeV (Saeed et al., 2006) bem como, análises multivariadas como: análise de componentes principais (ACP) e análise de agrupamento (SAEG-UFV, 1993).

3. Resultados

3.1. Identificação de fatores genéticos associados ao crescimento e a produção de biomassa seca

Após a introdução de cada uma das 66 ILs em cultivo *in vitro*, cada IL foi propagada a partir do mesmo explante para a obtenção de uma quantidade suficiente de plantas para a realização dos experimentos. Partiu-se de uma quantidade mínima de 8 plantas com um sistema radicular bem desenvolvido. Após duas semanas de aclimatização em laboratório, 6 plantas de cada genótipo foram transferidas para casa de vegetação. Ao longo de três semanas de cultivo, foram realizadas medições de altura e diâmetro do caule diariamente. Após uma análise detalhada dos dados verificou-se que as 66 ILs testadas não diferiram estatisticamente do controle M82, quanto a taxa de crescimento relativa calculada a partir da altura de planta (TCR) e a taxa de crescimento relativo com base no diâmetro de caule (DC) (Anexo 1).

Adicionalmente, ao final das quatro semanas de cultivo, período no qual as avaliações fisiológicas descritas nas seções abaixo terem sido realizadas, uma avaliação da produção de massa seca em diferentes órgãos foi executada. Observou-se que 9 ILs apresentaram um maior acúmulo de biomassa seca na raiz e 11 ILs apresentaram um menor conteúdo de massa acumulada neste órgão, quando comparadas com o controle (Figura 3A). Em relação ao acúmulo de biomassa na haste e nas folhas, 11 e 17 ILs

apresentaram maiores acúmulos de biomassa nas hastes e nas folhas respectivamente em relação ao genótipo controle (Figura 3B e 3C). Quando calculada a razão entre matéria seca acumulada na parte aérea e matéria seca acumulada no sistema radicular, verificou-se que 6 genótipos obtiveram maiores razões quando comparadas ao controle M82(Figura 4A). Em relação à massa seca total, 14 ILs apresentaram um maior conteúdo de biomassa seca acumulada quando se somou a biomassa seca de todos os órgãos, enquanto que apenas uma IL registrou um menor acúmulo de biomassa total em relação ao controle M82. (Figura 4B)

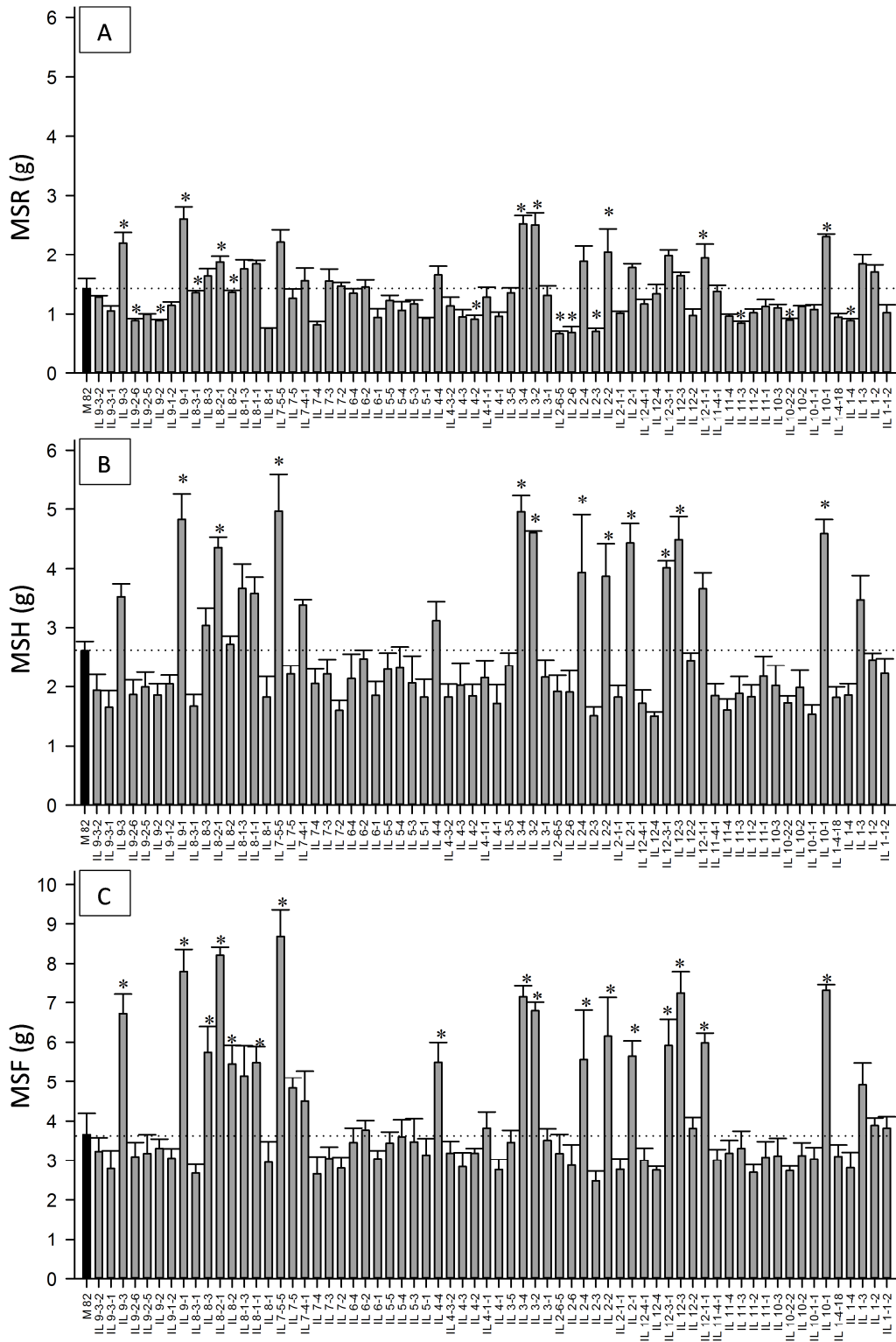


Figura 3. Biomassa acumulada nas ILs e no M82.

As barras indicam a média obtida de cinco réplicas biológicas. Os dados correspondem a plantas com quatro semanas de idade. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle M82 pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). As barras indicam os valores médios e o erro padrão. Barra preta corresponde ao controle M82 e linha tracejada, média obtida pelo M82. Abreviaturas: MSR, massa seca da raiz (A); MSH, massa seca da haste (B) e MSF, massa seca da folha (C).

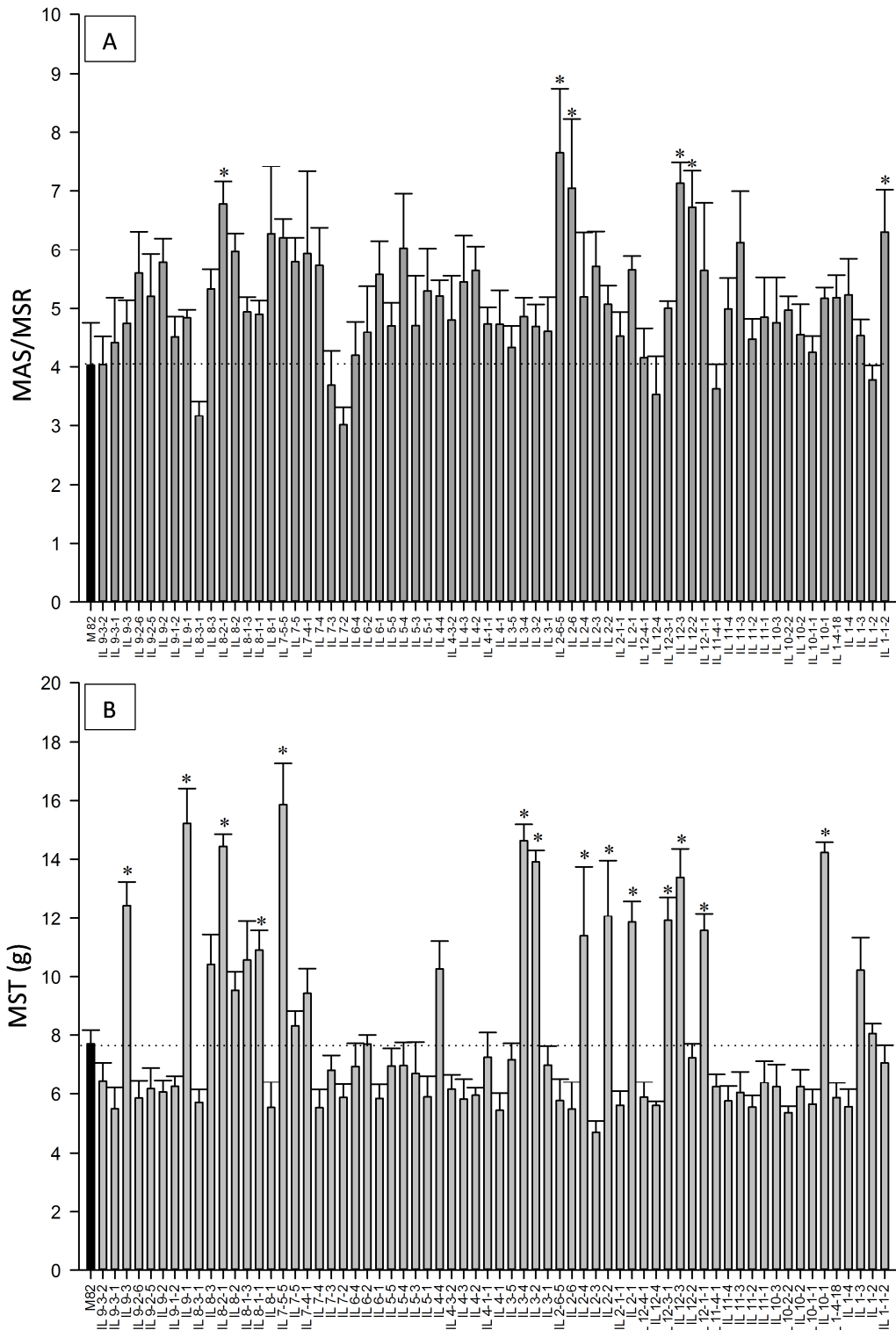


Figura 4. Biomassa acumulada nas ILs e no M82.

As barras indicam a média obtida de cinco réplicas biológicas. Os dados correspondem a plantas com quatro semanas de idade. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle M82 pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). As barras indicam os valores médios e o erro padrão. Barra preta corresponde ao controle M82 e linha tracejada, média obtida pelo M82. Abreviaturas: MSA, massa seca da parte aérea (A); MSR, massa seca da raiz (A) e MST, massa seca total (B).

3.2. Identificações de fatores genéticos associados a fluorescência da clorofila a

Entre os parâmetros relacionados com a fotossíntese, a fluorescência da clorofila *a* são constantemente utilizados para verificar a eficiência fotossintética de diferentes genótipos (Gu et al., 2010; Araus et al., 2000). Assim, para uma maior entendimento dos parâmetros relacionados a fotossíntese que podem estar relacionados com maior ou menor eficiência fotossintética dos genótipos, decidiu-se avaliar a emissão de fluorescência da clorofila *a*. Com este propósito, a estimativa dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* no escuro (F_0 e F_m) foram efetuadas durante a noite, enquanto que a estimativa da fluorescência da clorofila *a* no claro (F_0' e F_m') foi realizada durante o dia concomitantemente com as análises de trocas gasosas, ambas no mesmo folíolo. Além destes parâmetros, procedeu-se à estimativa da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) representada pela razão F_v/F_m , do rendimento quântico do transporte de elétrons (Φ_{PSII}), dos coeficientes de extinção fotoquímica (q_p) e não-fotoquímica (NPQ) e da taxa de transporte de elétrons (ETR). Verificou-se que para todos os parâmetros de fluorescência avaliados (ETR, q_p , Φ_{PSII} e NPQ) não houve diferença estatística entre as linhagens introgridas e o controle (Anexo 2).

3.3. Identificação de fatores genéticos relacionados com parâmetros de trocas gasosas

Para avaliar a capacidade de assimilação de CO_2 dos diferentes genótipos, parâmetros de trocas gasosas foram avaliados, por meio de um analisador de gases, após uma hora de iluminação até a metade do período de luz. Apesar da ausência de genótipos com diferenças significativas quando comparadas ao M82 para os parâmetros de fluorescência, verificou-se que 23 ILs apresentaram uma maior capacidade fotossintética quando comparadas ao M82. A taxa média assimilação de CO_2 do controle M82 foi de $16,2 \mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$, enquanto que a das ILs que mais se destacaram do controle, variaram de $19,9$ a $22,2 \mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$, a incrementos na ordem de 22 a 37% na taxa fotossintética (Figura 5A).

Para avaliar a variação em termos de abertura estomática, determinou-se também a condutância estomática (g_s). Para este parâmetro verificou-se que sete linhagens apresentaram uma condutância estomática superior ao controle M82 (Figura 5B). Cabe ressaltar que destas sete, cinco apresentaram também uma maior taxa fotossintética quando comparado ao controle. Observou-se que a condutância estomática média registrada para o M82 foi de $274 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, enquanto que as ILS que diferiram estatisticamente chegaram a registrar condutâncias estomáticas na faixa de 570 a $750 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, correspondendo a cerca de 2 a 3 vezes os valores observados no controle (Figura 5B). Para avaliar a eficiência intrínseca do uso da água das linhagens introgridas, calculou-se a razão entre a taxa fotossintética líquida e a condutância estomática (A/g_s). No entanto, verificou-se que nenhuma IL apresentou diferença na eficiência intrínseca do uso da água quando comparada com o controle M82 (Figura 5C).

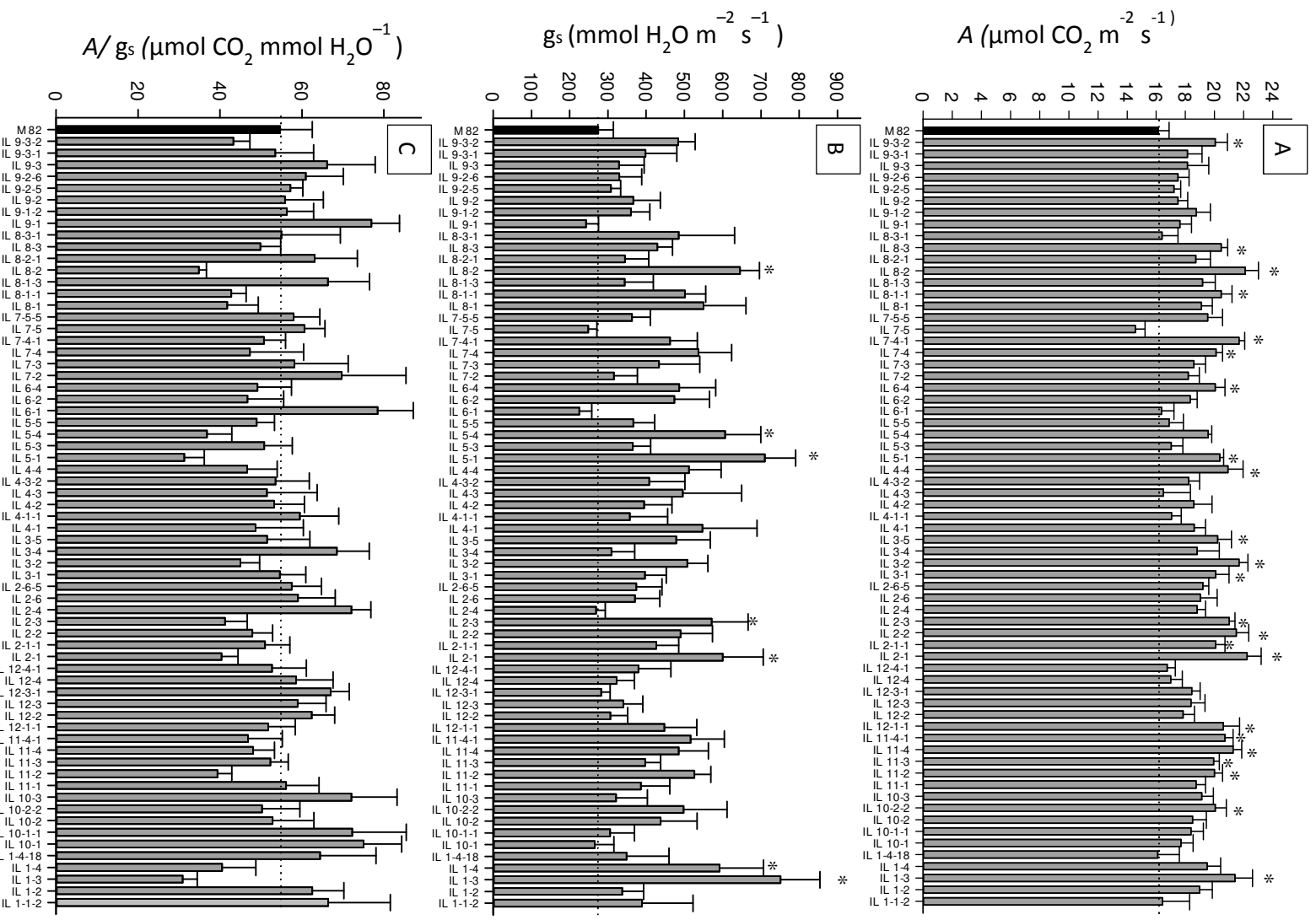


Figura 5. Taxa fotossintética líquida, condutância estomática e eficiência intrínseca do uso da água das ILs e do M82.

As barras indicam a média obtida de seis réplicas biológicas. Os dados correspondem a medições feitas no segundo folíolo da terceira folha completamente expandida em plantas com quatro semanas de idade, no período compreendido entre 8h e 13h. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle M82 pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). As barras indicam os valores médios e o erro padrão. Barra preta corresponde ao controle M82 e linha tracejada, média obtida pelo M82. Abreviações: A, taxa fotossintética líquida (A); g_s , condutância estomática (B); A/g_s eficiência intrínseca do uso da água (C)

Juntamente com a fotossíntese, a respiração no escuro (RD) representa um dos determinantes da produtividade das culturas (Siedow e Day, 2000). Assim, decidiu-se avaliar esta variável durante a noite. Para tal avaliação utilizou-se o mesmo analisador de gases mencionado anteriormente, sendo as medições determinadas no período compreendido entre 21h a 0h. Verificou-se que apenas três ILs (IL 8-1-1, IL 7-5 e IL 12-1-1) apresentaram taxas respiratórias superiores ao controle M82 (Figura 6). A média registrada da R_d para o controle foi de $0,95 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ enquanto que as ILs, que diferiram do M82 pelo teste de médias, apresentaram valores na faixa de $1,33$ a $1,45 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, o que corresponde a um aumento na faixa de 56% a 70%.

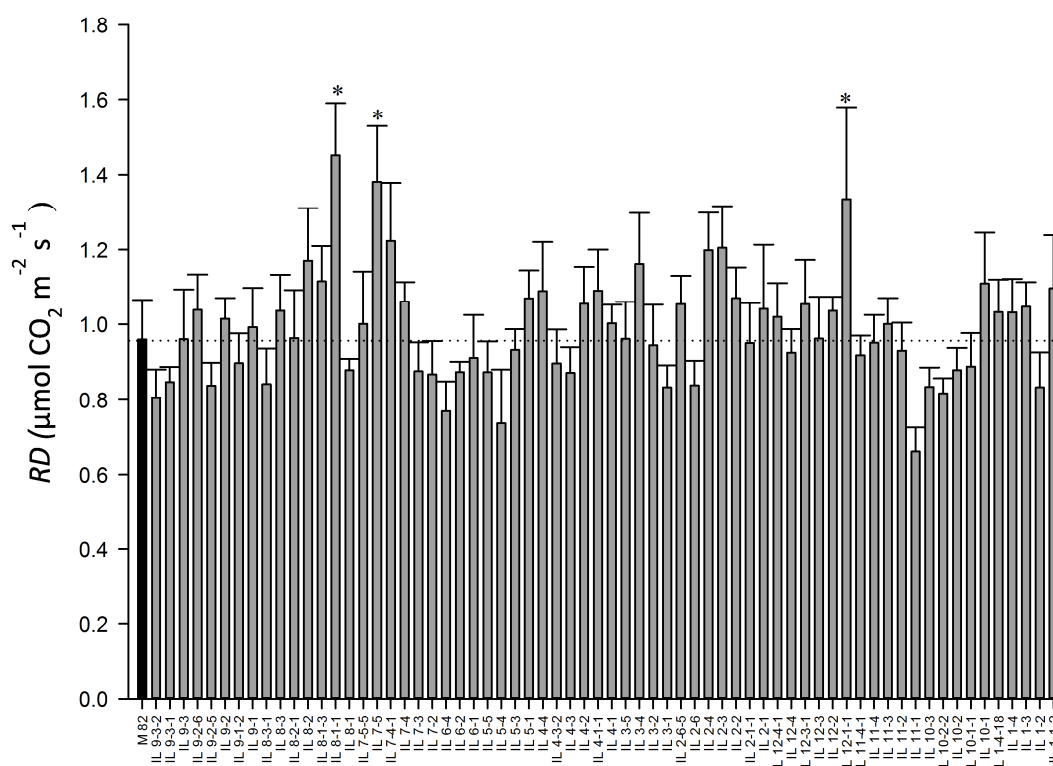


Figura 6. Taxa respiratória no escuro das ILs e do M82.

As barras indicam a média obtida de seis réplicas biológicas. Os dados correspondem a medições feitas no segundo folíolo da terceira folha completamente expandida em plantas com quatro semanas de idade, no período compreendido entre 21h e 0h. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle M82 pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). As barras indicam os valores médios e o erro padrão. Barra preta corresponde ao controle M82 e linha tracejada, média obtida pelo M82. Abreviaturas: RD, taxa respiratória no escuro.

3.4. Identificação de fatores genéticos relacionados com o metabolismo do carbono

3.4.1. Conteúdo de Açúcares

Verificou-se que o conteúdo de glicose, frutose e sacarose nas amostras coletadas ao meio dia variou entre algumas das ILs e o controle M82. Em relação ao conteúdo de glicose, apenas a IL 1-1-2, diferiu estatisticamente do controle M82 (Figura 7A), para a qual se registrou um aumento de 54% no conteúdo desse açúcar. Quanto ao teor de frutose, quatro ILs (IL 4-3, IL 10-3, IL 2-3 e IL 9-2-6) diferiram do M82 (Figura 7B), o qual apresentou um conteúdo celular médio de $5,6 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF enquanto que para as ILs, que diferiram estatisticamente do controle, o conteúdo desse açúcar variou de 8,4 a $9,2 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF. Já em relação ao conteúdo de sacarose, observou-se uma redução significativa no conteúdo desses fotoassimilados em relação ao M82 (Figura 7C). Quando comparados ao controle, as IL 3-4, 10-1 e 9-3 o conteúdo de sacarose variou de 3,8 a $3,6 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF enquanto que no controle a média registrada foi de $5,6 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

3.4.2. Conteúdo de Malato

Recentemente tem-se demonstrado a importância do metabolismo dos ácidos orgânicos, principalmente malato e fumarato (Fernie e Martinoia, 2009; Araújo et al., 2010) no metabolismo fotossintético em tomate (Nunes-Nesi et al., 2007; Araújo et al., 2012) e Arabidopsis (Gibon et al., 2009; Fuentes et al., 2012). Assim decidiu-se determinar os teores de malato e fumarato em folhas das ILs analisadas. Por meio desta análise verificou-se que as ILs 3-2 e 11-2, apresentaram conteúdos de malato superiores ao M82 e apenas a IL 7-5 com teores de malato inferiores, quando comparadas com o controle M82 (Figura 8). Quanto aos teores de fumarato entre as diferentes ILs analisadas, verificou-se que os teores deste metabólito foram muito abaixo do limite de detecção do equipamento utilizado, sendo assim os resultados obtidos para fumarato foram considerados como pouco confiáveis e não foram incluídos no presente estudo.

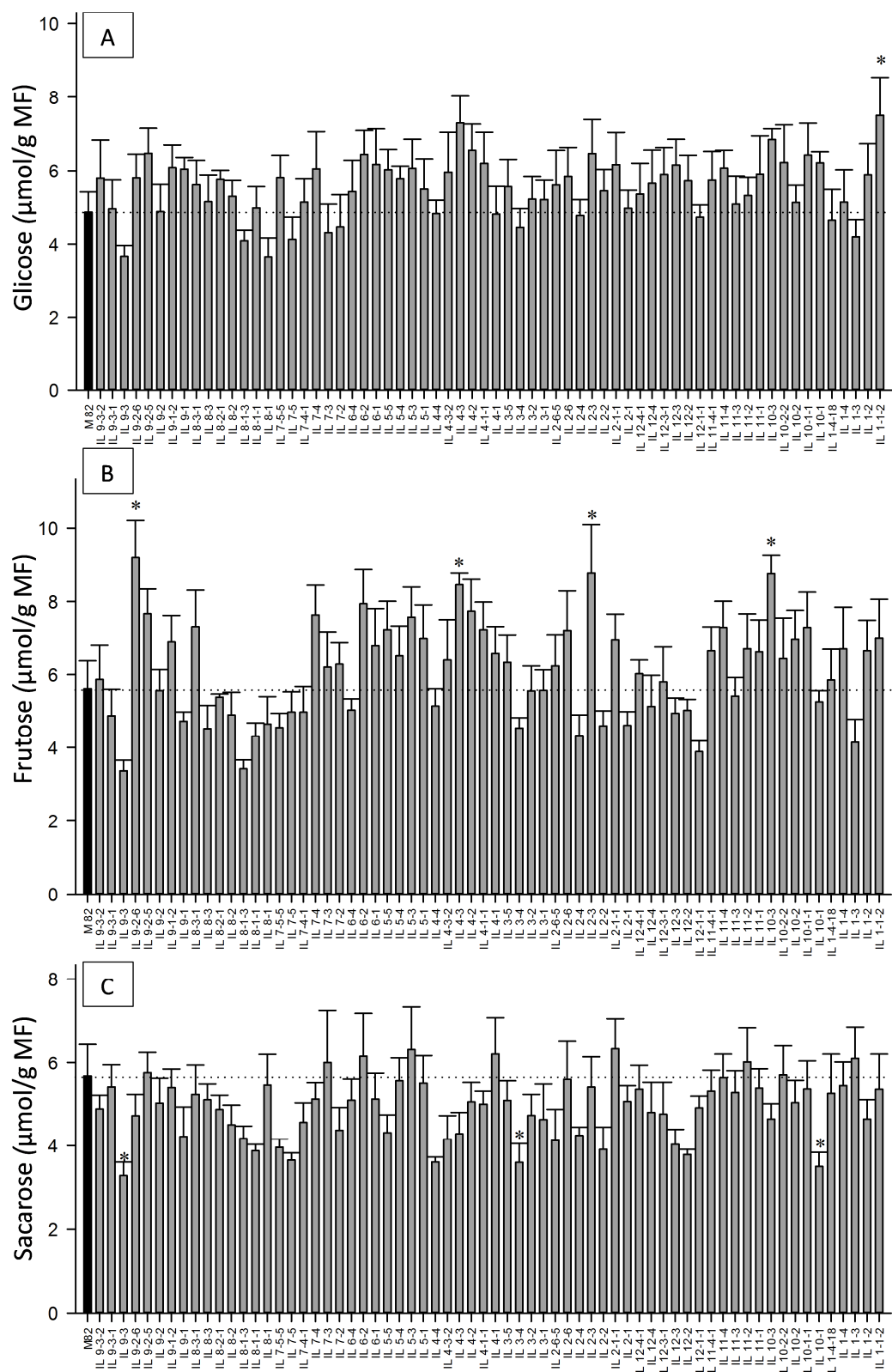


Figura 7. Conteúdo de açúcares nas ILs e no M82 ao meio dia (12 horas).

As barras indicam a média obtida de seis réplicas biológicas. Os dados correspondem a plantas com quatro semanas de idade. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle M82 pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). As barras indicam os valores médios e o erro padrão. Barra preta corresponde ao controle M82 e linha tracejada, média obtida pelo M82. Abreviaturas: MF, massa fresca. . Letras A, B e C, referem-se ao conteúdo de glicose, frutose e sacarose, respectivamente.

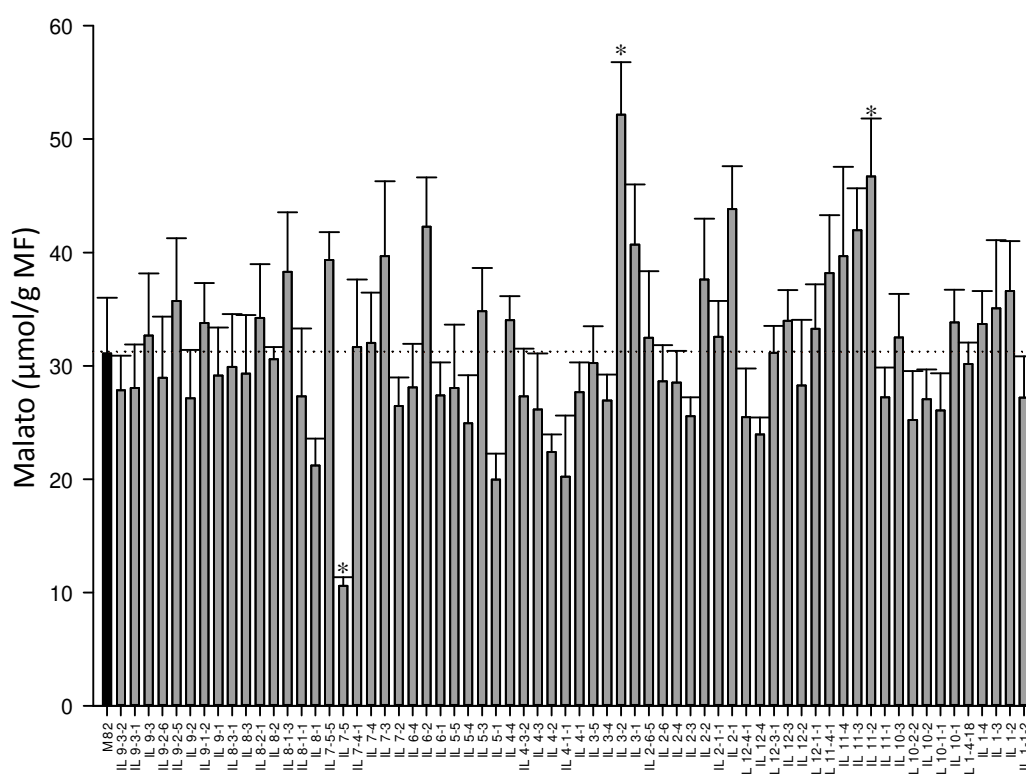


Figura 8. Conteúdo de malato nas ILs e no M82 ao meio dia (12 horas).

As barras indicam a média obtida de seis réplicas biológicas. Os dados correspondem a plantas com quatro semanas de idade. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle M82 pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). As barras indicam os valores médios e o erro padrão. Barra preta corresponde ao controle M82 e linha tracejada, média obtida pelo M82. Abreviaturas: MF, massa fresca.

3.4.3. Conteúdo de Amido

3.4.3. Conteúdo de amido

Como os teores de amido variam ao longo do dia em função da atividade fotossintética e síntese/exportação de sacarose no citossol (Buchanam, 2000; Thaiz e Zeiger, 2006), efetuou-se a quantificação do conteúdo de amido ao longo do dia. O teor de amido observado nas amostras coletadas no início da manhã do período luminoso foi estatisticamente superior apenas na IL 9-1, quando comparado ao controle M82 (Figura 9A). O conteúdo de amido encontrado na IL 9-1 foi de $44 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF, enquanto que o valor médio obtido pelo controle foi de apenas $19,7 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF. Quando analisado o conteúdo de amido ao meio dia observou-se um

número maior de ILs que diferiram estatisticamente do controle. Para este horário de coleta 30 ILs obtiveram maior acúmulo de amido em relação ao controle M82 (Figura 9B). A média apresentada pelo controle foi de $18,1 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF, já as ILs que diferiram estatisticamente do controle apresentaram valores na faixa de $39,57$ a $59,5 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF, o que corresponde a cerca de 2 a 3 vezes o teor de amido observado no M82. Em relação ao teor de amido presente nas amostras foliares coletados ao final do período luminoso, 4 ILs (IL9-1-2, IL 7-2, IL 9-3-2 e IL 9-2-5) apresentaram um maior conteúdo de amido quando comparado ao M82, enquanto apenas uma IL(IL1-3) apresentou uma redução de 44% em relação ao controle (Figura 9C). Os valores apresentados pelas ILs que acumularam mais amido foram entre 93 a $114 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF; e $25 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF para a IL 1-3, enquanto que o valor médio do controle foi de $58 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

3.5. Identificação de fatores genéticos relacionados com o metabolismo do nitrogênio.

3.5.1. Conteúdo de Nitrato

Além do conteúdo total de aminoácidos, optou-se também determinar em cada IL o conteúdo celular de nitrato presente nas folhas na metade do período de luz. Esta avaliação juntamente com o conteúdo de aminoácidos pode fornecer informações importantes sobre o metabolismo do nitrogênio e suas interações com o metabolismo fotossintético. Assim verificou-se que 20 ILs obtiveram conteúdos celulares de nitrato superiores ao controle M82 (Figura 10). Observou-se que o conteúdo médio de nitrato encontrado no controle foi de $0,031 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF, enquanto que as ILs, que diferiram estatisticamente do controle, os conteúdos de nitrato variou de $0,057$ a $0,14 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

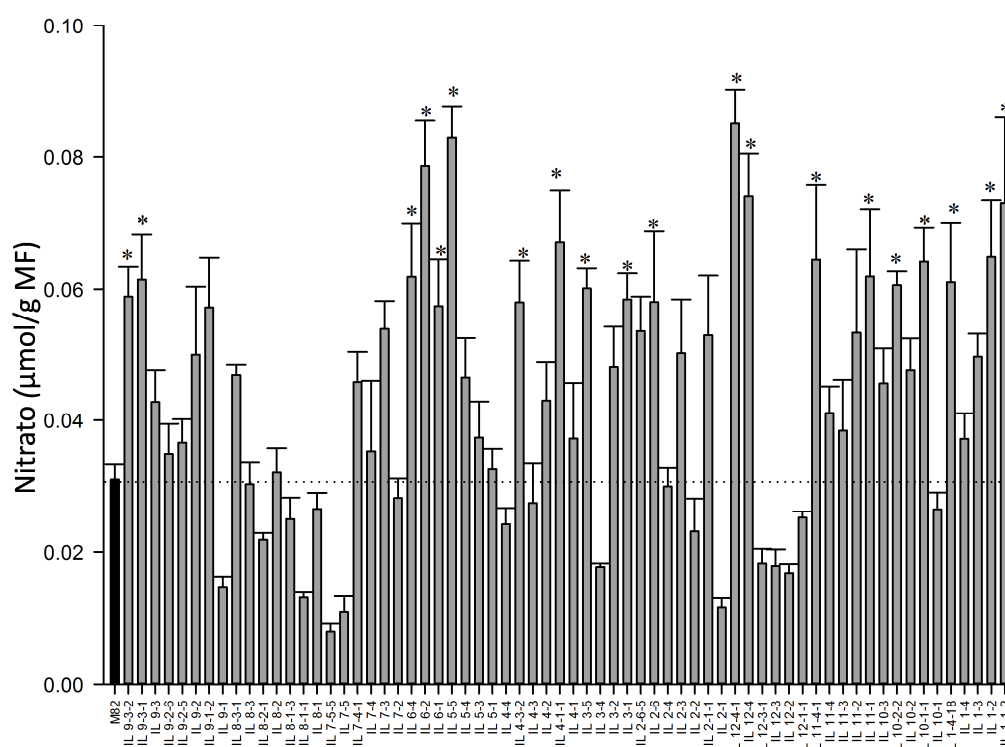


Figura 10. Conteúdo de nitrato nas ILs e no M82 ao meio dia (12 horas).

As barras indicam a média obtida de seis réplicas biológicas. Os dados correspondem a plantas com quatro semanas de idade. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle M82 pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). As barras indicam os valores médios e o erro padrão. Barra preta corresponde ao controle M82 e linha tracejada, média obtida pelo M82. Abreviaturas: MF, massa fresca.

3.5.2. Conteúdo de Pigmentos

Quanto aos conteúdos de clorofila *a* e *b* nas amostras foliares coletadas ao meio dia, observou-se uma variação entre 1,13 a 1,68 mg g⁻¹ massa fresca (MF) para o conteúdo de clorofila *a* (Figura 11A) e entre 0,43 a 0,73 mg g⁻¹ MF (Figura 11B) no conteúdo de clorofila *b* das diferentes ILs. Apesar da variação, verificou-se que esses valores não diferiram estatisticamente do controle M82, que apresentou valores de 1,35 e 0,57 mg g⁻¹ MF nos teores de clorofila *a* e *b*, respectivamente. Também foi calculada a razão clorofila *a*/ clorofila. Contudo, não foi identificada diferença estatística entre as ILs e espécie parental M82.

3.5.3. Conteúdo de Aminoácidos

Além do conteúdo dos principais açúcares solúveis em etanol que refletem o metabolismo do carbono, decidiu-se caracterizar a quantidade total de aminoácidos solúveis em etanol o qual serviria como um indicador do metabolismo do nitrogênio (Scheible et al., 2004). Quanto ao conteúdo de aminoácidos das 66 ILs, avaliadas no presente estudo, verificou-se que cinco linhagens (IL 9-1, IL 12-1-1, IL 8-2-1, IL 5-5, IL 3-4 e IL 9-3), apresentaram um maior conteúdo de aminoácidos totais em relação ao controle (Figura 12). Estas ILs apresentaram um conteúdo de aminoácidos na faixa de 7,8 a 8,3 μmol g⁻¹ MF, com exceção da IL 9-1, que apresentou um conteúdo de 11 μmol g⁻¹ MF, enquanto que a média obtida pelo controle foi de 4,4 μmol g⁻¹ MF.

3.5.4 Conteúdo de Proteína

Além dos aminoácidos totais e nitrato, determinou-se também o conteúdo de total de proteína presente na fração insolúvel em etanol, nas amostras foliares coletadas no meio do fotoperíodo. Verificou-se que 17 ILs das 66 analisadas diferiram quanto aos teores totais de proteína insolúvel em etanol. Estas ILs apresentaram um conteúdo total de proteína inferior ao controle M82 (Figura 13). Observou-se que enquanto o conteúdo médio apresentado pelo M82 foi de 17,98 μg g⁻¹ MF as ILs que diferiram estatisticamente apresentaram valores médios entre 9,5 a 13,2 μg g⁻¹ MF, o que corresponde a uma redução na faixa de 26% a 73% em relação ao M82.

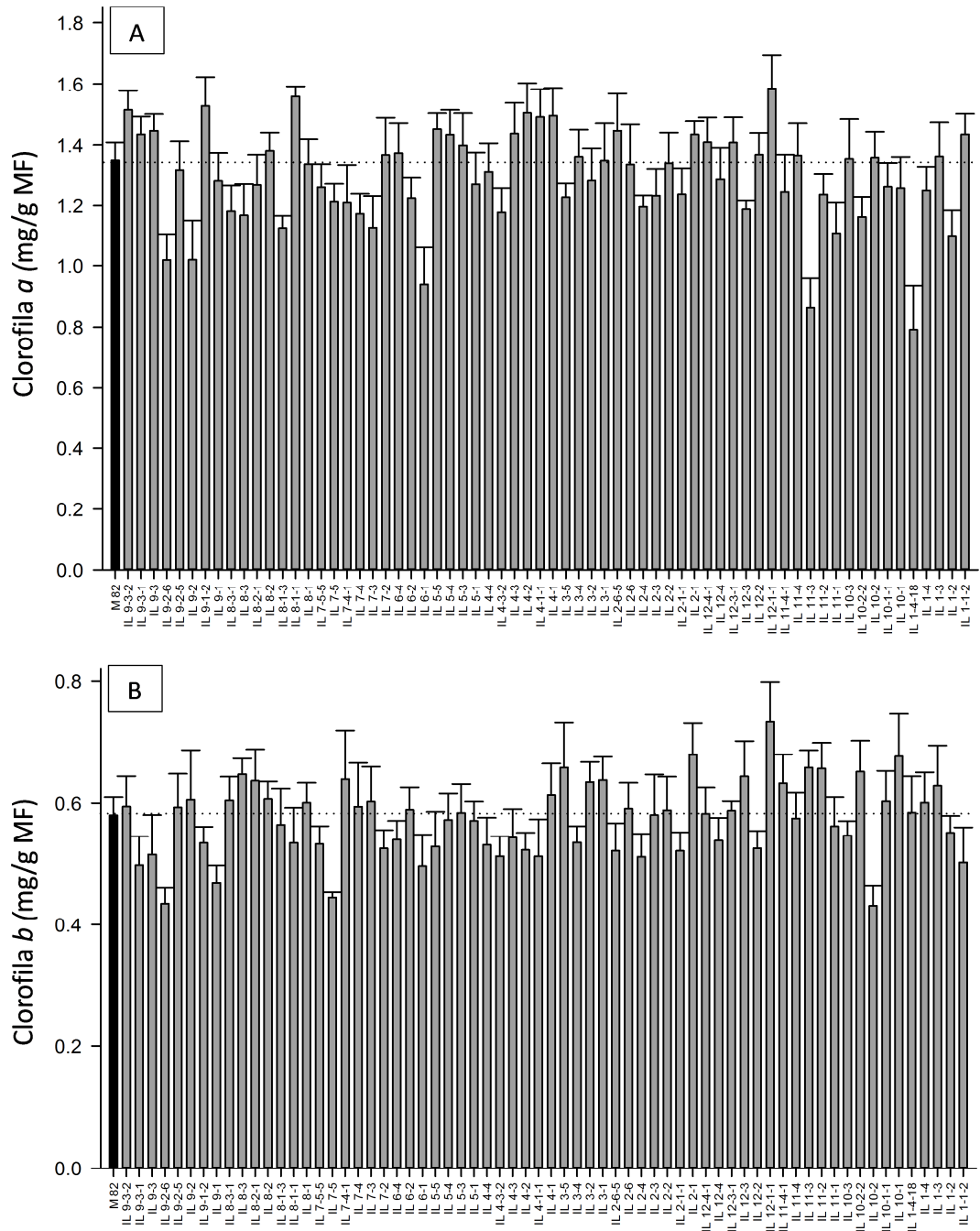


Figura 11. Conteúdo de pigmentos nas ILs e no M82 ao meio dia (12 horas).

As barras indicam a média obtida de seis réplicas biológicas. Os dados correspondem a plantas com quatro semanas de idade. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle M82 pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). As barras indicam os valores médios e o erro padrão. Barra preta corresponde ao controle M82 e linha tracejada, média obtida pelo M82. Abreviaturas: MF, massa fresca. Letras A e B, referem-se ao conteúdo de clorofila a e b, respectivamente

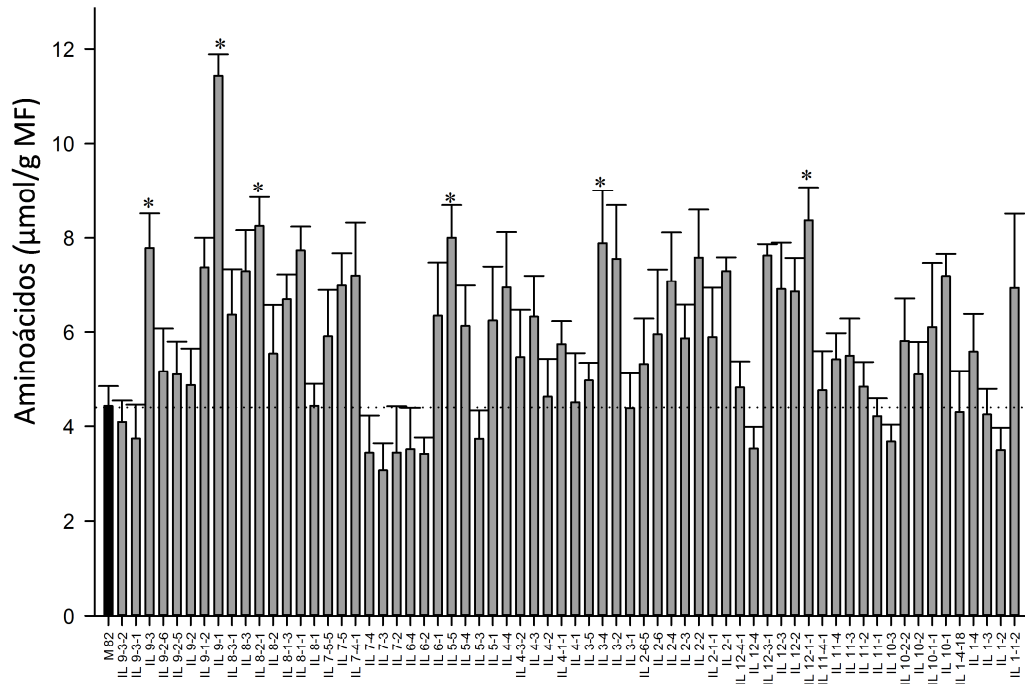


Figura 12. Conteúdo de aminoácidos totais nas ILs e no M82 ao meio dia (12 horas). As barras indicam a média obtida de seis réplicas biológicas. Os dados correspondem a plantas com quatro semanas de idade. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle M82 pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). As barras indicam os valores médios e o erro padrão. Barra preta corresponde ao controle M82 e linha tracejada, média obtida pelo M82. Abreviaturas: MF, massa fresca.

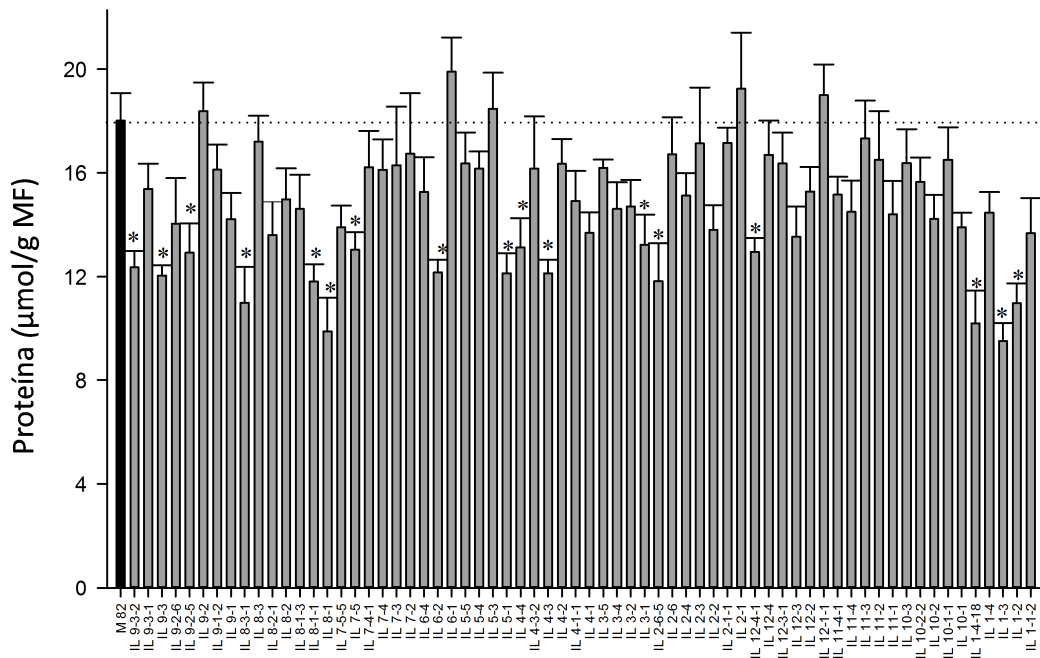


Figura 13. Conteúdo de proteína nas ILs e no M82 ao meio dia (12 horas). As barras indicam a média obtida de seis réplicas biológicas. Os dados correspondem a plantas com quatro semanas de idade. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle M82 pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). As barras indicam os valores médios e o erro padrão. Barra preta corresponde ao controle M82 e linha tracejada, média obtida pelo M82. Abreviaturas: MF, massa fresca.

3.5.5 Metabolismo do Nitrato

Uma vez quantificados os conteúdos de nitrato, clorofila total, aminoácido e proteína, foram calculadas as razões: $\text{NO}_3/\text{Clorofila total}$, $\text{NO}_3/\text{aminoácidos}$ e $\text{NO}_3/\text{Proteínas}$ (Figura 14). De maneira geral, essas razões nos permitem analisar a eficiência com que cada IL sintetiza cada um dos metabólitos analisados em relação ao parental M82 (Ikram et al., 2012) . Para a razão de $\text{NO}_3/\text{Clorofila total}$, $\text{NO}_3/\text{aminoácidos}$ e $\text{NO}_3/\text{Proteínas}$; 19, 7 e 44 linhagens apresentaram valores superiores ao controle M82, respectivamente. Indicando por sua vez que estas linhagens foram menos eficientes em converter a fonte de nitrogênio (NO_3), aqui avaliada, nos seus respectivos metabólitos. Muito embora, para as razões $\text{NO}_3/\text{Proteínas}$, oito ILs (IL 3-4, IL 12-3-1, IL 8-1-1, IL 12-2, IL 9-1, IL 7-5, IL 2-1 e IL 7-5-5) foram reveladas como sendo mais eficiente na síntese de proteínas quando comparado ao M82 (Figura 14C).

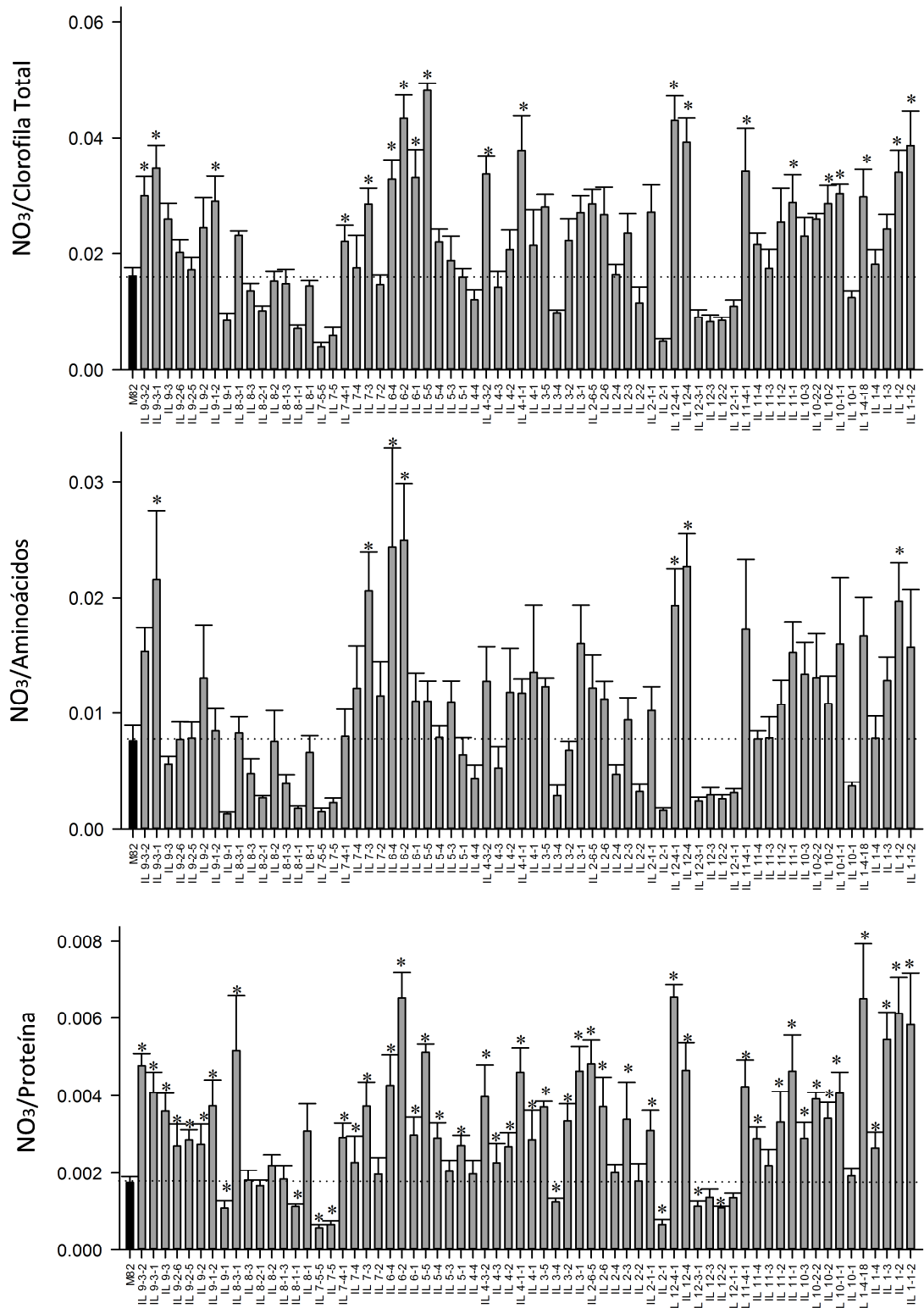


Figura 14. Eficiência no metabolismo do nitrato (NO₃) das ILs e do M82.

As barras indicam a média obtida de seis réplicas biológicas. Os dados correspondem a plantas com quatro semanas de idade. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle M82 pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$). As barras indicam os valores médios e o erro padrão. Barra preta corresponde ao controle M82 e linha tracejada, média obtida pelo M82. Letras A, B e C, referem-se a eficiência na síntese de clorofilas, aminoácidos e proteínas, respectivamente.

3.6. Mapeamento das regiões cromossômicas envolvidas com alterações nos parâmetros avaliados e no conteúdo dos metabólitos

A população de linhagens introgridas desenvolvidas por Zamir e colaboradores, (1995) já permitiu a identificação genes relacionados ao crescimento determinado de plantas e a diversas mutações nas cores dos frutos (Pnueliet al., 1998; Ronen et al., 1999; Isaacson et al., 2002) e de dois QTLs relacionados com os teores de açúcares em frutos (Fridman et al., 2000) e ao peso do fruto (Frery et al., 2000). Utilizando o *Sol Genomics Network Map 2000* (www.sgn.cornell.edu), o presente estudo permitiu identificar vários QTLs relacionados a parâmetros fisiológicos e características metabólicas relacionadas ao metabolismo do carbono e do nitrogênio (anexo 3). Além disso, foi possível identificar os marcadores e as anotações genômicas de 25 fragmentos cromossômicas (*bins*) de *S. pennellii* responsáveis por alterações nos parâmetros de trocas gasosas, 21 regiões associadas com alterações nos acúmulo de biomassa, 30 regiões envolvidas com alterações no conteúdo de metabólitos associados ao metabolismo do carbono e do nitrogênio quando comparado com a espécie parental *S. lycopersicum* M82 (anexo 4).

3.7. Análise de Correlação

Para uma melhor avaliação do nível de associação entre as variáveis analisadas ou mesmo para permitir a elaboração de inferências válidas para a população a partir de dados amostrais (Chen e Popovic, 2002), análise de correlação foi realizada. Por meio desta análise, verificou-se a existência de um grande número de correlações estatisticamente significativas. Entre as correlações significativas observadas, algumas foram bastante óbvias como a correlação positiva entre fotossíntese líquida (*A*) e a condutância estomática, bem como entre a fotossíntese líquida e as variáveis de fluorescência ETR e qP. Todos os resultados obtidos por esta análise estão apresentados em detalhes no anexo 2. Entretanto, para uma melhor visualização das interações entre as variáveis, a partir do coeficiente de correlação de Person, foi elaborado um mapa de calor (Figura 15), onde cada quadrado representa o *valor r* da análise de correlação numa escala de

cor, onde o vermelho, verde e branco representam correlações positivas, negativas e não-significativas, respectivamente (Figura 15).

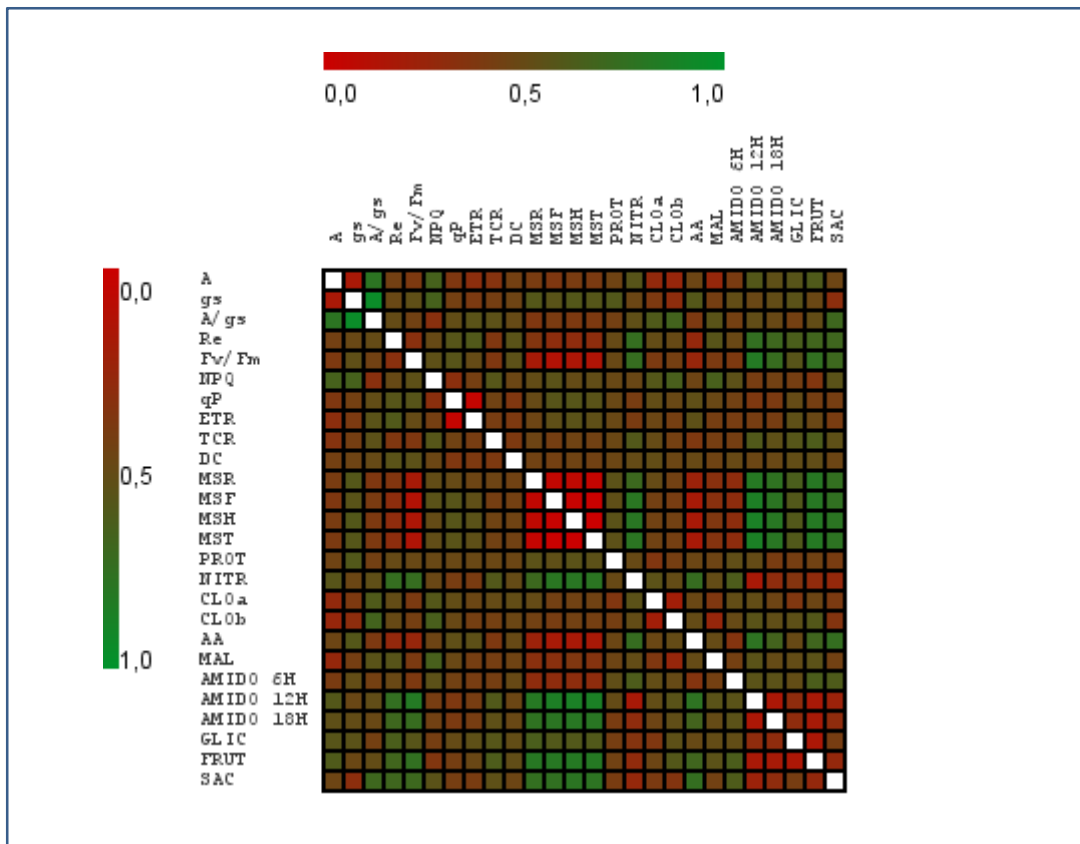
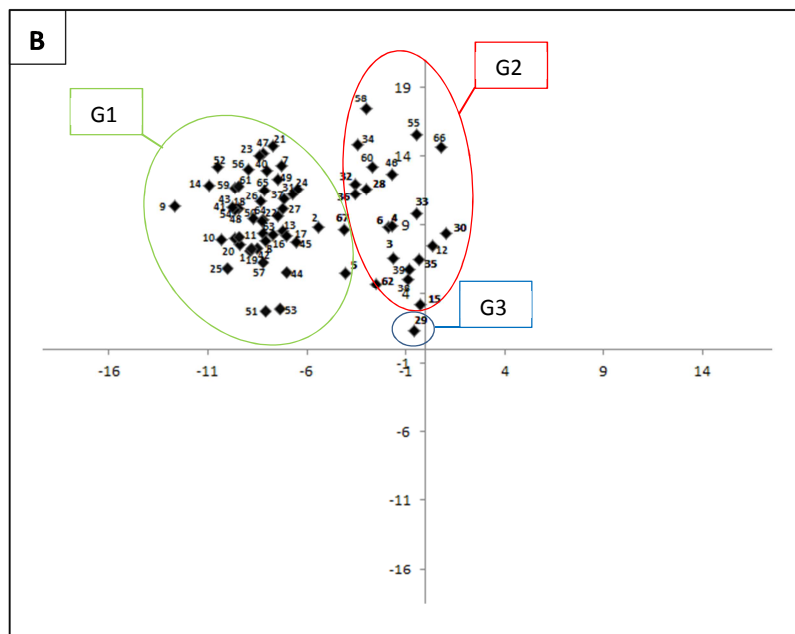
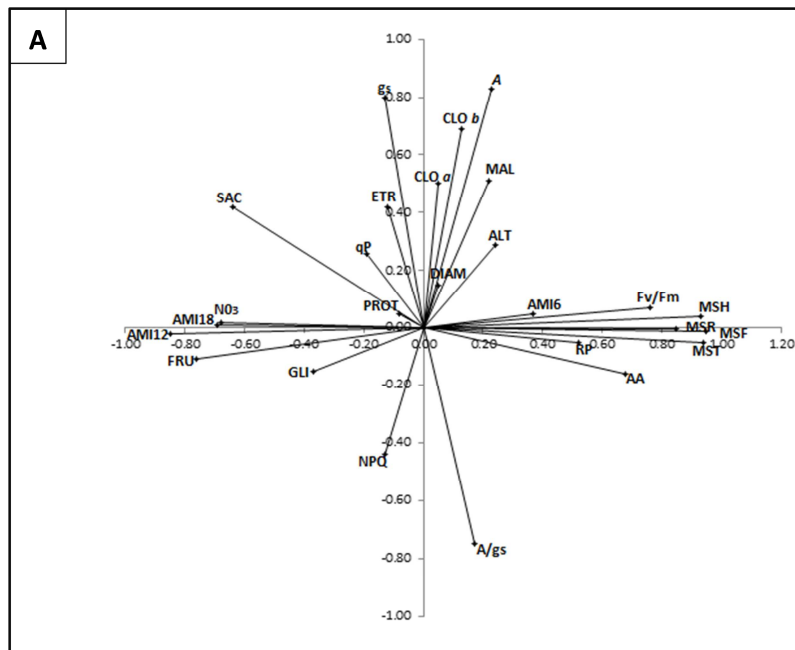


Figura 15. Mapa de cores para análise de correlação de Person.

Cada quadrado representa o valor r da análise de correlação numa escala de cor, onde o vermelho, verde e branco representam correlações positivas, negativas e não-significativas, respectivamente. Abreviaturas: taxa assimilatória líquida de carbono (A), condutância estomática (g_s), eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s), respiração no escuro (R_e), coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e não-fotoquímica (NPQ), taxa de transporte de elétrons (ETR), eficiência quântica potencial (F_v/F_m), Altura (ALT), diâmetro do caule ($DIAM$), massa seca da raiz (MSR), massa seca da haste (MSH), massa seca da folha (MSF), massa seca total (MST), conteúdo de clorofila a ($CLO a$), clorofila b ($CLO b$), glicose (GLI), frutose (FRU), Sacarose (SAC), proteína ($PROT$), aminoácidos (AA), nitrato (NO_3) malato (MAL), conteúdo de amido as 6 hora ($AMIDO 6H$), As 12 horas ($AMIDO 12H$) e as 18 horas ($AMIDO 18H$).

3.8. Análise de Componentes Principais (ACP)

Quando há interdependência dentro de um conjunto de variáveis, como no presente caso, as correlações de Pearson não exploram adequadamente essa interdependência, ao contrário de análises multivariadas (Rencher, 2002), que são descritas a seguir. Para realizar um agrupamento das contribuições dos parâmetros fisiológicos, morfológicos e bioquímicos analisados, foram feitas análises multivariadas com decomposição em componentes principais. A análise dos componentes principais reduziu as vinte e seis variáveis analisadas a três componentes principais (CP), explicando por sua vez 54,2% da variância total nos dados originais (Figura 16). Nas linhagens avaliadas, o primeiro componente (CP1) explicou 30,8% da variância total dos dados, o qual esteve largamente associado com os parâmetros relacionados ao acúmulo de biomassa (MSF, MSH, MSR e MST) e ao acúmulo de amido das 12 e 18 horas (AMI12 e AMI18). O segundo componente (CP2) explicou 14,4% da variação, e este esteve relacionado com os parâmetros associados com as trocas gasosas (A , g_s e A/g_s). O terceiro e último componente avaliado (CP3) explicou apenas 9,0% da variação total, e esteve grandemente associado com parâmetros de fluorescência (qP , ETR e NPQ). Ao analisar-se o CP1 (Figura 16A), observa-se que os clones posicionados em valores mais positivos do eixo exibiram os maiores valores de MSR, MSF, MSH e MST; dessa forma, pode-se verificar que o grupo II teve uma maior correlação com os parâmetros de acúmulo de biomassa, por outro lado, o grupo I apresentou uma maior correlação com o acúmulo de amido e açúcares. Analisando-se o CP2, observa-se que os clones posicionados em valores mais positivos do eixo exibiram os maiores valores de A e g_s . Logo assim, a formação do grupo 3, representado pela IL7-5, se explica pela baixa assimilação líquida de CO_2 e baixa condutância estomática apresentada por esta linhagem (Figura 16B).



1-IL 12-4-1	2-IL 12-4	3-IL 12-3-1	4-IL 12-3	5-IL 12-2	6-IL 12-1-1	7-IL 11-4-1	8-IL 9-2
9-IL 9-1-2	10-IL 9-2-5	11-IL 9-2-6	12-IL 9-3	13-IL 9-3-1	14-IL 9-3-2	15-IL 10-1	16-IL 10-1-1
17-IL 10-2	18-IL 10-2-2	19-IL 10-3	20-IL 11-1	21-IL 11-2	22-IL 11-3	23-IL 11-4	24-IL 6-4
25-IL 7-2	26-IL 7-3	27-IL 7-4	28-IL 7-4-1	29-IL 7-5	30-IL 7-5-5	31-IL 8-1	32-IL 8-1-1
33-IL 8-1-3	34-IL 8-2	35-IL 8-2-1	36-IL 8-3	37-IL 8-3-1	38-IL 9-1	39-IL 3-4	40-IL 3-5
41-IL 4-1	42-IL 4-1-1	43-IL 4-2	44-IL 4-3	45-IL 4-3-2	46-IL 4-4	47-IL 5-1	48-IL 5-3
49-IL 5-4	50-IL 5-5	51-IL 6-1	52-IL 6-2	53-IL 1-1-2	54-IL 1-2	55-IL 1-3	56-IL 1-4
57-IL 1-4-18	58-IL 2-1	59-IL 2-1-1	60-IL 2-2	61-IL 2-3	62-IL 2-4	63-IL 2-6	64-IL 2-6-5
65-IL 3-1	66-IL 3-2	67-M82					

Figura 16. Representação gráfica da Análise de Componentes Principais.

A) Coeficientes de ponderação associados às variáveis: taxa assimilatória líquida de carbono (A), condutância estomática (g_s), eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s), respiração no escuro (RP), coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e não-fotoquímica (NPQ), taxa de transporte de elétrons (ETR), eficiência quântica potencial (Fv/Fm), Altura (ALT), diâmetro do caule (DIAM), massa seca da raiz (MSR), massa seca da haste (MSH), massa seca da folha (MSF), massa seca total (MST), conteúdo de clorofila *a* (CLO *a*), clorofila *b* (CLO *b*), glicose (GLD), frutose (FRU), Sacarose (SAC), proteína (PROT), aminoácidos (AA), nitrato (NO₃) malato (MAL), conteúdo de amido as 6 hora (AMI6), As 12 horas (AMI12) e as 18 horas (AMI18). **B)** Grupos formados com base nos escores relativos as 66 linhagens introgrididas mais o controle M82 obtidos em relação aos CP1 e CP2. Cada número no gráfico corresponde a uma IL devidamente identificada pela legenda localizada logo abaixo da figura. Abreviaturas: grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3).

3.9. Análise de agrupamento

A análise de agrupamentos, também conhecida como análise de cluster, é uma técnica estatística multivariada que tenta sintetizar ou simplificar a estrutura de variabilidade dos dados, contribuindo dessa forma para uma melhor visualização do universo amostral. Esta técnica permite agrupar genótipos de acordo com grau de semelhança ou de diferença (Hair Jr. et al., 1998). Desse modo, os genótipos dentro de um mesmo grupo são tão similares quanto possível e são, ao mesmo tempo, tão dissimilares quanto possível dos genótipos presentes nos demais grupos. Com base na matriz de distâncias foi calculada a distância de Mahalanobis e as linhagens agrupadas através do método de agrupamento da distância média UPGMA. A análise do dendograma apresentado na figura 17 permitiu separar as linhagens introgridas em três grupos. Um primeiro grande grupo (G1), constituído por 45 ILs mais o controle M82, um segundo menor grupo (G2), formado por 20 ILs e por fim, um terceiro grupo (G3) representado por uma única IL, a IL 7-5.

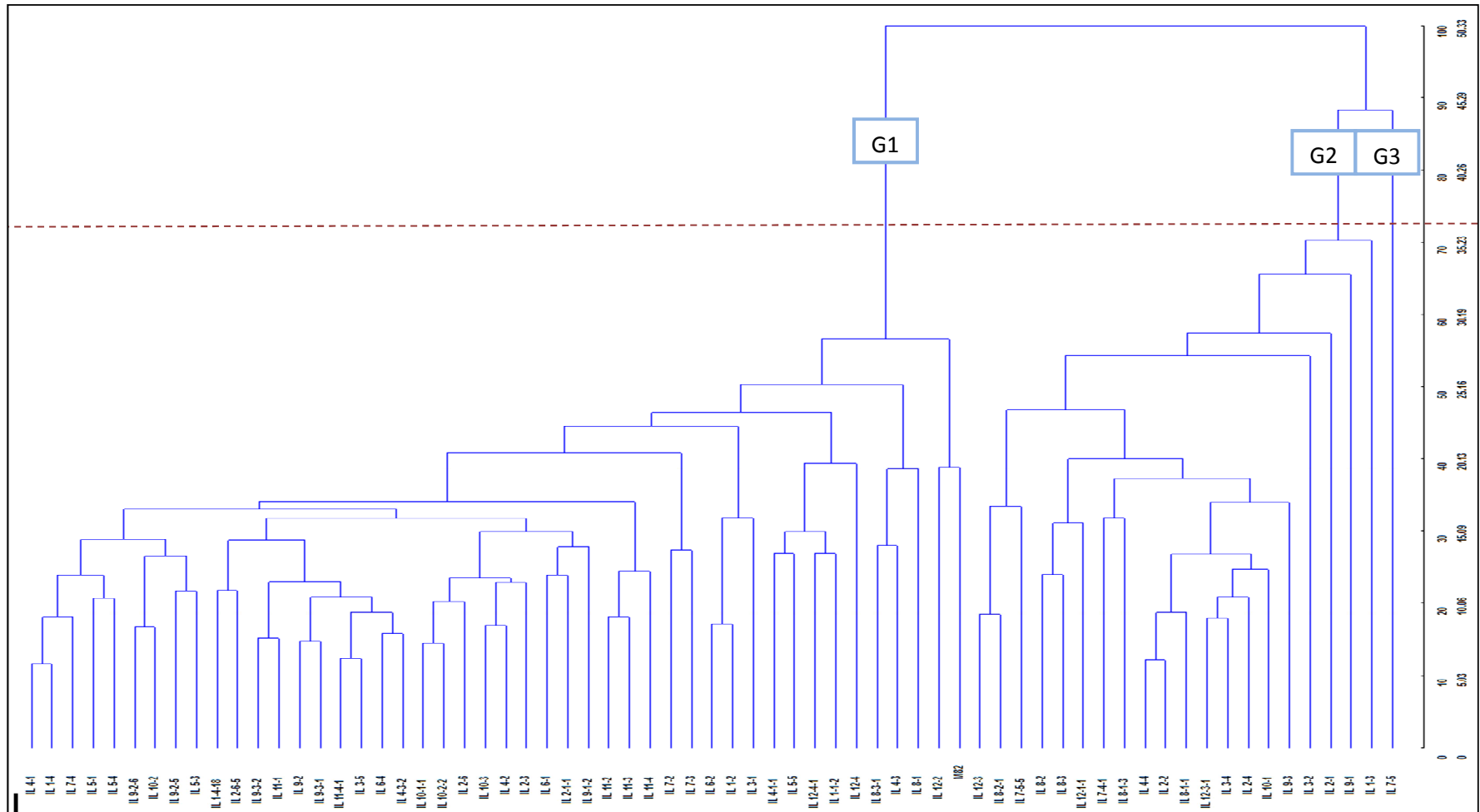


Figura 17. Dendrograma obtido através da medida de distância de Mahalanobis e método de agrupamento UPGMA (Cruz, 2007)
 Linha vermelha tracejada corresponde ao local do corte estatisticamente significativo para ambos os eixos X e Y.

4. Discussão

4.1. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

Do ponto de vista agrônomo, a fotossíntese, juntamente com os processos associados respiração e fotorrespiração, é o processo fisiológico de grande importância, uma vez que esta diretamente relacionada ao acúmulo de biomassa e a produção. Dada a importância da fotossíntese na determinação do crescimento e desenvolvimento vegetal, a identificação e o mapeamento de QTLs que possam estar relacionados com controle de parâmetros de trocas gasosas, torna-se uma ferramenta essencial para a seleção de genótipos por marcadores moleculares e, eventualmente, a clonagem de genes em programas de melhoramento e biotecnológicos visando a obtenção de plantas com maior rendimento ou com maior tolerância a estresses abióticos (Lanceras et al., 2004; Lafitte et al., 2004; Xu et al., 2005; Yue et al., 2005; Takai et al., 2009). Verifica-se que QTLs para a taxa fotossintética foram identificados para algumas espécies de plantas cultivadas como girassol (Herve et al., 2001) e em arroz (Teng et al., 2004; Gu et al. 2011; Zhao et al., 2008; Adachi et al., 2011). Entretanto, as informações sobre os QTLs obtidos para fotossíntese e processos relacionados ainda são muito limitadas. No presente estudo verificou-se que em 23 ILs, cujas regiões de introgressão estão distribuídas nos doze cromossomos do tomate, apresentaram taxas fotossintéticas superiores ao parental M82. Observou-se que dos 12 cromossomos que compõem o genoma do tomate, o 2, 3, 7, 8 e o 11 foram os que apresentaram o maior número fragmentos introgridos relacionados com alterações na eficiência fotossintética, sugerindo o envolvimento de vários fatores genéticos na regulação de características relacionadas ao desempenho fotossintético. Para a população de ILs analisada no presente estudo, verificou-se uma correlação positiva entre a assimilação líquida de CO₂ e a condutância estomática, indicando que o aumento na taxa fotossintética foi acompanhado por um aumento na condutância estomática (Anexo 2). Neste sentido, a ausência de ILs com alterações na razão A/g_s, é uma indicação plausível de que o aumento na taxa fotossintética, observado em algumas ILs, pode ser resultado de uma menor limitação estomática por parte dessas ILs. Tem-se

observado em estudos utilizando diferentes variedades de arroz que alterações nas taxas fotossintéticas estão associadas a variação na condutância estomática (Maruyama e Tajima, 1990; Ohsumi et al., 2007). Em adição, a identificação de QTLs envolvidas no controle da condutância estomática tem sido relatada (Price et al., 1997; Frei et al., 2008; Khowaja e Price, 2008). Assim estes estudos corroboram com os resultados aqui apresentados, onde 7 QTLs positivos para condutância estomática foram identificados, sugerindo a condutância estomática como um fator que deve ser considerado em trabalhos que visam a obtenção de genótipos com altas taxas fotossintéticas.

Trabalhando com a mesma população de ILs utilizada no presente estudo, Eshed e Zamir, (1995), realizaram um mapeamento de QTLs associados ao rendimento. Surpreendentemente, estes autores identificaram apenas um QTL, representado pela linha IL-7-5, com um rendimento de frutos superior ao parental M82. Interessante esta mesma IL, nas condições de cultivo do presente trabalho, apresentou a menor taxa fotossintética dentre as 66 linhagens avaliadas. Contudo, cabe ressaltar que a razão da massa seca da folha/massa seca total, para a IL 7-5 foi superior a obtida para controle M82, bem como, para as demais ILs. Esse resultado sugere que a baixa fotossíntese apresentada por esta linhagem pode ser compensada por uma maior área fotossintetizante o que potencializa uma maior produção de frutos.

De acordo com Baker & Rosenqvist, (2004), alterações na emissão da fluorescência da clorofila a são indicativos de alterações na atividade fotossintética. Entretanto, no presente estudo, não foram encontrados QTLs para os parâmetros de fluorescência avaliados. Contudo, como esperado, foi verificada uma alta correlação entre estes parâmetros e a assimilação líquida de CO₂, sugerindo assim que o aumento na taxa fotossintética observado em algumas ILs pode estar associado também com alterações em parâmetros de fluorescência. Em adição, essa associação foi também verificada pela análise de componentes principais, uma vez que analisando o CP2, verifica-se que os parâmetros ETR e qP contribuíram juntamente com A e g_s para a formação dos 3 grupos de ILs. Resultados semelhantes foram obtidos por Gu et al., (2011), onde os mesmos, utilizando diferentes

variedades de arroz sob diferentes condições hídricas, identificaram algumas QTLs envolvidas com alterações nos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*. Os mesmos identificaram 4 QTLs envolvidos com alterações nos coeficientes de extinção fotoquímica (qP), 3 QTLs positivas para eficiência quântica efetiva (Φ_{PSII}) e 4 QTLs com uma maior eficiência na captura de energia de excitação pelos centros de reação aberto (F_v'/F_m').

4.2. Metabolismo do carbono

No presente estudo, foram identificados 14 QTLs positivos para a produção de biomassa. Foram identificados também 30 QTLs positivos para o acúmulo de amido. Esperava-se que a produção total de biomassa estivesse associada a maiores teores de amido transitório produzido durante o dia. Entretanto, verificou-se dentro da população uma correlação negativa entre a massa seca total e o conteúdo de amido nas amostras foliares coletadas no meio e no final do período de luz. Essa relação entre os teores de amido e acúmulo de massa seca tornou-se mais evidente pela análise de componentes principais, onde se verificou que as variáveis relacionadas ao acúmulo de biomassa (MSR, MSF, MSH e MST) estão em sentidos opostos ao conteúdo de amido. Em adição, verificou-se que a IL que apresentou um maior acúmulo de biomassa, IL 7-5-5, apresentou por sua vez um baixo conteúdo de amido. Esse resultado corrobora com um trabalho recente com *Arabidopsis thaliana*, onde foram analisados os teores de amido e a produção de biomassa em 94 acessos (Sulpice et al., 2009). Neste trabalho observou-se correlação negativa entre estas duas características. Assim os resultados observados no presente trabalho sugerem que o amido também pode atuar como um importante metabólito integrador na regulação do crescimento vegetativo em tomate assim como verificado para *Arabidopsis* (Smith e Stitt, 2007; Sulpice et al., 2009; Graf et al., 2010; Smith, 2012)

4.3. Metabolismo do nitrogênio

Para avaliar a eficiência de incorporação do nitrogênio inorgânico, representado pelo nitrato (NO_3), foram calculadas as razões NO_3 /clorofila total, NO_3 /aminoácidos totais e NO_3 /proteína total, de modo a avaliar a eficiência na qual as linhagens introgridas incorporam nitrato em

moléculas biologicamente relevantes, como clorofilas, aminoácidos e proteínas. Verificou-se que 20 ILs apresentaram uma razão $\text{NO}_3/\text{clorofila}$ total superiores ao controle M82, enquanto que para a razão $\text{NO}_3/\text{aminoácidos}$, 7 ILs tiveram o mesmo desempenho. No entanto, quando calculada a razão $\text{NO}_3/\text{proteínas}$, 44 ILs tiveram valores para a razão superior ao controle e 7 ILs apresentaram uma menor razão. De maneira geral, constatou-se que apenas para razão $\text{NO}_3/\text{proteínas}$ algumas ILs apresentaram razões menores, sugerindo então uma maior eficiência. Dentre estas ILs destacam-se as IL 7-5-5 e IL 7-5. Muito embora tenha se registrado apenas diferença significativa na eficiência da síntese protéica, verificou-se que estas ILs também apresentaram uma maior eficiência na incorporação do nitrato em moléculas de aminoácidos e clorofilas, porém não diferiram do controle.

Avaliando o acúmulo de amido ao longo do dia, observa-se que as IL 7-5-5 e IL 7-5 apresentaram um dos menores conteúdos de amido no tecido foliar entre as linhagens avaliadas no presente estudo. Sabe-se de longa data que o crescimento e o desenvolvimento vegetativo são altamente dependentes da interação entre o metabolismo do C e N (Nunes-Nesi et al., 2010; Foyer et al., 2007). Como grandes quantidades de N são investidas na maquinaria fotossintética, principalmente em pigmentos e Rubisco, uma assimilação de CO_2 mais eficiente e conseqüentemente um aumento no acúmulo de biomassa e maior produção, esta diretamente associada a uma maior disponibilidade de nitrogênio (Lawlor et al., 1989; Lawlor, 2002). Outro aspecto relevante é que o fornecimento de esqueletos de carbono são essenciais para a assimilação do nitrogênio (Hachiya et al., 2007; Piques et al., 2009). Constatou-se no presente estudo, que as ILs 7-5 e 7-5-5 apresentaram uma maior eficiência na incorporação do nitrogênio inorgânico e por sua vez um menor acúmulo de amido ao longo do dia. A forte correlação encontrada no presente estudo, entre o acúmulo de amido e o conteúdo de nitrato, ou seja, quanto menor o acúmulo de amido menor foi o conteúdo de nitrato observado nos tecidos foliares, é um forte indício que o nitrato disponível está sendo incorporado uma vez que o amido não acumula nestas ILs ao longo do dia. (Ono et al., 1996; Sun et al., 2002).

4.4 Análises de componentes principais (ACP) e análise de agrupamento

A análise de componentes principais (ACP) e análise de agrupamento permitiram separar as 66 ILs estudadas em três grupos distintos (Figura 14B e 15). O CP1 da análise de componentes principais demonstrou que a divergência entre as ILs, foi governada por variáveis associadas ao acúmulo de biomassa (MSR, MSH, MSF e MST) e conteúdo de nitrato, enquanto que o CP2 a divergência entre as ILs foi gerida por parâmetros de trocas gasosas (A e g_s). Analisando conjuntamente esses resultados com os obtidos pela análise de agrupamento, verifica-se que as ILs presentes no grupo 2 divergiram do grupo 1 por apresentarem uma maior acúmulo de biomassa e uma alta eficiência na incorporação do NO_3 em moléculas de aminoácidos. Em contrapartida, as ILs constituintes do grupo 1 tiveram o conteúdo de NO_3 e de açúcares como principal integrador. Das vinte e uma linhagens que diferiram do controle (Grupo 2 e 3) os cromossomos 7, 8 e 12 foram os que apresentaram o maior número de sobreposições, potencializando assim a identificação dos possíveis genes envolvidos na alterações fisiológicas e metabólicas encontradas no presente estudo. De forma mais relevante, ambas as análises permitiram identificar a IL-7-5 como uma linhagem de grande potencial a ser explorado. A importância dessa região do cromossomo 7 torna-se ainda mais evidente uma vez que outras duas regiões próximas (IL 7-5-5 e IL 7-4-1) que se sobrepõem apresentaram os mesmos fenótipos. Outro aspecto importante que torna essa região do cromossomo 7 interessante para estudos posteriores é o fato de um QTL para maior rendimento de frutos ter sido encontrado nesta região do genoma de tomate (Eshed e Zamir, 1995).

5. Conclusões

- No presente estudo foram identificados vários QTLs relacionados com parâmetros de trocas gasosas e acúmulo de biomassa, bem como para o conteúdo de alguns metabólitos relacionados com o metabolismo do carbono e do nitrogênio.
- Contatou-se uma alta correlação negativa entre a produção de biomassa e o acúmulo de amido, o que sugere o amido como um metabólito integrador do crescimento vegetativo.
- Verificou-se uma correlação positiva entre o acúmulo de amido e o conteúdo de nitrato o que é um forte indício que o nitrato disponível esta sendo incorporado uma vez que o amido não acumula nestas ILs ao longo do dia.
- Por meio de análises multivariadas, foi possível identificar 21 ILs que diferiram da espécie parental *S. lycopersicum*, dentre estas se destacou a IL 7-5.
- Em virtude de estudos anteriores relatarem um alto rendimento de frutos por parte da IL 7-5, esta região cromossômica torna-se promissora para estudos posteriores de identificação e clonagem de genes envolvidos no controle da respiração e potencialização da fotossíntese em folhas de tomate.

6. Referências

Adachi S, Tsuru Y, Nito N, Murata K, Yamamoto T, Ebitani T, Ookawa T, Hirasawa T (2011) Identification and characterization of genomic regions on chromosomes 4 and 8 that control the rate of photosynthesis in rice leaves. **J Exp Bot** 62: 1927-1938.

Adachi S, Tsuru Y, Nito N, Murata K, Yamamoto T, Ebitani T, Ookawa T, Hirasawa T (2011) Identification and characterization of genomic regions on chromosomes 4 and 8 that control the rate of photosynthesis in rice leaves. **J Exp Bot** 62: 1927-1938.

Araujo WL, Nunes-Nesi A, Osorio S, Usadel B, Fuentes D, Nagy R ; Balbo I, Lehmann M, Studart-Witkowski C, Tohge T, Martinoia E, Jordana X, DaMATTA FM, Fernie, AR (2011) Antisense inhibition of the Iron-Sulphur subunit of Succinate Dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid-Mediated effect on stomatal aperture. **The Plant Cell** 23: 600-627.

Araujo WL, Nunes-Nesi A, Fernie AR (2011) Fumarate: Multiple functions of a simple metabolite. **Phytochemistry** 72: 838 843.

Araujo WL, Nunes-Nesi A, Nikoloski Z (2012) Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. *Plant Cell and Environment* 35: 1-21.

Araus JL, Casadesus JB, Nachit MM, VILLEGAS D, APARICIO N, ROYO C (2000) Some remarks on ecophysiological traits for breeding. *Nouveaux defies Zaragoza;CIHEAM-IAMZ*. 2000. 620.

Author(s): Maruyama S, Tajima K (1990) Leaf conductance in japonica and indica rice varieties .1. Size, frequency, and aperture of stomata. **Jap J Crop Sci** 59: 801-808.

Baker NR, Rosenqvist E (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **J Exp Bot** 55: 1607-1621.

Carrari F, Nunes-Nesi A, Gibon Y, Lytovchenko A, Ehlers Loureiro M, Fernie AR (2003) Reduced expression of aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and marked shifts in carbon partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. **Plant Physiol** 133: 1322–1335.

Chen JI, Popovich K. (2003) Understanding customer relationship (CRM) People, process and technology. **Business Process Management Journal** 9: 672-688.

Cruz CD (2007) **Genes versão 2007**: Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV.

DaMatta FM, Loos RA, Silva EA, Loureiro ME (2002) Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. **Plant Physiol** 159: 975-981.

Eshed Y, Zamir D (1995) An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTLs. **Genetics** 141: 1147–1162.

Esquinas Alcazar JT (1981). Genetic resources of tomatoes and wild relatives. **Genet. Res.** 103: 1–65.

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta** 212: 250-263.

Fernie AR, Martinoia E (2009) Malate: jack of all trades or master of a few?. **Phytochemistry** 70: 828–832.

Fischer RA, Edmeades GO (2010) Breeding and cereal yield progress. **Crop Science** 50: 85-98.

Flood PJ, Harbinson J, Aarts MGM (2011) Natural genetic variation in plant photosynthesis. **Trends in Plant Science** 16: 327-335.

Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD (2000) fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. **Science** 289: 85–88.

Frei M, Tanaka JP, Wissuwa M (2008) Genotypic variation in tolerance to elevated ozone in rice: dissection of distinct genetic factors linked to tolerance mechanisms. **J Exp Bot** 59:3741-3752.

Fridman E, Pleban T, Zamir D (2000) A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 97: 4718–4723.

Fritz C, Palacios-Rojas N, Feil R, Stitt M (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. **Plant Journal** 46: 533-548.

Fuentes D, Meneses M, Nunes-Nesi A (2011) A deficiency in the flavoprotein of arabidopsis mitochondrial complex II results in elevated photosynthesis and better growth in nitrogen-limiting conditions. **Plant Physiol** 157: 1114-1127.

Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Hoehne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: Comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **The Plant Cell** 16: 3304-3325.

Graf A, Schlereth A, Stitt M, et al.(2010) Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 107: 9458-9463.

Gu J, Yin X, Struik PC, Stomph TJ, Wang H (2012) Using chromosome introgression lines to map quantitative trait loci for photosynthesis parameters in rice (*Oryza sativa* L.) leaves under drought and well-watered field conditions. **J Exp Bot** 63: 455-469.

Hachiya T, Terashima I, Noguchi K (2007) Increase in respiratory cost at high growth temperature is attributed to high protein turnover cost in *Petunia x hybrida* petals. **Plant cell and environment** 30: 1269-1283.

Hair JF (1998) Multivariate data analysis. **Upper Saddle River**: Prentice Hall 1: 730.

Hansen BG, Halkier BA, Kliebenstein DJ (2008) Identifying the molecular basis of QTLs: e QTLs add a new dimension. **Trends Plant Sci** 13: 72–77.

Herve D, Fabre F, Berrios EF, et al. (2001) QTL analysis of photosynthesis and water status traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under greenhouse conditions. **J Exp Bot** 52: 1857-1864.

Hunt R (1982) Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis. London: E. Arnold 248.

Ikram S, Bedu M, Daniel-Vedele F (2012) Natural variation of Arabidopsis response to nitrogen availability. **J Exp Bot** 63: 91-105.

Isaacson T, Ronen G, Zamir D, Hirschberg J (2002) Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. **The Plant Cell** 14: 333–342.

Isaacson T, Ronen G, Zamir D, Hirschberg J (2002) Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. **The Plant Cell** 14: 333–342.

Khowaja FS, Price AH (2008) QTL mapping rolling, stomatal conductance and dimension traits of excised leaves in the Bala x Azucena recombinant inbred population of rice. **Field Crops Research** 106: 248-257.

Krömer S (1995) **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio** 46: 45–70
Lafitte HR, Price AH, Courtois B (2004) Yield response to water deficit in an upland rice mapping population: associations among traits and genetic markers. **Theo App Gen** 109: 1237-1246.

Lanceras JC, Pantuwan G, Jongdee B (2004) Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. **Plant Physiol** 135: 384-399.

Lawlor DW (2002) Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. **J Exp Bot** 53: 773–787.

Lawlor DW, Konturri M and Young AT (1989) Photosynthesis by flag leaves of wheat in relation to protein, ribulose biphosphate carboxylase activity and nitrogen supply. **J Exp Bot** 40: 43–52.

Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environ Exp Bot** 47: 239-247.

Liu YS, Gur A, Ronen G, Causse M, Damidaux R, Buret M, Hirschberg J, Zamir D (2003) There is more to fruit colour than candidate carotenoid genes. **Plant Biotechnology Journal** 1: 195–207.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant** 15: 473–497.

Noctor G, Dutilleul C, Lelarge C, et al.(2007) The role of the mitochondrial electron transport chain in photosynthesis, stress responses, and the integration of carbon-nitrogen metabolism. **Photosynthesis research** 91: 259-259.

Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **Plant Journal** 50: 1093–1106.

Nunes-Nesi A, Araujo WL., Fernier AR (2011) Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis. **Plant Physiol** 155: 101-107.

Nunes-Nesi A, Fernie AR, Stitt M (2010) Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. **Molecular Plant** 3: 973-996.

Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A. M., Loureiro, M. E., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J., and Fernie, A. R. (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. **Plant Physiol.** 137: 611–622.

Ohsumi A, Kanemura T, Homma K, et al. (2007) Genotypic variation of stomatal conductance in relation to stomatal density and length in rice (*Oryza sativa* L.) **Plant Product Scien** 10: 322-328.

Ono K, Terashima I, Watanabe A (1996) Interaction between nitrogen deficit of a plant and nitrogen content in the old leaves. **Plant Cell Physiol** 37: 1083–1089.

Piques M, Schulze WX, Höhne M, et al. (2009) Ribosome and transcript copy numbers, polysome occupancy and enzyme dynamics in Arabidopsis. **Mol. Syst Biol** 5: 314.

Pnueli L, Carmel-Goren L, Hareven D, Gutfinger T, Alvarez J, Ganai M, Zamir D, Lifschitz E (1998) The *self-pruning* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. **Development** 125: 1979–1989.

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochim Biophys Acta** 975: 384–394.

Price AH, Young EM, Tomos AD (1997) Quantitative trait loci associated with stomatal conductance, leaf rolling and heading date mapped in upland rice (*Oryza sativa*). **New Phytologist** 137: 83-91.

Rick CM (1979). Potential improvement of tomatoes by controlled introgression of genes from wild species. p. 167-173. In: Proceedings, **Conference on Broadening Genetic Base Crops**, Wageningen.

Rick CM (1978) Conservation of tomato species. **Agric. de las americas** 27: 17-19.

Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J (1999) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. **Plant Journal** 17: 341–351.

Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, et al.(2006) TM4 microarray software suite. **Methods in Enzymology** 411:134-93.

Schauer N, Semel Y, Roessner U (2006) Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. **Nat. Biotechnol** 24: 447–454.

Scheibe R (2004) **Physiol Plant** 120: 21-26.

Scheibe R, Backhausen JE, Emmerlich V, Holtgreffe S (2005) Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. **J Exp Bot** 56: 1481-1489.

Scheible WR, Morcuende R, Czechowski T (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. **Plant Physiol** 136: 2483-2499.

Siedow JN, Day DA (2000) Respiration and photorespiration. **Bioch. and Mol Bio of Plant** 56: 676–728.

Sienkiewicz-Porzucek A, Nunes-Nesi A, Sulpice R, Lisec J, Centeno DC, Carillo P, Leisse A, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR (2008) Mild reductions in mitochondrial citrate synthase activity result in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on photosynthetic performance or growth. **Plant Physiol** 147: 115-127.

Sienkiewicz-Porzucek A, Sulpice R, Osorio S, Krahnert I, Leisse A, UrbanczykWochniak E, Hodges M, Fernie AR, Nunes-Nesi A (2010) Mild reductions in mitochondrial NAD-dependent isocitrate dehydrogenase activity result in altered nitrate assimilation and pigmentation but do not impact growth. **Mol Plant** 3: 156-173.

Smith AM (2012) Starch in the *Arabidopsis* plant. **Starch-starke** 64: 421-434.

Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant cell and environment** 30: 1126-1149.

Stitt M, Sulpice R, Keurentjes J (2010) Metabolic networks: How to identify key components in the regulation of metabolism and growth. **Plant Physiol** 152: 428–444.

Sulpice R, Pyl ET, Ishihara H, et al.(2009) Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 106: 10348-10353.

Sun J, Gibson KM, Kuirats O, Okita TW, Edwards GE (2002) Interactions of nitrate and CO₂ enrichment on growth, carbohydrates, and Rubisco in *Arabidopsis* starch mutants. Significance of starch and hexose. **Plant Physiol** 130: 1573–1583.

Takai T, Ohsumi A, San-oh Y, et al. (2009) Detection of a quantitative trait locus controlling carbon isotope discrimination and its contribution to stomatal conductance in japonica rice. **Theo App Gen** 118: 1401 1410.

Teng S, Qian Q, Zeng D, KunihiroY, Fujimoto K, Huang D, Zhu L (2004) QTL analysis of leaf photosynthetic rate and related physiological traits in rice (*Oryzasativa* L.). **Euphytica** 135: 1-7.

Xu X, Martin B, Comstock JP, Vision TJ, Tauer CG, Zhao B, Pausch RC, Knapp S (2008) Fine mapping a QTL for carbon isotope composition in tomato. **Theor Appl Genet** 117: 221-233.

Yue B, Xiong LZ, Xue WY, et al. (2005) Genetic analysis for drought resistance of rice at reproductive stage in field with different types of soil. **Theo App Gen** 111: 1127-1136.

Zamir D (2001) Improving plant breeding with exotic genetic libraries. **Nature Reviews Genetics** 2: 983-989.

Zhao G, Wang J, Han Y, et al.(2008) Identification of QTL underlying the resistance of soybean to pod borer, *Leguminivora glycinivorella* (Mats.) obraztsov, and correlations with plant, pod and seed traits. **Euphytica** 164: 275-282.