

LUCAS EDUARDO REALTO DA SILVA

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E ECOFISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE CUBIU
(*Solanum sessiliflorum*) SUBMETIDAS A LIMITAÇÃO HÍDRICA**

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*.

Orientador: Wagner L. Araújo

Coorientador: João Henrique F. Cavalcanti

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586r
2022
Silva, Lucas Eduardo Realto da, 1996-
Respostas bioquímicas e ecofisiológicas em plantas de
cubiu (*Solanum sessiliflorum*) submetidas a limitação hídrica /
Lucas Eduardo Realto da Silva. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (49 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Vegetal, 2022.

Referências bibliográficas: f. 44-49.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.284>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Solanum sessiliflorum*. 2. Déficit hídrico. 3. Troca
gasosa. 4. *Solanum sessiliflorum* -Metabolismo. I. Araújo,
Wagner Luiz, 1980-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 583.952

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

LUCAS EDUARDO REALTO DA SILVA

RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E ECOFISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE CUBIU
(*Solanum sessiliflorum*) SUBMETIDAS A LIMITAÇÃO HÍDRICA

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: 17 de fevereiro de 2022

Assentimento:



Lucas Eduardo Realto da Silva

Autor



Wagner L. Araújo
Orientador

AGRADECIMENTOS

Sem dúvida nenhuma, o maior agradecimento é para minha mãe, pai e irmãs pelo apoio em um momento tão importante como este, uma mudança radical de vida, iniciando uma nova trajetória, em uma cidade distante e mesmo assim apoiado por todos eles. Muito obrigado.

A Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Biologia Vegetal – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, por todo suporte prestado sempre que preciso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa e pelo suporte financeiro para a realização dos experimentos e análises aqui descritos.

Aos professores Wagner L. Araújo e João Henrique F. Cavalcanti que estiveram junto a mim nesta caminhada.

Com muito apreço agradeço a Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) e a todos os seus integrantes pelo ótimo acolhimento e novas amizades ali feitas. De forma especial agradeço a Dora que, com toda sua disposição, foi fundamental para realização desta pesquisa e ao professor Adriano Nunes Nesi, sempre ali presente e incentivando os trabalhos.

As novas amizades feitas em Viçosa, vou lembrar de vocês sempre de forma especial. Vocês com certeza têm participação importante nessa etapa da minha vida.

E as amizades antigas de Humaitá, que mesmo de tão longe sempre dão um jeito de se fazerem presentes. Espero logo poder estar junto de vocês e nos divertimos bastante.

RESUMO

REALTO DA SILVA, Lucas Eduardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Respostas Bioquímicas e Ecofisiológicas em Plantas de Cubiu (*Solanum sessiliflorum*) Submetidas a Limitação Hídrica.** Orientador: Wagner Luiz Araújo. Coorientador: João Henrique Frota Cavalcanti.

As mudanças climáticas, cada vez mais explícitas, trazem sérios riscos a agricultura em geral, uma vez que frequentemente são registrados aumentos de temperaturas globais e diminuição, ou até mesmo ausências, de períodos chuvosos. Dessa forma, a busca por materiais que atendam tanto a necessidade de alta produção como também apresente tolerância a situações ambientais desfavoráveis ao desenvolvimento vegetal é cada vez mais demandada para inserção na agricultura. *Solanum sessiliflorum* é uma planta herbácea que possui sistema radicular bem desenvolvido e frutos de características mescladas de tomate e berinjela e com grande potencial para exploração comercial. Outra característica interessante de plantas dessa espécie é que sua base genética é ampla, com grande rusticidade e ainda pouco estudada. Dessa forma, *S. sessiliflorum* é uma excelente candidata para busca de genes que possam ser utilizadas no melhoramento de Solanaceae já consagradas na agricultura ou até mesmo sua própria inserção no mercado. Por essas e outras características, surgiu o interesse de estudar essa espécie que pode servir como rota de escape para driblar a homeostase imposta por sucessivos ciclos de melhoramento genético vegetal em plantas agrícolas, em especial as Solanaceae. Sendo assim, este trabalho buscou caracterizar as respostas ecofisiológicas e bioquímicas de *S. sessiliflorum* submetidas a limitação hídrica e assim ampliar o entendimento do comportamento da cultura em situação de estresse abiótico e futuramente utilizar essas informações em programas de melhoramento e biotecnológicos. A partir das análises realizadas constatou-se que a limitação hídrica afeta processos essenciais como trocas gasosas e metabolismo, alguns em maior magnitude, refletindo principalmente em retardo no desenvolvimento e menor crescimento. No entanto, verificou-se que a reidratação dos tecidos vegetais levou a respostas positivas aos parâmetros avaliados, podendo indicar a não ocorrência de danos severos durante o período de limitação hídrica.

Palavras-Chave: Déficit Hídrico. Solanaceae. Trocas gasosas. Metabolismo primário.

ABSTRACT

REALTO DA SILVA, Lucas Eduardo M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2022. **Biochemical and Ecophysiological Responses in Cubiu (*Solanum sessiliflorum*) Under Water Limitation.** Adviser: Wagner Luiz Araújo. Co-adviser: João Henrique Frota Cavalcanti.

Climate change, increasingly explicit, brings serious risks to agriculture in general, since there are often increases in global temperatures and a decrease, or even absence of rainy periods. In this way the Search for materials that meet both the need for high production and also presents tolerance to unfavorable environmental situations for plant development is increasingly demanded for insertion in agriculture. *Solanum sessiliflorum* is a herbaceous plant that has a well-developed root system and fruits with mixed characteristics of tomato and eggplant and with great potential for commercial exploitation. Another interesting feature of plants of this species is that their genetic base is broad, with great rusticity and still little studied. Thus, *S. sessiliflorum* is na excelente candidate for the search established in agriculture or even its own insertion in the market. Due to these and Other characteristics, the interest arose in studying this species that can serve as an scape route to circumvent the homeostasis imposed by successive cycles of plant genetic improvement in agricultural plants, especially Solanaceae. Therefore, this work sought to characterize the ecophysiological and biochemical response os *S. sessiliflorum* subjected to water limitation and thus expand the understanding of the behavior of the culture in abiotic stress situation and in the future use this information in breeding and biotechnological programs. From the analyzes carried out, it was found that water limitation affects essential processes such as gas Exchange and metabolismo, some to a greater extent reflecting mainly in developmental delay and lower growth. However, it was found that the rehydration of plant tissues led to positive response to the parameters evaluated, which may indicate the non occurrence os severe damage during the period of water limitation.

Keywords: Drought stress. Solanaceae. Gas Exchange. Primary Metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Variação no teor relativo de água (TRA) em plantas de *Solanum sessiliflorum* Etn1 submetidas a limitação hídrica. Plantas foram submetidas a limitação hídrica por nove dias e, em seguida, foram submetidas a reidratação durante cinco dias adicionais. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão (n= 5). Asteriscos indicam diferenças significativas (** \leq 0.01; *** \leq 0.001) pelo teste t comparando com as plantas mantidas hidratadas.22

Figura 2 – Figuras representativas de plantas de *Solanum sessiliflorum* Etn1 submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. **(A)** Crescimento e morfologia de plantas mantidas em condições controle (plena disponibilidade hídrica no solo), durante o período de análises. **(B)** Crescimento e morfologia de plantas mantidas sob limitação hídrica durante nove dias. Após análises e coletas houve reidratação com rápida resposta das plantas. Ao décimo dia já não era possível observar aspectos de murcha nas plantas embora o crescimento tenha sido comprometido.....23

Figura 3 - Variação em parâmetros biométricos em plantas de *Solanum sessiliflorum* Etn1 submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. **(A)** massa fresca; **(B)** massa seca; **(C)** área foliar; **(D)** altura do caule; **(E)** espessura do caule. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de seis plantas. Asteriscos indicam diferença significativa (** \leq 0.01; *** \leq 0.001) pelo teste t comparando plantas hidratadas com plantas que passaram por limitação hídrica de nove dias e receberam água novamente por cinco dias.....24

Figura 4 - Imagens representativas de folhas de *Solanum sessiliflorum* Etn1 submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. **(A)** condições controle; **(B)** mantida durante nove dias em limitação hídrica e reidratada por cinco dias. Numeração indica a ordem de emissão das folhas. Seta indica folha utilizada para análises e coletas.....25

Figura 5 - Variação em parâmetros fotoquímicos em *Solanum sessiliflorum* submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. **(A)** F_v/F_m ; **(B)** F'_v/F'_m ; **(C)** ETR; **(D)** PhiPSII; **(E)** NPQ; **(F)** q_L . Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de seis repetições biológicas. Os asteriscos indicam diferença significativa (* \leq 0.5; ** \leq 0.01; *** \leq 0.001) pelo Teste t comparando plantas hidratadas e plantas com limitação hídrica e posterior reidratação.....27

Figura 6 - Variação nos parâmetros de trocas gasosas em *Solanum sessiliflorum* Etn 1 submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. **(A)** Fotossíntese líquida; **(B)** condutância estomática; **(C)** concentração interna de CO₂. Valores foram obtidos em resposta a limitação hídrica durante nove dias e posterior reidratação por cinco dias. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de seis repetições. Os

asteriscos indicam diferença significativa ($*\leq 0.5$; $**\leq 0.01$; $***\leq 0.001$) pelo *Teste t* comparando plantas controle com tratamentos.....29

Figura 7 - Curvas de resposta da fotossíntese líquida (A_N) a concentração subestomática de CO_2 (C_i) em *Solanum sessiliflorum* submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. Valores representam as médias de 6 repetições. Foram analisados: Plantas no início do experimento, ou seja, dia 0 (**A**); Fim do ciclo de limitação hídrica (**B**); Plantas após 6 dias de reidratação (círculo aberto) (**C**).....31

Figura 8 - Variação no conteúdo de pigmentos em *Solanum sessiliflorum* Etn1 submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. (**A**) Clorofila a; (**B**) Clorofila b; (**C**) Clorofila a+b; (**D**) Carotenoides; (**E**) Clorofila a/b. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de cinco repetições. Os asteriscos indicam diferença significativa ($*\leq 0.5$; $**\leq 0.01$; $***\leq 0.001$) pelo *Teste t* comparando plantas hidratadas com plantas que passaram por limitação hídrica de nove dias e receberam água novamente por cinco dias.33

Figura 9 – Níveis foliares de carboidratos ao meio do dia em plantas de *Solanum sessiliflorum* Etn1 submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. (**A**) Glicose; (**B**) frutose; (**C**) sacarose e (**D**) amido. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de cinco repetições. Os asteriscos indicam diferença significativa ($*\leq 0.5$; $**\leq 0.01$) pelo teste *t* comparando plantas hidratadas (controle) com plantas que passaram por limitação hídrica de nove dias e receberam água novamente por cinco dias.....34

Figura 10 – Níveis foliares de metabólitos em plantas *Solanum sessiliflorum* Etn1 durante o período de privação hídrica e reidratação. (A) níveis de aminoácidos, (B) proteínas e (C) malato. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de cinco repetições. Os asteriscos indicam diferença significativa ($*\leq 0.5$; $**\leq 0.01$) pelo teste *t* comparando plantas hidratadas (controle) com plantas que passaram por limitação hídrica de nove dias e receberam água novamente por cinco dias.35

Figura 11 – Variação nos níveis foliares de fenóis totais em plantas de *Solanum sessiliflorum* Etn1 durante o período de privação hídrica e reidratação. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de cinco repetições. O asterisco indica diferença significativa ($**\leq 0.01$) pelo teste *t* comparando plantas hidratadas (controle) com plantas que passaram por limitação hídrica de nove dias e receberam água novamente por cinco dias.36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A_N = taxa de assimilação líquida de CO_2

aa = aminoácidos

ABA = ácido abscísico

ATP = adenosina trifosfato

ADP = adenosina difosfato

Chl *a* = clorofila *a*

Chl *b* = clorofila *b*

C_i = concentração interna de CO_2

Etn = etnovariedades

ETR = taxa de transporte de elétrons

F_o = fluorescência inicial

F_m = fluorescência máxima

F_v = fluorescência variável

F_v/F_m = eficiência fotoquímica máxima do PSII

F_v'/F_m' = eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do PSII

g_s = condutância estomática

MF = massa fresca

MT = massa turgida

MS = massa seca

NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

$NADP^+$ = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado

NPQ = quenching não fotoquímico – extinção não fotoquímica

P_i = fosfato inorgânico

PSI = fotossistema 1

PSII = fotossistema 2

Q_A = quinona A

q_L = extinção fotoquímica

EROs = espécies reativas de oxigênio

TRA = teor relativo de água

WT = wild type (tipo selvagem)

ϕ_{PSII} ou Φ_{PSII} = rendimento quântico do transporte de elétrons.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	17
2.2. Parâmetros morfológicos	18
2.2.1 Teor relativo de água.....	18
2.2.2 Análises biométricas.....	18
2.3. Parâmetros de fluorescência e trocas gasosas.....	18
2.4. Avaliação dos metabólitos primários	19
2.5. Delineamento experimental e análise estatística	20
3. RESULTADOS	21
3.1. Análises fenotípicas e biométricas	21
3.2. Avaliações fotoquímicas e de trocas gasosas.....	26
3.3. Determinação de pigmentos	32
3.4. Análises bioquímicas.....	33
4. DISCUSSÃO.....	37
4.1. A limitação hídrica impôs efeitos negativos a assimilação de CO ₂ refletindo em menor acúmulo de biomassa.....	37
4.2. A limitação hídrica promove desequilíbrios entre a captação da luz e sua utilização em <i>S. sessiliflorum</i>	38
4.3. Alterações metabólicas frente a limitação hídrica e reidratação em <i>S. sessiliflorum</i>	40
5. CONCLUSÃO	43
6. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

A agricultura moderna é, atualmente, baseada em um modelo de produção que necessita de tecnologia tendo em vista um aumento populacional para 10 bilhões de pessoas até a metade deste século (Relatório das Nações Unidas, 2017). Neste contexto, a utilização eficiente dos principais insumos, como fertilizantes e água, é indispensável para que se obtenha uma produção adequada. Não obstante, o uso crescente destes insumos tem culminado em danos significativos no ecossistema (RAMANKUTTY *et al.*, 2018). Portanto, faz-se necessário o uso de novas ferramentas biotecnológicas para o aumento da eficiência agrônômica. Neste caso, programas de melhoramento genético são fundamentais para que as culturas agrícolas tornem-se cada vez mais produtivas e eficientes no uso dos recursos disponíveis. Com efeito, não somente a busca por insumos ou tecnologias para melhorar as práticas agrícolas são importantes para o aumento da produtividade de alimentos mas também a identificação de materiais mais tolerantes a estresses (a)bióticos é de suma importância.

Fatores ambientais, como longos períodos de estiagem, afetam negativamente o crescimento e produtividade vegetal. Adicionalmente, o emprego de irrigação em larga escala ameaça os recursos hídricos disponíveis para consumo humano além de induzir a salinização em alguns sistemas de cultivo. Assim, colocando em risco, em última instância, a produção de alimentos e o suprimento de água para a população. Com efeito, períodos de secas vem aumentando em frequência e se espalhando em áreas agrícolas anteriormente não afetadas, tornando a irrigação uma prática agrônômica cada vez mais insustentável. Neste contexto, há uma necessidade imperiosa de se desenvolver variedades que sejam mais produtivas em uma ampla gama de ambientes e mais resilientes à condições de crescimento fora de faixas ideais (GOJON *et al.*, 2022; NOWICKA *et al.*, 2018).

A deficiência hídrica é um fator limitante para a produtividade em geral, pois compromete processos importantes incluindo fotossíntese, respiração, processos associados e partição de carboidratos (MARTINS *et al.*, 2018). Assim, apesar de todas as inovações agrícolas, a disponibilidade e utilização eficiente de água ainda se destacam pela sua importância. Apesar dos esforços em busca de materiais cada vez mais eficientes no uso de recursos hídricos, as cultivares de espécies importantes ainda são pouco eficientes no uso da água, tendo uma alta relação entre volume de

H₂O transpirado por grama de carbono fixado pela planta. Assim, com a população mundial cada vez maior, áreas agricultáveis cada vez mais escassas e períodos de seca cada vez maiores, a busca por culturas produtivas e melhor utilização da água disponível se torna fundamental (NOWICKA *et al.*, 2018).

Embora a deficiência hídrica seja um estresse multidimensional que afeta diversos processos, com o intuito de minimizar os efeitos desse fator ambiental na produtividade, as plantas realizam ajustes morfológicos, fisiológicos e metabólicos (LISAR *et al.*, 2012). Desta forma, entender como a seca impacta o crescimento, desenvolvimento e produtividade de plantas é de extrema importância. Ademais, a estratégia de avaliar os efeitos ambientais (e.g. seca), tendo em vista mudanças neste cenário, permite melhor explorar o potencial produtivo dos materiais (VIVAS *et al.*, 2019). Neste contexto, selecionar materiais genéticos mais eficientes no uso da água e tolerantes a seca apresenta-se como uma importante e adequada ferramenta para minimizar os impactos da deficiência hídrica na produtividade, particularmente em determinados locais de plantio sujeitos a flutuações frequentes na disponibilidade hídrica (TARDIEU *et al.*, 2018). Diante das mudanças climáticas globais, incluindo temperaturas cada vez mais elevadas, derretimento das reservas de gelo, aumento no nível dos mares, os eventos de seca ou inexistência de períodos chuvosos em algumas regiões são os que mais preocupam a agricultura em geral (LIMA *et al.*, 2021). Registre-se, ainda, que as mudanças climáticas globais aumentam a frequência com que condições de seca severa vem sendo estabelecidas em regiões agricultáveis (BASU *et al.*, 2016). Assim, déficit hídrico tornou-se o fator ambiental mais prejudicial a produtividade vegetal, podendo afetar tanto cultivos comerciais quanto vegetações nativas.

Períodos de seca alteram processos fisiológicos e isso pode refletir em consequências negativas no crescimento, desenvolvimento e sobrevivência das plantas. Dentre os vários processos bioquímicos afetados pelo déficit hídrico, a diminuição da fotossíntese (SPERLICH *et al.*, 2016), mudanças em relações hídricas (YOUSFI *et al.*, 2016), redução da divisão e expansão celular (CLAUW *et al.*, 2016), síntese de ácido abscísico (ABA) (DU *et al.*, 2018;) e acúmulo e partição de açúcares (SRIVASTAVA *et al.*, 2017) desempenham, em conjunto ou isoladamente, papel fundamental na redução da produtividade. Não obstante, ao longo da evolução as plantas desenvolveram mecanismos de driblar a dificuldade de encontrar água

disponível para sua absorção, desenvolvendo assim distintas formas de tolerar períodos de limitação hídrica. Esta capacidade pode derivar tanto da adaptação quanto da aclimatação a condição estressante. Ambos os termos indicam um aumento na tolerância embora a diferença esteja na causa do aumento da tolerância. Assim, aclimatação sugere que um estresse anterior e de curto prazo causou determinada alteração, enquanto que adaptação a tolerância é determinada por alterações no genoma e deriva de processos de seleção que ocorreram ao longo de gerações (LOMBARDINI e ROSSI, 2019).

No que diz respeito ao melhoramento de plantas, existe a constante busca por uma cultura agrícola geneticamente melhorada que seja capaz tanto de atender necessidades de alta produção como também apresente alta tolerância as adversidades ambientais a períodos de limitação hídrica. Neste contexto, a busca por culturas agrícolas otimizadas tanto para produtividade como para resistência a períodos maiores de limitação hídrica tem se tornado foco importante de pesquisas (NOWICKA *et al.*, 2018).

A domesticação “*de novo*” com o uso de espécies silvestres ou não domesticadas têm sido utilizada para desenvolver culturas agrícolas com maior tolerância a estresses em geral (GASPARINI *et al.*, 2021). Desta forma, *Solanum sessiliflorum*, popularmente conhecida como cubiu, atrai grande interesse na busca pelo entendimento do seu comportamento frente a imposição de adversidades. Trata-se de uma planta pertencente à família Solanaceae, que possui sistema radicular muito bem desenvolvido e robusto, folhas grandes e floração entre o quarto e quinto mês após germinação (SILVA FILHO *et al.*, 2013). Adicionalmente, cubiu possui base genética ampla e apresenta frutos com características nutracêuticas de interesse ao mercado. Registre-se, ainda, que por se tratar de uma espécie pouco estudada cujo comportamento ecofisiológico segue sobremodo desconhecido e, portanto, estudos envolvendo essa espécie apresentam-se como uma excelente oportunidade para obtenção de dados que possam ajudar a solucionar problemas futuros na agricultura, tanto na utilização do próprio cubiu como na utilização e transferência de suas características para outras espécies de interesse (e.g., tomate - *S. lycopersicum*).

Em cubiu, suas etnovarietades (Etn), como são conhecidas, apresentam características morfológicas que as diferenciam desde formato do fruto até arquitetura da planta. De modo geral, *S. sessiliflorum* é uma planta herbácea, um arbusto semi-

lenhoso que pode atingir 2 dois metros de altura em espaços abertos (DUARTE, 2011), de alta ocorrência na região da América do Sul e que apresenta potencial para introdução na agricultura (VARGAS-MUÑOS e KUROZAWA, 2020) com boa adaptação em clima quente e úmido com temperaturas e torno de 18°C a 30°C e em solos ácidos de baixa fertilidade ou também em alcalinos de alta fertilidade (PIRES *et al.*, 2006). O florescimento geralmente perdura por quase a totalidade do ano, indicando que não interferência da duração do dia (DUARTE E PAULL, 2015) e, uma vez iniciada a floração, a mesma se mantém durante toda a vida da planta embora com intensidades diferentes. Seu início dá-se após o quarto mês após a germinação (SILVA FILHO, 2005), a colheita após 6 a 8 meses em condições de campo sendo que o tempo entre a antese e a maturação leva em torno de 100 dias (DUARTE E PAULL, 2015).

Nativa da bacia amazônica, esta espécie é também conhecida por diversos nomes populares, incluindo cocona, tomate de índio, ou tomate pêssego. Seu fruto, semelhante ao tomate, é indicado para a alimentação humana, sendo considerado de boa qualidade nutricional por conter quantidades consideráveis de nutrientes como fibras, proteínas, minerais e compostos antioxidantes naturais como os carotenoides (SERENO *et al.*, 2018). Ademais, dentre seus ativos já caracterizados encontram-se cálcio, ferro, fósforo, magnésio, potássio, zinco e vitamina C (PIRES *et al.*, 2006). Seus frutos podem ser consumidos tanto *in natura* quanto em formas processadas como geleias, doces, molhos, sucos e outros (MORENO *et al.*, 2015).

Trata-se de uma planta cujo a polinização majoritária é autógama no entanto a alogamia ocorre com frequência (PAIVA, 1999), sendo uma planta diplóide (2n) com 24 cromossomos (BRUCHER 1968). Sua seleção e domesticação ocorreu através de seleção de características ligadas ao fruto como: frutos maiores, melhor sabor e também características ligadas a planta como um todo como: resistência a nematoides e plantas sem espinhos (DUARTE E PAULL, 2015). Neste contexto, seria sobremodo interessante para a agricultura que se aprofundasse o conhecimento sobre *S. sessiliflorum* com o intuito de explorar seu potencial e, talvez, aplicar o conhecimento obtido em demais culturas de interesse econômico. Com efeito, isso culminaria em plantas mais produtivas e menor custo de produção.

Portanto, para verificar se as plantas de cubiu toleram situações de limitada disponibilidade hídrica e entender os mecanismos envolvidos em uma eventual

tolerância a seca, o presente trabalho teve por objetivo investigar a influência da reduzida disponibilidade hídrica em parâmetros bioquímicos e ecofisiológicos em plantas de cubiu (*S. sessiliflorum*). Para tanto, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, perfil metabólico bem como possíveis indicadores de tolerância de *S. sessiliflorum* ao déficit hídrico foram determinados, tanto em período de limitação hídrica como também em reidratação. Os resultados obtidos indicam que houve interferência da limitação hídrica nos parâmetros avaliados, que podem ser observados como prevenção à perda de água pela diminuição de transpiração, menor acúmulo de massa devido à menor assimilação de CO₂, aliado a ajustes metabólicos envolvendo a mobilização de energia e funcionamento de processos fotoquímicos como proteção a danos oxidativos aos fotossistemas. Tomados em conjuntos, os resultados alcançados iniciam o entendimento dos mecanismos utilizados por plantas de cubiu para suportar períodos secos e que tais mecanismos podem trazer grandes conhecimentos futuros com abordagens cada vez mais específicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi conduzido em Viçosa (20°45'S, 42°54'W, 650 m altitude), Minas Gerais, Brasil. A espécie *S. sessiliflorum* D. Etnovariedade 1 (Etn 1) foi propagada através de sementes gentilmente cedidas pelo pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) Danilo Fernandes Silva Filho. As sementes foram germinadas em sementeiras e transplantadas para vasos com capacidade para 5,5 litros aos 11 dias após a germinação em substrato comercial Tropstrato HT[®], adequado para o cultivo de solanaceaeas com adubação de 10 gramas de N-P-K 10-10-10. Até o início da aplicação do tratamento todas as plantas foram irrigadas periodicamente formando assim plantas totalmente uniformes para a continuidade do experimento que se iniciou aos 68 dias após geminação. Neste momento, todas as plantas já demonstravam o surgimento do nono primórdio foliar.

Os tratamentos foram constituídos de plantas controle, com disponibilidade hídrica constante, e plantas que passaram por um período de escassez hídrica, até que recebessem novamente água para reidratação, alcançando sua completa recuperação. Os efeitos da limitação hídrica foram acompanhados pelo monitoramento da diminuição da taxa fotossintética das plantas até que as plantas tratadas apresentassem fotossíntese entre 0% a 5% do valor obtido no primeiro dia das análises para só então realizar a reidratação das plantas e o acompanhamento de suas respostas.

Amostras de tecido foliar foram coletadas ao longo do experimento sendo o horário de coleta definido na metade do período luminoso do dia, na tentativa de investigar a dinâmica das alterações metabólicas em plantas submetidas pela privação hídrica e posterior recuperação. Para tanto, amostras foram coletadas quando a fotossíntese das plantas estressadas apresentavam níveis de redução na faixa de 35%, 75% e 95% quando comparadas as plantas controle. De maneira semelhante, os pontos de coleta após a reidratação quando as plantas apresentavam 25%, 64% e 100% da fotossíntese das plantas controle. O material coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até posterior análises. Cabe mencionar que, por se tratar de experimento de limitação hídrica que afeta o status hídrico da planta, as amostras foram liofilizadas antes das análises de

quantificação de metabólitos. Após cada coleta foliar para análises metabólicas, as plantas foram descartadas para evitar interferência nos resultados, uma vez que a cada coleta a folha e a planta são danificadas. Assim, cada repetição usada para análises metabólicas foi composta por uma planta intacta.

2.2. Parâmetros morfológicos

2.2.1 Teor relativo de água

Para determinação do status hídrico das plantas, a metodologia de Barrs e Weatherley (1962) foi utilizada. Para tanto, foram coletados 20 discos foliares de 5 mm de cada repetição, repetições essas que são também as que foram coletadas para análises metabólicas. Logo após a coleta, foi aferido o peso dos discos em balança analítica obtendo assim o valor de massa fresca (MF). Em seguida, os discos foram embebidos em água por quatro horas para obtenção de massa túrgida (MT). Por fim, os discos foram colocados em estufa de ventilação forçada a 70 °C por 72 horas para aferição de sua massa seca (MS). Assim, o teor relativo de água foi calculado seguindo a seguinte equação:

$$TRA (\%) = \frac{MF - MS}{MT - MS} \times 100$$

2.2.2 Análises biométricas

Durante todos os dias de experimento, o comprimento e a espessura do caule foram aferidos com auxílio de régua (60 cm) e paquímetro digital afim de se observar a dinâmica de expansão e/ou paralisação do crescimento em relação a falta de água. O comprimento do caule foi determinado do solo até ápice caulinar. Ao final do experimento, as plantas foram seccionadas em caule, folhas e raiz e suas massas frescas obtidas. Após, as partes seccionadas passaram por estufa de circulação de ar forçada a 70 °C até atingirem massa constante e assim obtido a massa seca de cada parte da planta.

A área foliar foi, também, determinada através de fotografias usando o software ImageJ (SCHNEIDER *et al.*, 2012).

2.3. Parâmetros de fluorescência e trocas gasosas

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada utilizando-se o “Photosynthesis Yield Analyzer” (MINI-PAM, Walz) para parâmetros realizados na ausência de luz e um analisador de gases a infravermelho (Li 6400XT, Li-Cor, Lincoln, EUA) para avaliação tanto de parâmetros na presença de luz quanto de trocas gasosas. Após as plantas serem adaptados ao escuro, por no mínimo 30 minutos, tecidos foliares foram inicialmente expostos a um fraco pulso de luz vermelho-distante ($0,03 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) para a determinação da fluorescência inicial (F_0). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, foi aplicado para estimar-se a fluorescência m\u00e1xima emitida (F_m). Em adi\u00e7\u00e3o, a efici\u00eancia fotoqu\u00edmica m\u00e1xima do PSII (F_v/F_m), o rendimento qu\u00e2ntico do transporte de el\u00e9trons (Φ_{PSII}), a efici\u00eancia de captura de energia de excita\u00e7\u00e3o pelos centros de rea\u00e7\u00e3o abertos do PSII (F_v'/F_m'), os coeficientes de extin\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica (q_L) e n\u00e3o-fotoqu\u00edmica (NPQ) e a taxa de transporte de el\u00e9trons (ETR) foram estimados (DAMATTA *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2002; BAKER, 2008; MURCHIE e LAWSON, 2013).

A taxa fotossint\u00e9tica l\u00edquida (A_N), concentra\u00e7\u00e3o interna de CO_2 (C_i) e condut\u00e2ncia estom\u00e1tica (g_s) foram analisadas diariamente, de forma pontual, utilizando-se o mesmo analisador de gases acima mencionado e configurado para luz saturante ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com 90% de luz vermelha e 10% de luz azul e concentra\u00e7\u00e3o refer\u00eancia de CO_2 em 400 ppm. As respostas de A \u00e0 concentra\u00e7\u00e3o interna de CO_2 (curva A/C_i) foram determinadas a $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, um valor saturante, mas n\u00e3o fotoinibit\u00f3rio, variando-se a concentra\u00e7\u00e3o de CO_2 ambiente (C_a) de 50 a $1600 \mu\text{mol mol}^{-1}$.

2.4. Avalia\u00e7\u00e3o dos metab\u00f3litos prim\u00e1rios

Para an\u00e1lises de metab\u00f3litos foram coletados fragmentos foliares pertencentes a sexta folha, emitida pela planta durante seu desenvolvimento, de plantas intactas em fun\u00e7\u00e3o da redu\u00e7\u00e3o da taxa fotossint\u00e9tica, par\u00e2metro este utilizado como refer\u00eancia para realiza\u00e7\u00e3o da coleta. Cada amostra foi composta por cinco repeti\u00e7\u00f5es t\u00e9cnicas formadas a partir de tr\u00eas plantas. Ao in\u00edcio do experimento, foram coletadas as amostras do status metab\u00f3lico sem interfer\u00eancia da defici\u00eancia h\u00eddrica, e a medida que o d\u00e9ficit h\u00eddrico foi avan\u00e7ando, novas amostras foram coletadas de acordo com o par\u00e2metro fotossint\u00e9tico apresentado pelas plantas. Amostras foram ent\u00e3o coletadas em plantas cuja valor de A representava 100% de fotoss\u00edntese; entre

70% e 60% da fotossíntese; entre 30% e 20% da fotossíntese; 0% e 5% da fotossíntese, valores obtidos ao longo da limitação hídrica. Ao atingir parâmetros fotossintéticos muito baixos as plantas foram reidratadas para avaliar sua performance quanto ao seu potencial de se recuperar das condições extremas a qual estavam expostas. Desta forma, novas amostras foram coletadas um dia após sua reidratação e outras até que a taxa fotossintética retornasse a valores iniciais (antes da imposição do estresse). Tais amostras foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e acondicionadas em ultrafreezer. Posteriormente, essas amostras foram liofilizadas e em seguida maceradas em moinho de bolas para as análises metabólicas.

O material foi submetido a extração metanólica para obtenção das frações solúveis e insolúveis para posterior análise dos metabólitos primários (adaptado de LISEC *et al.*, 2006). Metanol 100% foi adicionado a aproximadamente 10 mg de material liofilizado seguido de agitação vigorosa e, posteriormente, levado a agitação por 20 minutos em 80 °C. Feito isso, o extrato foi submetido a centrifugação à 9500 g em 4 °C por 10 minutos. Uma parte da fração solúvel foi então destinada a análise de clorofilas *a*, *b*, e carotenoides (PORRA *et al.*, 1989). O restante do sobrenadante foi recolhido e adicionado clorofórmio 100% e ao fim de mais uma etapa de centrifugação o sobrenadante foi recolhido para análises de glicose, frutose, sacarose (FERNIE *et al.*, 2001), aminoácidos totais (CROSS *et al.*, 2006), fenóis totais, malato (NUNES-NESI *et al.*, 2007) e o pellet foi usado para quantificação de proteínas solúveis totais (BRADFORD *et al.*, 1976) e amido (FERNIE *et al.*, 2001).

2.5. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo Teste *t* de *Student* a 5%, 1% e 0.1% de significância ($*\leq 0.05$, $**\leq 0.01$, $***\leq 0.001$) com a utilização do software R Studio. Para fins de comparação, o teste sempre comparou plantas plenamente hidratadas com as plantas em limitação hídrica ou reidratadas. Cada comparação feita para o dia do tratamento em questão, tendo-se assim dados independentes, o que possibilita a utilização do teste. As análises ecofisiológicas foram realizadas com seis repetições para cada tratamento ao passo que as análises de metabolismo utilizaram cinco repetições.

3. RESULTADOS

3.1. Análises fenotípicas e biométricas

O status hídrico das plantas de *S. sessiliflorum* foi acompanhado ao longo do período de privação hídrica pela determinação do teor relativo de água (TRA). Foi possível observar que, ao longo de 9 dias sob limitação hídrica, as plantas de *S. sessiliflorum* tiveram seu status hídrico foliar severamente afetados, alcançando valores inferiores a 50% (Figura 1). Em adição, um dia após a disponibilidade de água ser restaurada, as plantas restabeleceram o status hídrico foliar similar ao observado em plantas controle (Figura 1). Ao quarto dia após a imposição da limitação hídrica foi possível observar uma redução considerável no TRA em que as plantas em estresse apresentavam 73% TRA em comparação com plantas controle com 88% TRA (Figura 1). Ao nono dia, a diferença entre as médias foi ainda maior, com a maior restrição hídrica sendo observado TRA igual a 43%. Neste mesmo dia, a recuperação pós estresse foi realizada pela adição de água no substrato das plantas. A partir deste momento, o TRA das plantas reidratadas elevou rapidamente alcançando valores próximos a 82% TRA sem mais diferenças entre as plantas que permaneceram em plena disponibilidade hídrica (Figura 1).

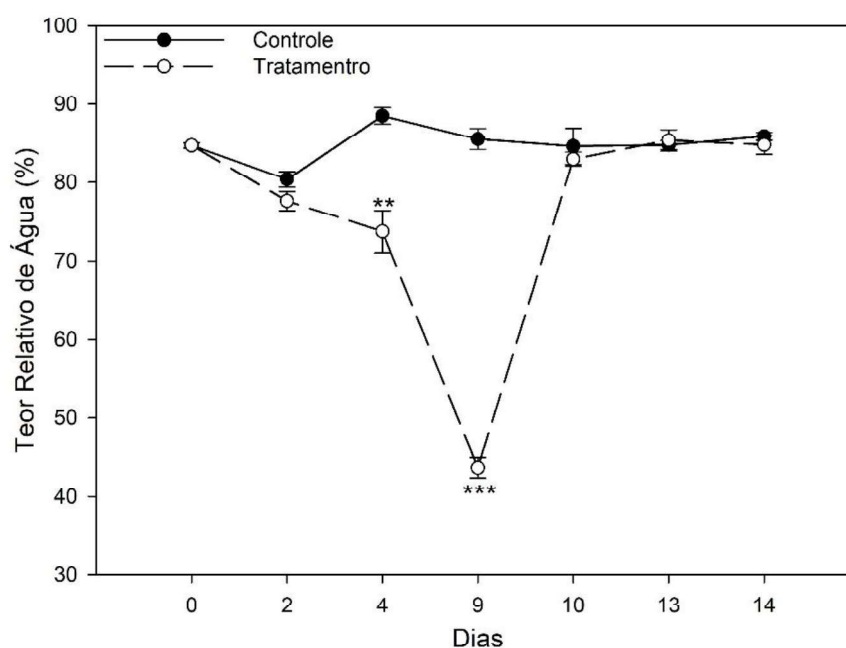


Figura 1 - Variação no teor relativo de água (TRA) em plantas de *Solanum sessiliflorum* Etn1 submetidas a limitação hídrica. Plantas foram submetidas a limitação hídrica por nove dias e, em seguida, foram submetidas a reidratação durante cinco dias adicionais. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão (n= 5). Asteriscos indicam diferenças significativas (** \leq 0.01; *** \leq 0.001) pelo teste t comparando com as plantas mantidas hidratadas.

A partir do quarto dia, as plantas sob limitação hídrica apresentaram murcha severa, efeito este revertido logo após a reidratação (Figura 2). De maneira geral, foi possível notar que a murcha foliar foi marcante do quarto ao nono dia de experimento, afetando inclusive o aspecto visual das plantas (Figura 2B). Já do décimo dia em diante, em função da reidratação, o aspecto de murcha foliar não foi mais aparente. Ao final do experimento (décimo quarto dia) foi possível notar também que plantas que passaram por limitação hídrica (Figura 2B) apresentaram menor tamanho quando comparadas as plantas controle (Figura 2A).

Dentre diversos fatores afetados pela limitação hídrica, a expansão e divisão celular certamente sofreram consequências como pode ser observado no fenótipo das plantas em resposta a limitação hídrica nas avaliações dos parâmetros biométricos (Figura 3). Com efeito, a partir de avaliações morfológicas e biométricas, ficam evidente as diferenças entre os tratamentos, considerando que, ao início do experimento todas as repetições usadas, eram bastante homogêneas.

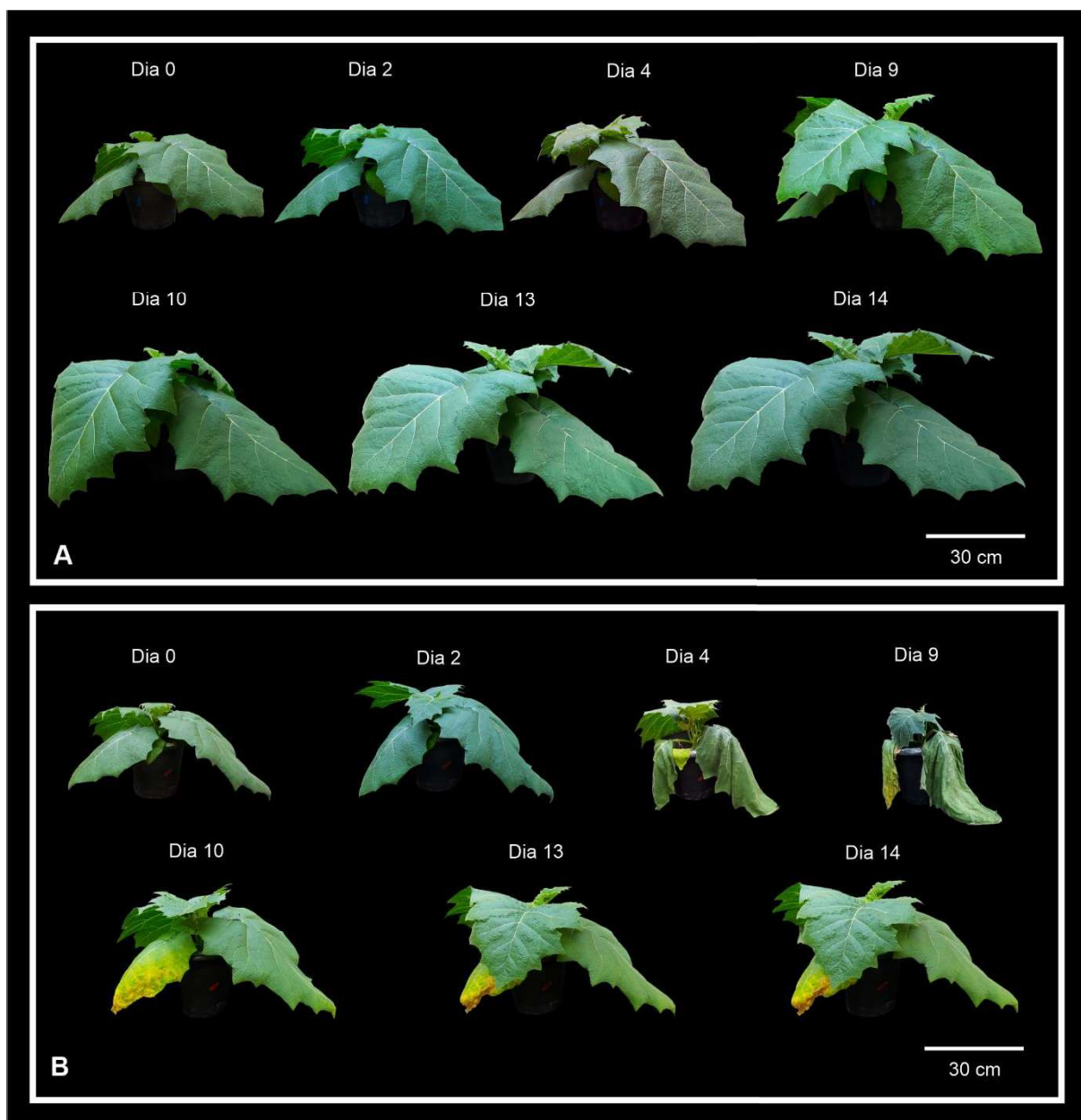


Figura 2 – Figuras representativas de plantas de *Solanum sessiliflorum* Etn1 submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. (A) Crescimento e morfologia de plantas mantidas em condições controle (plena disponibilidade hídrica no solo), durante o período de análises. (B) Crescimento e morfologia de plantas mantidas sob limitação hídrica durante nove dias. Após análises e coletas houve reidratação com rápida resposta das plantas. Ao décimo dia já não era possível observar aspectos de murcha nas plantas embora o crescimento tenha sido comprometido.

Em consonância com a diminuição no crescimento, massas (fresca e seca), área foliar e crescimento do caule foram também afetados (Figura 3). Cabe mencionar que tanto massa fresca quanto massa seca foram analisadas ao fim do experimento, momento no qual as plantas foram seccionadas em folhas, caule e raiz (Figura 3A e 3B). Tanto massa fresca como seca apresentaram reduções significativas quando

comparada a plantas controle, demonstrando o impacto do período de limitação hídrica no acúmulo de biomassa. Em relação a caule e raízes, observou-se também reduções significativas em plantas submetidas à limitação hídrica (Figura 3A e 3B).

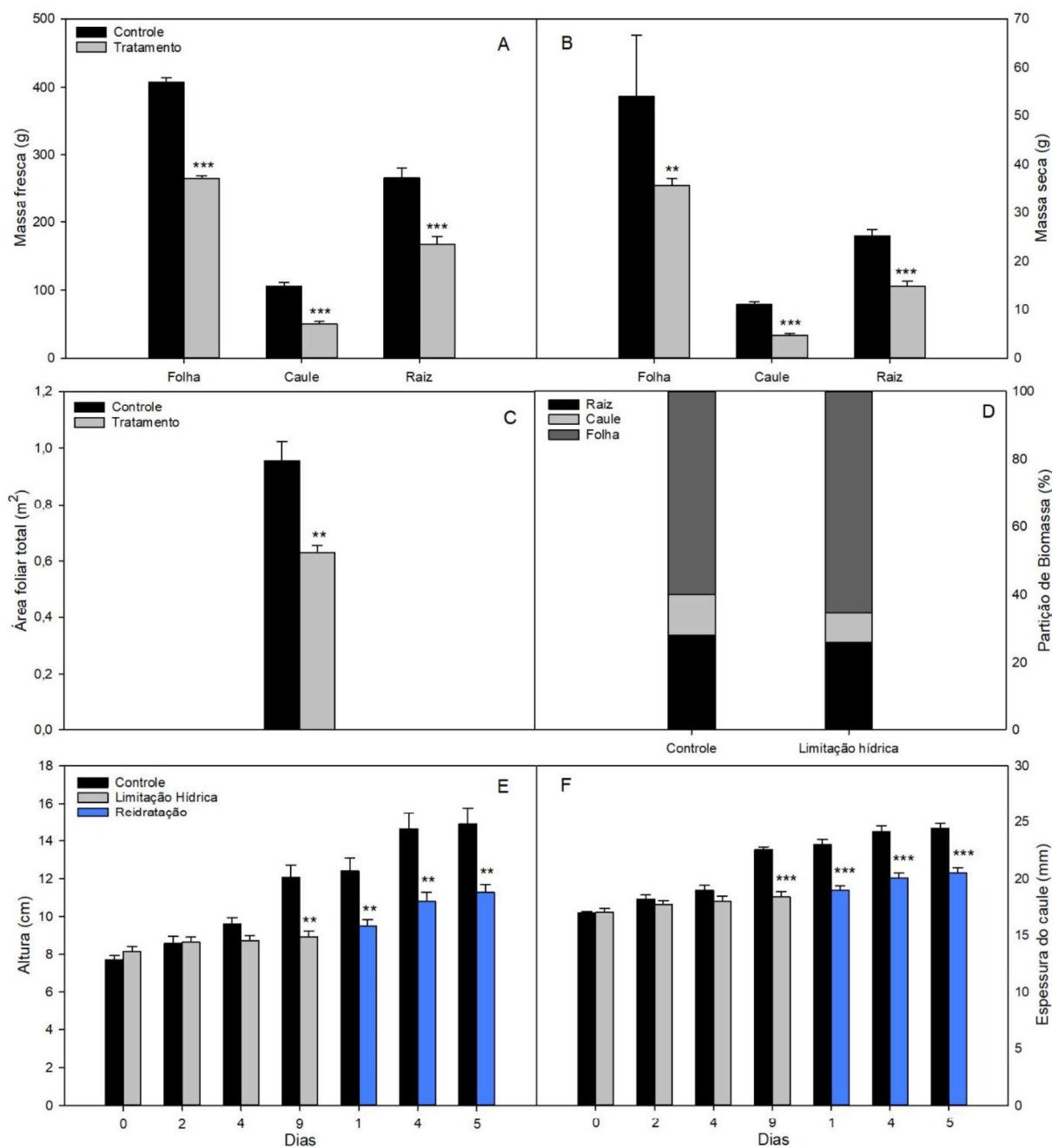


Figura 3 - Variação em parâmetros biométricos em plantas de *Solanum sessiliflorum* Etn1 submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. (A) massa fresca; (B) massa seca; (C) área foliar; (D) altura do caule; (E) espessura do caule. Os valores são apresentados como média ± erro padrão de seis plantas. Asteriscos indicam diferença significativa (** ≤ 0.01; *** ≤ 0.001) pelo teste *t* comparando plantas hidratadas com plantas que passaram por limitação hídrica de nove dias e receberam água novamente por cinco dias.

Todas as plantas controle apresentaram o mesmo número (onze) de folhas por planta (Figura 4A), ao passo que em plantas que passaram por limitação hídrica e reidratação cada planta esse total foi de dez folhas (Figura 4B). Visivelmente, as folhas de plantas controle possuíam maior tamanho. Isso foi comprovado através da área foliar total, significativamente menor em plantas em condições de limitação hídrica e posterior recuperação (Figura 3C).

O crescimento do caule foi também afetado devido a limitação hídrica, como demonstrado pela manutenção da altura e espessura do caule praticamente estagnados durante esse período (Figura 3D e 3E). Todavia, diferenças estatísticas foram observadas somente ao nono dia. A reidratação das plantas resultou em resposta positiva e o caule voltou a se expandir. No entanto, o período de avaliação da reidratação não foi suficiente para que os valores se assemelhassem aos observados em plantas controle (Figura 3D e 3E).

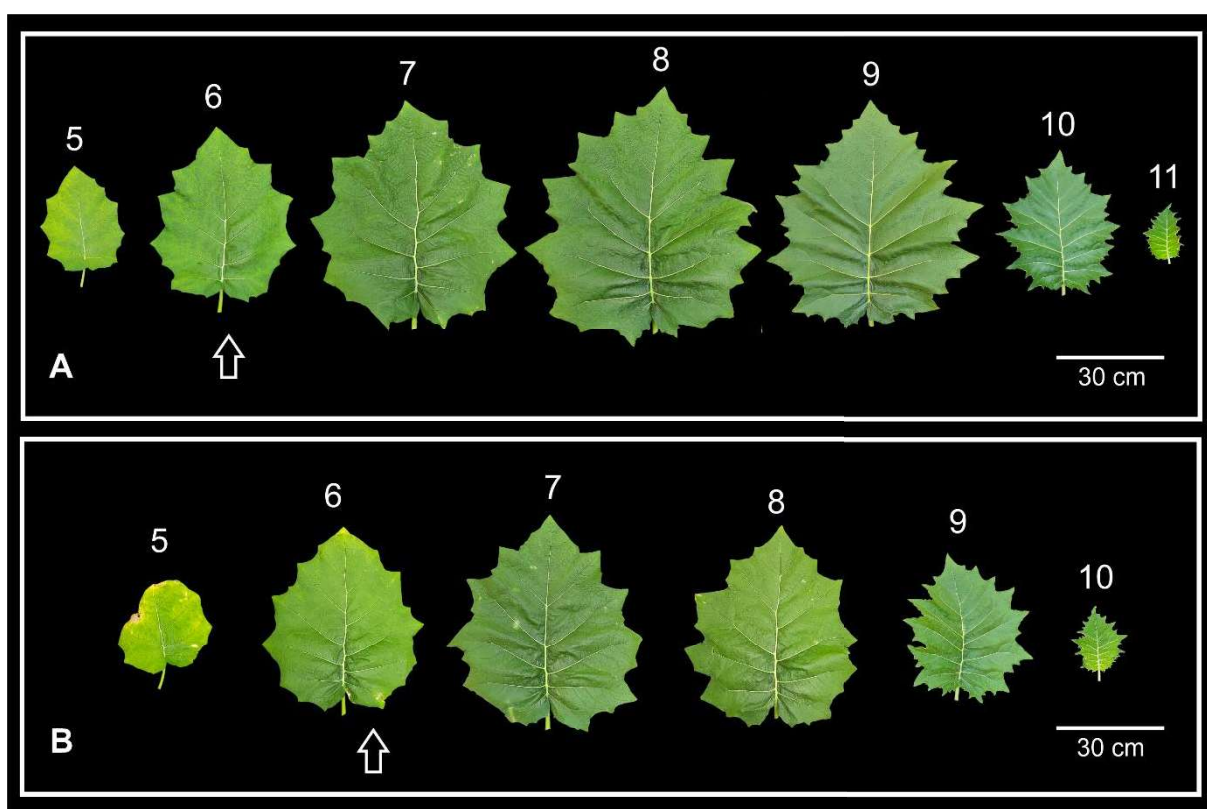


Figura 4 - Imagens representativas de folhas de *Solanum sessiliflorum* Etn1submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. **(A)** condições controle; **(B)** mantida durante nove dias em limitação hídrica e reidratada por cinco dias. Numeração indica a ordem de emissão das folhas. Seta indica folha utilizada para análises e coletas.

3.2. Avaliações fotoquímicas e de trocas gasosas

Ao investigar a flutuação nos parâmetros fotoquímicos durante o período de análises em função dos tratamentos aplicados observou-se pequenas alterações nos dias iniciais de limitação hídrica e, assim, menor média foi obtida no nono dia de limitação, para a máxima eficiência quântica do PSII (F_v/F_m), que trata da máxima eficiência deste fotossistema em absorver luz e utilizá-la para redução da quinona A (Q_A) na cadeia de transporte de elétrons entre os fotossistemas. No entanto, com a reidratação, esse parâmetro respondeu positivamente alcançando valores similares entre tratamentos ao fim do experimento (Figura 5A). Por outro lado, F_v'/F_m' , que fornece uma estimativa da eficiência máxima do PSII para o fluxo de fótons fotossinteticamente ativos em centros de reações do PSII abertos, ou seja, Q_A oxidada, foi mais alterado em função do avanço da limitação hídrica com retorno a valores semelhantes à plantas controle com a reidratação (Figura 5B).

A eficiência operacional do PSII (Φ_{PSII}) sofreu grande variação nos dias mais críticos de limitação hídrica. No entanto, o reestabelecimento a valores iniciais foi alcançado após reidratação (Figura 5D), indicando a não ocorrência de danos, ou pelo menos, a ausência de danos irreversíveis nas estruturas do PSII e seu fluxo de elétrons. Um fator adicional que corrobora com isso é a variação similar observada para taxa de transporte de elétrons ao longo do experimento (Figura 5C), indicando que, embora o transporte de elétrons tenha sido afetado, o mesmo foi reestabelecido à medida em que houve a recuperação da eficiência do PSII em absorver luz.

Em relação às taxas de extinção de energia de excitação das clorofilas, cabe ressaltar que tais extinções podem ocorrer em menor ou maior proporção trabalhando de maneira concorrente, alimentando o fluxo fotoquímico e/ou como proteção para o PSII em caso de absorção de energia excessiva. Com efeito, estas taxas reagiram de maneira esperada à limitação hídrica. Neste contexto, foi possível observar que, a partir do quarto dia de limitação hídrica, a extinção não fotoquímica da energia de excitação das clorofilas na forma de calor não é capaz de suportar a carga de trabalho e, então, esse mecanismo de proteção do aparato fotossintético entra em ação dissipando o excesso de energia luminosa absorvida na forma de calor (Figura 5E). O inverso aconteceu com q_L (Figura 5F), já que este trata da extinção fotoquímica da

energia. A partir do segundo dia de limitação hídrica essa rota sofreu reduções chegando ao seu mínimo de operação ao nono dia de limitação hídrica e retornando a sua atividade máxima ao quinto dia de reidratação.

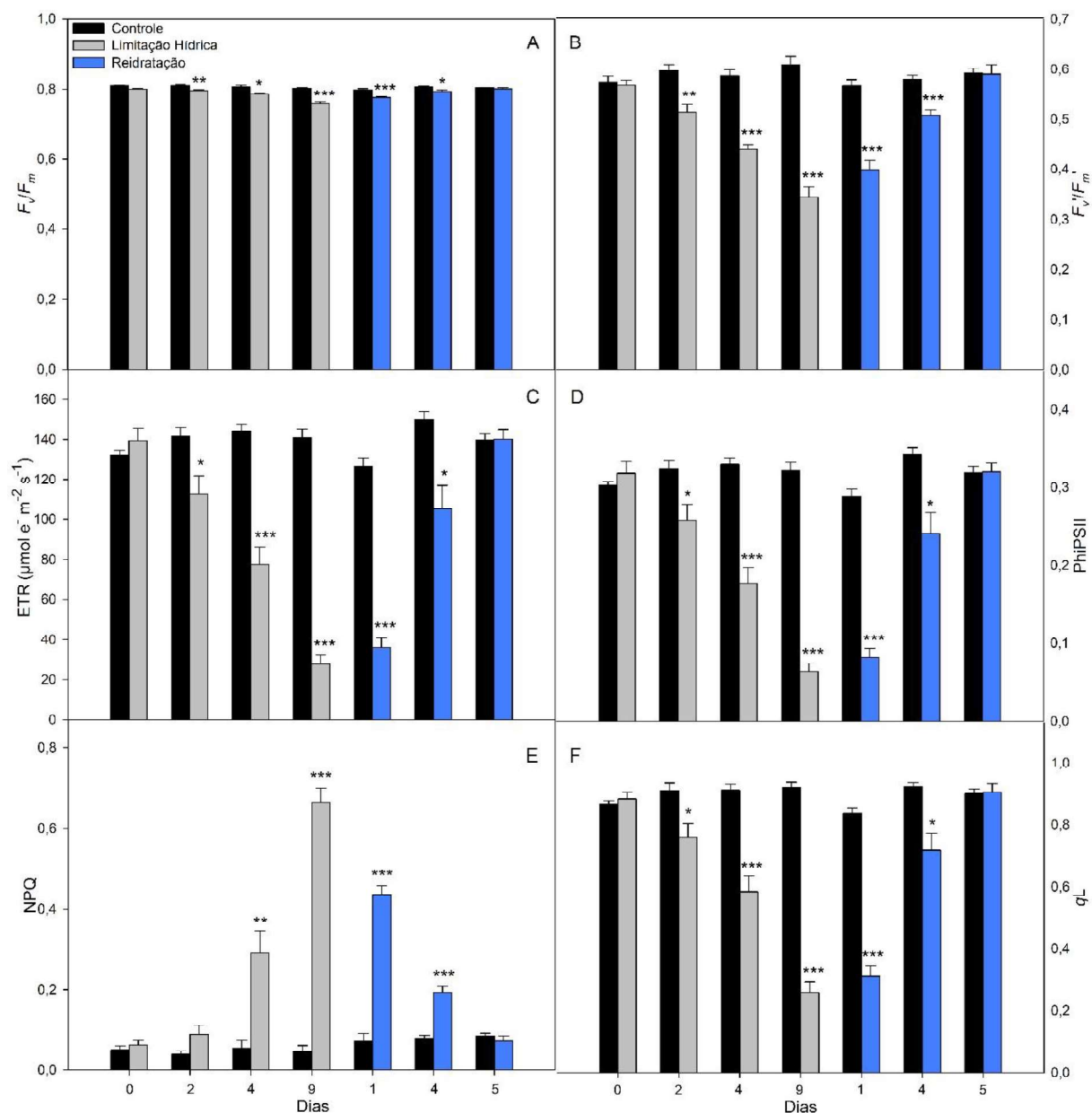


Figura 5 - Variação em parâmetros fotoquímicos em *Solanum sessiliflorum* submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. (A) F_v/F_m ; (B) $F_v'/F'm'$; (C) ETR; (D) PhiPSII; (E) NPQ; (F) q_L . Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de seis repetições biológicas. Os asteriscos indicam diferença significativa ($* \leq 0.05$; $** \leq 0.01$; $*** \leq 0.001$) pelo Teste *t* comparando plantas hidratadas e plantas com limitação hídrica e posterior reidratação..

Em função da importância da taxa fotossintética para um adequado crescimento e desenvolvimento vegetal, os parâmetros de trocas gasosas foram avaliados. A fotossíntese líquida (A_N), variável de referência para coletas para análises

metabólicas, sofreu reduções significativas com a limitação hídrica (Figura 6A). Tal parâmetro foi reduzido gradativamente ao passo que a o TRA era cada vez menor, chegando ao seu valor crítico (\sim zero) no nono dia de análise (Figura 6A). Neste ponto, com $A_N \sim 0$, a extensão da limitação hídrica por período maior não seria uma alternativa adequada pois, com a fotossíntese líquida atingindo valores negativos, significaria a perda de carbono já fixado, o que ocasionaria cenários muito desfavoráveis a retomada do crescimento após a reidratação. Por isso, logo após a aferição desse parâmetro ao nono dia houve a reidratação

Ao décimo dia de experimento (primeiro dia de reidratação), A_N apresentou os primeiros sinais de recuperação alcançando 35% do valor inicial, percentual esse que continuou aumentando em função do tempo. Ao quinto dia após reidratação não mais se observaram diferenças entre os tratamentos, indicando assim sua completa retomada.

A condutância estomática (g_s) respondeu de maneira similar a A_N , o que é compreensível, em função da necessária entrada de CO_2 pelo poro estomático (figura 6B). Assim, g_s respondeu à falta de água no solo, mantendo-se cada vez menor e diminuindo à medida que a limitação hídrica aumentava. Tal característica pode estar aparentemente ligada a prevenção da planta contra a falta de água. Registre-se, também, que, assim como houve diminuição ao longo da limitação hídrica, houve também a retomada ao longo da reidratação.

A concentração interna de CO_2 (C_i) foi significativamente reduzida ao longo da limitação hídrica, diferença essa presente durante o restante do experimento (Figura 6C). Com efeito, C_i não se reestabeleceu após a retomada da irrigação, como observado em relação aos demais parâmetros analisados anteriormente.

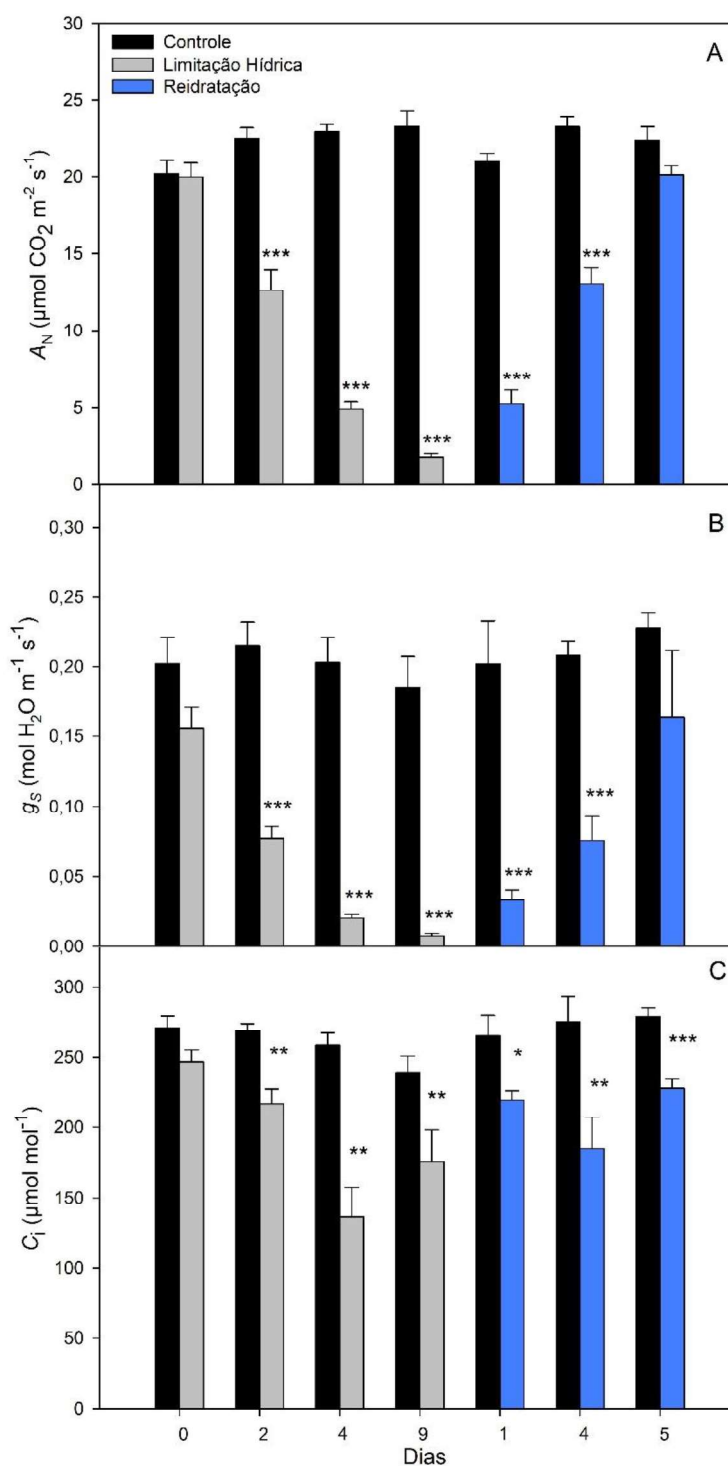


Figura 6 - Variação nos parâmetros de trocas gasosas em *Solanum sessiliflorum* Etn 1 submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. (A) Fotossíntese líquida (A_N); (B) condutância estomática (g_s); (C) concentração interna de CO_2 (C_i). Valores foram obtidos em resposta a limitação hídrica durante nove dias e posterior reidratação por cinco dias. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de seis repetições. Os asteriscos indicam diferença significativa (* ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.01 ; *** ≤ 0.001) pelo *Teste t* comparando plantas controle com tratamentos.

Com o intuito de se caracterizar fotossinteticamente os impactos da limitação hídrica em cubiu investigaram-se a resposta da A_N à concentração interna de CO_2 (curvas A_N/C_i). Os dados de curvas A_N/C_i foram obtidos antes da aplicação do estresse, ao fim do ciclo de limitação hídrica e ao final do experimento após as plantas serem reidratadas a fim de avaliar, em momentos distintos, os impactos da limitação hídrica em cubiu (Figura 7). As curvas A_N/C_i apresentaram comportamento muito semelhante, independente da disponibilidade hídrica, tendo na fase inicial uma inclinação bem acentuada e, na porção final, onde as limitações são devidas à taxa de transporte de elétrons e pelo uso das trioses fosfato, as mesmas foram relativamente atenuadas (Figura 7). Foi possível observar que a A_N responde a incrementos em C_i de forma acentuada, alcançando valores de $35 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e logo após uma leve queda com o aumento de C_i . Ao fim do ciclo de limitação hídrica, nota-se o aumento da A_N como já havia ocorrido (Figura 6); no entanto, A_N alcança valores de $41 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e mantém-se estabilizada, mesmo com aumento de C_i . Por outro lado, em resposta à limitação hídrica menor A_N foram observadas. Ao final do experimento, ou seja, plantas recuperadas da limitação hídrica a qual tinham sido expostas, foi possível observar que houve recuperação de A_N com o aumento em C_i , alcançando valores semelhantes entre os tratamentos, sendo que A_N satura em $46 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com C_i em $750 \mu\text{mol mol}^{-1}$ em plantas controle e em $41 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com C_i em $600 \mu\text{mol mol}^{-1}$ nas plantas que passaram pela recuperação após limitação hídrica.

É perceptível que, em função do seu crescimento e desenvolvimento, as plantas controle saturavam-se a concentrações de C_i cada vez menores (Figura 7A, $1400 \mu\text{mol mol}^{-1}$; Figura 7B, $1100 \mu\text{mol mol}^{-1}$; Figura 7C, $900 \mu\text{mol mol}^{-1}$). Registre-se também que com C_i entre $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ a A_N atinge sua máxima taxa e valores acima disso não causam benefícios a A_N , mas sim potencialmente sua diminuição.

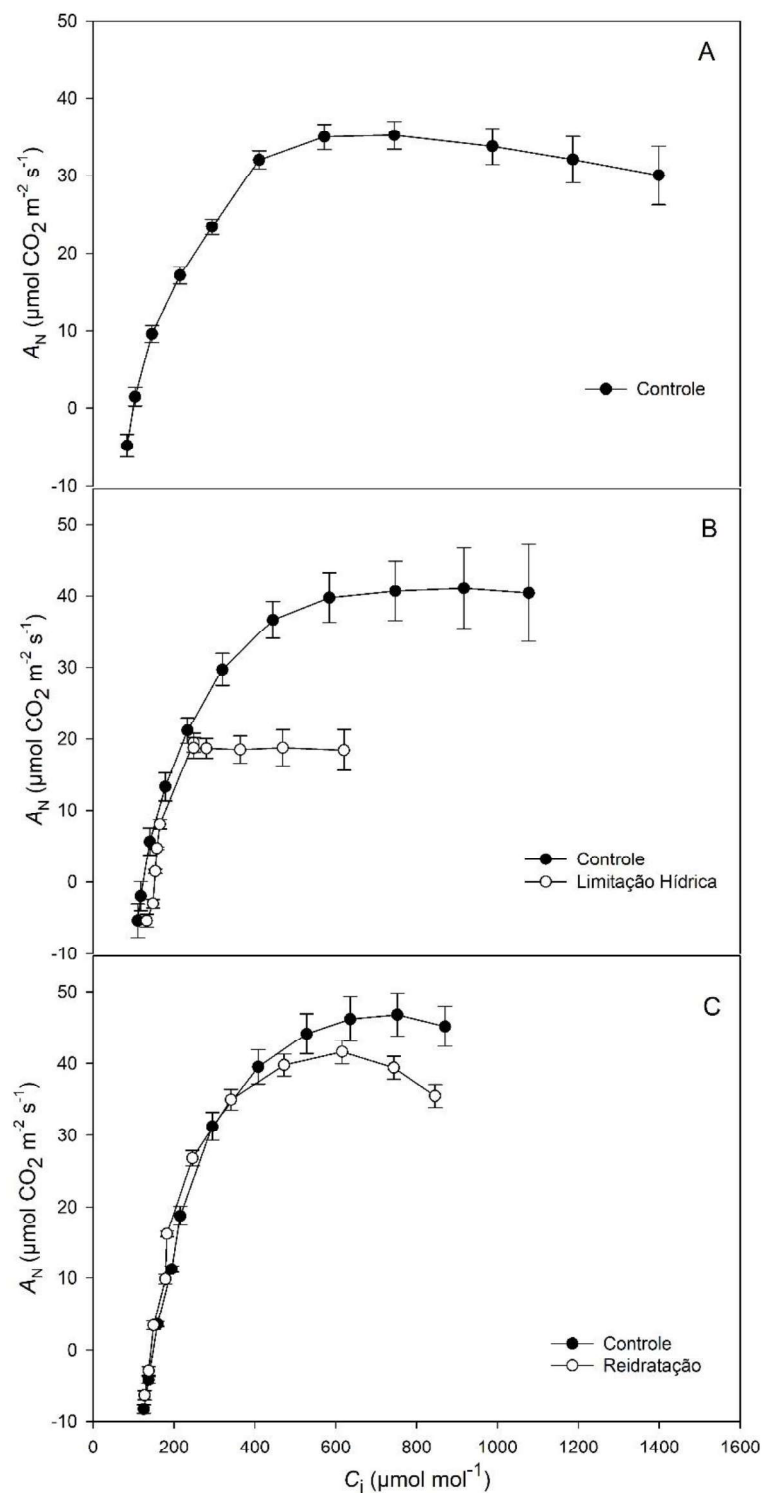


Figura 7 - Curvas de resposta da fotossíntese líquida (A_N) a concentração subestomática de CO_2 (C_i) em *Solanum sessiliflorum* submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. Valores representam as médias de 6 repetições. Foram analisados: Plantas no início do experimento, ou seja, dia 0 (A); Fim do ciclo de limitação hídrica (B); Plantas após 6 dias de reidratação (círculo aberto) (C).

3.3. Determinação de pigmentos

Buscando-se investigar as alterações metabólicas causadas pela limitação hídrica, produtos do metabolismo primário (e.g. pigmentos, carboidratos, proteínas/aminoácidos) foram mensurados. Tanto clorofila *a* e clorofila *b* como carotenoides foram significativamente menores em plantas estressadas ao nono dia de tratamento. No entanto, ao quinto dia de reidratação, as plantas reidratadas apresentaram maiores conteúdos destes pigmentos em comparação com as plantas controle (Figura 8). Registre-se também que independente dessas variações, não se observaram variações na razão entre clorofila *a* e clorofila *b* (Figura 8E).

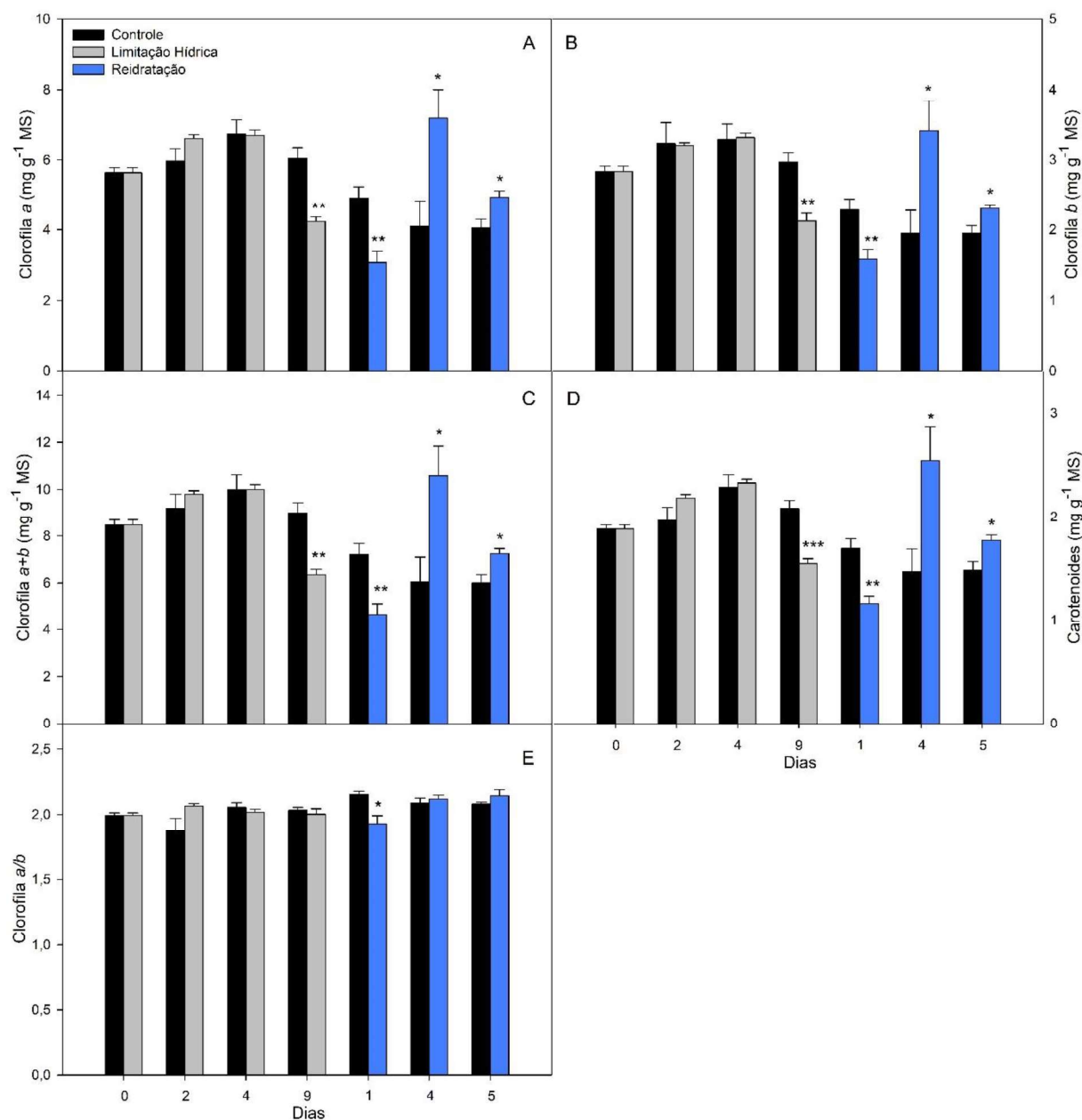


Figura 8 - Variação no conteúdo de pigmentos em *Solanum sessiliflorum* Etn1 submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. (A) Clorofila a; (B) Clorofila b; (C) Clorofila total (a+b); (D) Carotenoides; (E) razão clorofila a/b. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de cinco repetições. Os asteriscos indicam diferença significativa ($*\leq 0.5$; $**\leq 0.01$; $***\leq 0.001$) pelo Teste *t* comparando plantas hidratadas com plantas que passaram por limitação hídrica de nove dias e receberam água novamente por cinco dias.

3.4. Análises bioquímicas

A concentração de glicose foi maior em plantas que passaram pela limitação hídrica e continuou assim mesmo após a reidratação, observando um elevado aumento na concentração de glicose nas plantas controle no último dia de análises ultrapassando, pela primeira vez, valores observados em plantas após a reidratação

(Figura 9A). Os níveis de frutose foram significativamente maiores em plantas submetidas a limitação hídrica apenas do segundo ao nono dia de limitação hídrica, sendo similar entre plantas controle e após a reidratação (Figura 9B).

Os níveis de sacarose sofreram pequena variação ao longo do experimento (Figura 9C); por outro lado, os níveis de amido foram drasticamente reduzidos em função do avanço da limitação hídrica; apesar disso, a reidratação culminou em aumentos consideráveis nos níveis de sacarose (Figura 9D).

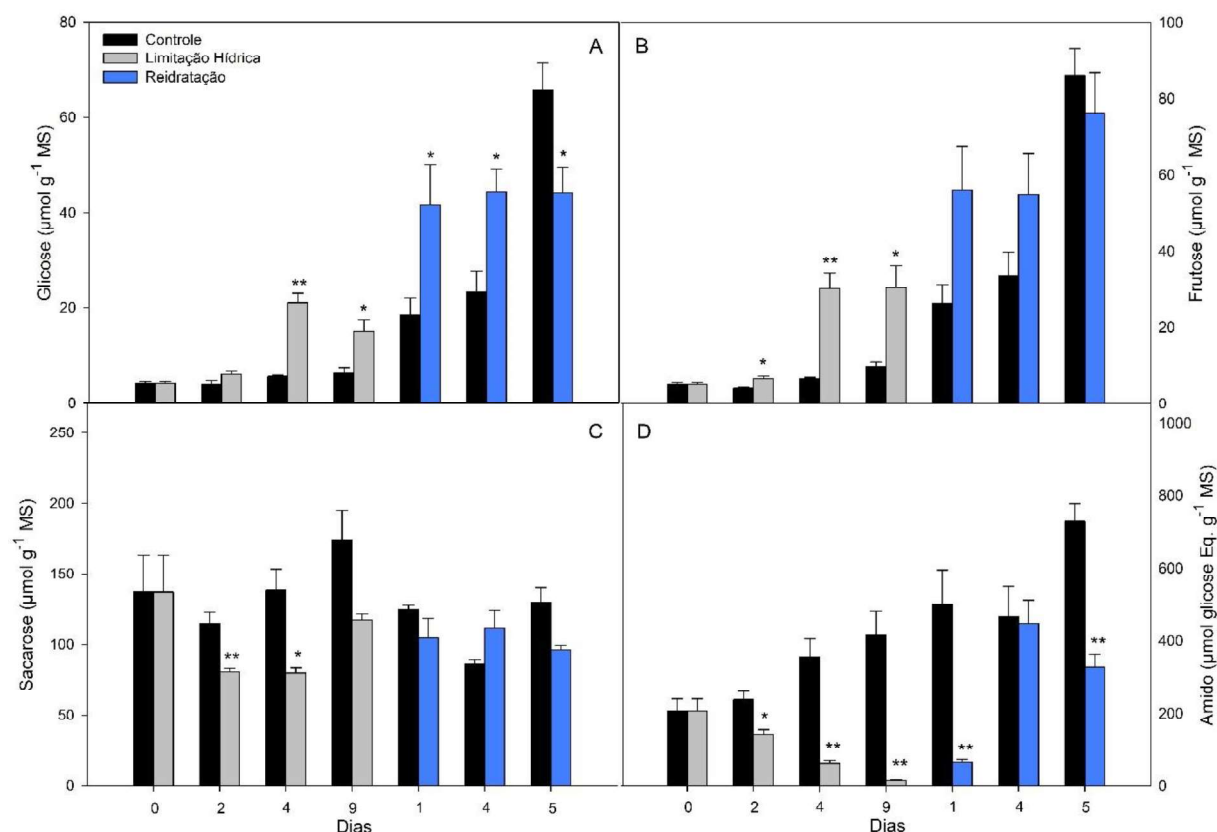


Figura 9 – Níveis foliares de carboidratos ao meio do dia em plantas de *Solanum sessiliflorum* Etn1 submetidas a privação hídrica seguida de reidratação. (A) Glicose; (B) frutose; (C) sacarose e (D) amido. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de cinco repetições. Os asteriscos indicam diferença significativa ($*\leq 0.5$; $**\leq 0.01$) pelo teste *t* comparando plantas hidratadas (controle) com plantas que passaram por limitação hídrica de nove dias e receberam água novamente por cinco dias.

No que se refere ao conteúdo de aminoácidos, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos durante todo o período de análises, seja em limitação hídrica ou reidratação (Figura 10A). Em relação ao nível de proteínas, diferenças somente foram observadas em dois momentos (Figura 10B). Plantas aos nove dias sob limitação hídrica apresentaram reduzido conteúdo de proteínas quando comparadas às plantas controle, enquanto após quatro dias de reidratação, estas

apresentaram conteúdo superior às plantas controle. Já os níveis de malato apresentaram variações significativas em apenas três dias do experimento, apresentando elevado conteúdo no quarto dia de limitação hídrica e também ao quarto e quinto dias de reidratação (Figura 10C).

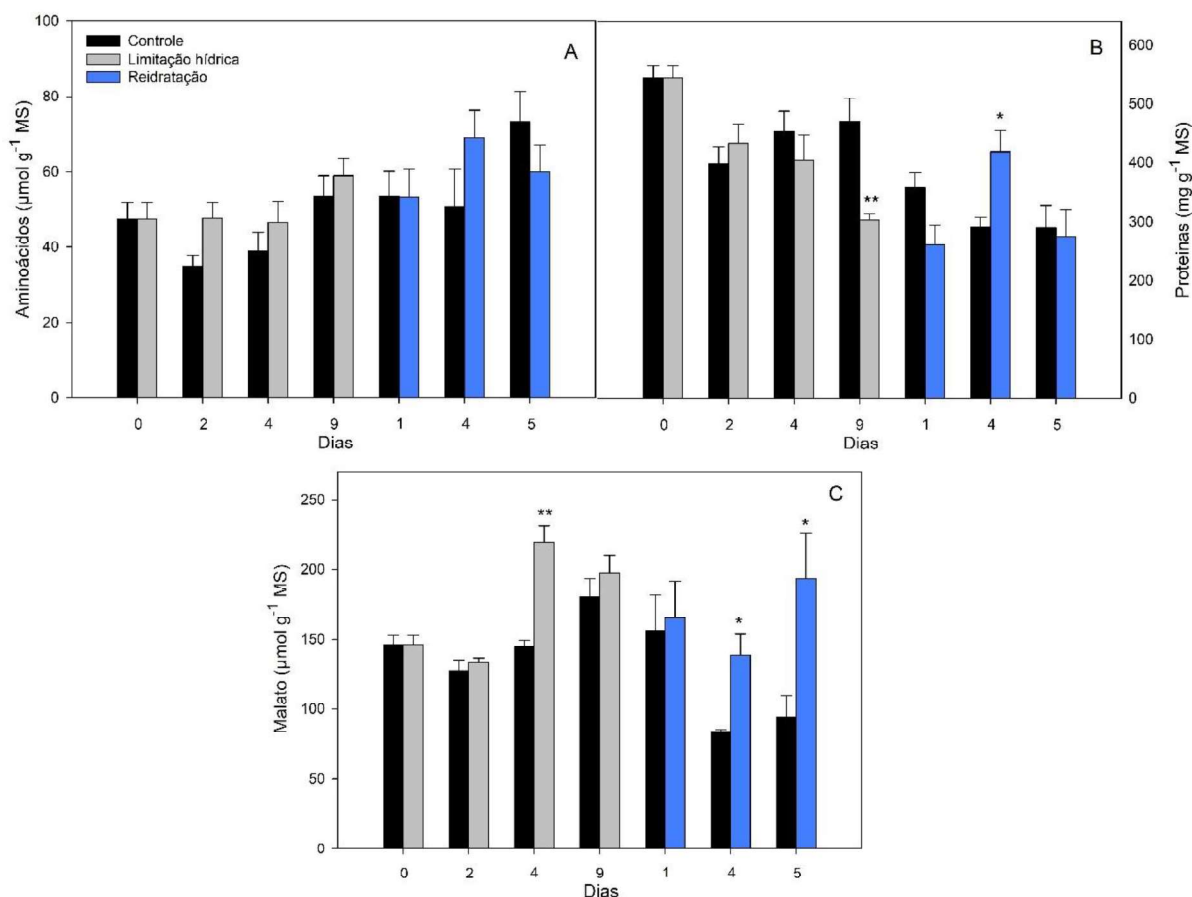


Figura 10 – Níveis foliares de metabólitos em plantas *Solanum sessiliflorum* Etn1 durante o período de privação hídrica e reidratação. (A) níveis de aminoácidos, (B) proteínas e (C) malato. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de cinco repetições. Os asteriscos indicam diferença significativa ($*\leq 0.05$; $**\leq 0.01$) pelo teste *t* comparando plantas hidratadas (controle) com plantas que passaram por limitação hídrica de nove dias e receberam água novamente por cinco dias.

Os fenóis totais, geralmente produzidos em respostas às pressões ecológicas, sofreram pequena variação com a limitação hídrica, tendo apresentado um significativo incremento no dia mais severo de limitação hídrica (Figura 11), incremento este que foi em torno de 50% do apresentada pelas plantas controle.

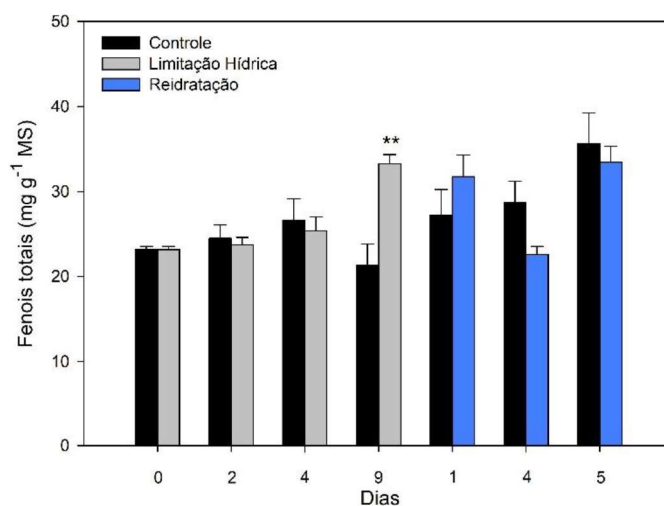


Figura 11 – Variação nos níveis foliares de fenóis totais em plantas de *Solanum sessiliflorum* *Etn1* durante o período de privação hídrica e reidratação. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de cinco repetições. O asterisco indica diferença significativa (** ≤ 0.01) pelo teste *t* comparando plantas hidratadas (controle) com plantas que passaram por limitação hídrica de nove dias e receberam água novamente por cinco dias.

4. DISCUSSÃO

4.1. A limitação hídrica impôs efeitos negativos a assimilação de CO₂ refletindo em menor acúmulo de biomassa

A limitação hídrica ou a manipulação da disponibilidade hídrica de uma planta culminam em respostas diversas que estão ligadas aos processos biológicos naturais, caracterizando-se assim como fator de estresse multidimensional (LISAR *et al.*, 2012). Com efeito, as respostas aqui obtidas reforçam a complexidade na avaliação que tal estresse impõe. Plantas de *S. sessiliflorum* submetidas a limitação hídrica apresentaram reduções diárias em A_N (Figura 6A) em consonância com reduções do TRA (Figura 1) até que valores mínimos extremos ($A_N \sim 0$) fossem observados aos nove dias de restrição hídrica e a reidratação fosse então realizada. Em estudo semelhante utilizando *S. lycopersicum*, plantas da cultivar M82 suportaram a limitação hídrica por oito dias alcançando valores de A próximo a zero e, após reidratação, levaram cinco dias para reestabelecimento (OMENA-GARCIA *et al.*, 2018), como aqui observado. Tais resultados reforçam a ideia que cubiu, espécie silvestre e pouco ou nada melhorada, possa ser utilizada na transferência de suas características para outras espécies de interesse, incluindo o tomateiro.

A redução em A_N está, possivelmente, associada as reduções observada também em g_s (Figura 6B), uma vez que quanto menor o influxo de CO₂ menor a quantidade de substrato disponível para RuBisCO. Mecanismos de sinalização envolvendo hormônio vegetal, mais especificamente relacionados ao ABA, atuam na percepção de falta de água no solo, através do sistema radicular, e sinalizam os movimentos estomáticos, induzindo seu fechamento em cenários desfavoráveis (TOMBESI *et al.*, 2015; KUROMORI *et al.*, 2018). Tal característica pode estar ligada também a respostas das plantas para tolerar curtos períodos de limitação hídrica (LOMBARDINI e ROSSI, 2019). Cabe mencionar também que a quantidade de enzima RuBisCO presente nos cloroplastos sofre grande diminuição sob condições de escassez hídrica, sendo considerado um dos componentes críticos que influencia a fisiologia das plantas em limitação hídrica (LISAR *et al.*, 2012). É plausível sugerir, portanto, que flutuações nos níveis de RuBisCO possam explicar, ao menos parcialmente, a menor capacidade de fixação do CO₂ observada em *S. sessiliflorum* após a limitação hídrica. Isto ponto, deve-se ter em mente também que os valores

máximos de g_s observados em *S. sessiliflorum* foram de $0,22 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ao passo que resultados encontrados para *S. lycopersicum* indicam valores próximos ($0,15$ e $0,27 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (MARTINS *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2021). Em adição, valores máximos observados para A_N em condições de CO_2 ambiente foram de $23 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em *S. sessiliflorum*, ao passo que em *S. lycopersicum* foram reportados valores de $12 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (MARTINS *et al.*, 2018) e $22,5 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (NASCIMENTO *et al.*, 2021). Tomados em conjunto, esses resultados indicam que, a despeito das diferenças morfoanatômicas, em condições ótimas, *S. lycopersicum* e *S. sessiliflorum* apresentam comportamento relativamente similar do seu aparato fotossintético.

A seca é um fator limitante a produção vegetal (BASU *et al.*, 2016) e, conforme já mencionado, há redução em processos metabólicos essenciais para o desenvolvimento. Aqui, foi observado que a limitação hídrica afetou o acúmulo de biomassa em *S. sessiliflorum*. Ao longo do experimento foi possível perceber um crescimento diferencial entre plantas controle e em limitação hídrica (Figura 2) e, ao final do experimento, diferenças significativas entre massa fresca e seca das plantas (Figura 3A, B), assim como redução da área foliar foram observadas (Figura 3C). A restrição hídrica afeta diretamente o metabolismo de carboidratos (MARTINS *et al.*, 2018) bem como a divisão e expansão celular (CLAUW *et al.*, 2016). A baixa entrada de CO_2 devido ao fechamento estomático afeta grandemente a fixação de carbono (FLEXAS *et al.*, 2006) restringindo diretamente o desenvolvimento vegetal e acúmulo de biomassa. Neste contexto, observou-se que menores taxas de crescimento estão associadas a limitações as taxas fotossintéticas, em especial as bioquímicas e estomáticas, sugerindo que tais mecanismos sejam, possivelmente, os principais responsáveis pela redução no padrão de crescimento observado em resposta a flutuações na disponibilidade hídrica.

4.2. A limitação hídrica promove desequilíbrios entre a captação da luz e sua utilização em *S. sessiliflorum*

O desbalanço entre a geração e a utilização de elétrons pode culminar na formação de EROs culminando em graves problemas à integridade de estruturas celulares como proteínas e membranas, podendo danificar até mesmo a estruturas do DNA (LISAR *et al.*, 2012). EROs podem ser geradas em função de desbalanço no

comportamento dos parâmetros relacionados a eficiência fotoquímica do PSII. Assim, a perda da eficiência tanto em parâmetros analisados sob luz (F_v'/F_m' , ϕ PSII qL ETR) (Figura 5B, C, D) como também na ausência de luz (F_v/F_m) (Figura 5A) porém com menor intensidade neste último, sugerem que, em resposta a redução na disponibilidade de água, limitações fotoquímicas à fotossíntese possam ter ocorrido. Apesar da queda na eficiência destes parâmetros, a reidratação foi capaz de realizar a retomada dos padrões, indicando que tais limitações tenham ocorrido de forma reversível. O metabolismo antioxidante pode estar ligado a proteção dos PSII (FRYER *et al.*, 1998; REDDY *et al.*, 2004; BAKER, 2008), a ação do ciclo ascorbato/dehidroascorbato (EL-BELTAGI *et al.*, 2020) ou então ao sistema de competição de dissipação de energia luminosa possa ter garantido a integridade do sistema com a extinção não fotoquímica (NPQ) da energia absorvida pelos complexos antena das clorofilas (MURCHIE e LAWSON, 2013). Desta forma, a possibilidade de formação de ROS nos cloroplastos ficaria diminuta como observado pela evidente atuação da extinção não fotoquímica (Figura 5E).

A limitação hídrica afeta, tanto em presença quanto na ausência de luz, o transporte de elétrons (BAKER., 2008). Com efeito, os problemas mais graves são observados no complexo de evolução de oxigênio e na transferência de elétrons para o PSI e essa menor taxa de transferência de elétrons afeta negativamente os processos de fosforilação e diminui a síntese de ATP e redução de $NADP^+$ (LISAR *et al.*, 2012; CHERNYAD'EV, 2005). Essa menor síntese de ATP e NADPH causa um desbalanço nas reações de carboxilação (Ciclo de Calvin-Benson) no estroma do cloroplasto pois há falta de ATP e NADPH produzidos pelas reações de fosforilação do PSI e ATPase nas membranas dos tilacóides para alimentar o ciclo. Tal questão ainda pode levar ao acúmulo de $ADP + P_i$ e $NADP^+$ no cloroplasto gerando um grande desbalanço nas condições redox (BALSERA, *et al.*, 2014). Algumas questões como fotoproteção por carotenoides (LISAR *et al.*, 2012), dissipação de excesso de energia química (MURCHIE e LAWSON, 2013) ou regulação do balanço redox (BALSERA, *et al.*, 2014) podem ter atuado como suporte à limitação hídrica em cubiu.

A razão F_v/F_m (Figura 5A) em condições não estressantes apresentou valores muitos próximos aos considerados 'ideais' para folhas não estressadas ($\sim 0,83$) (BJÖRKMAN e DEMMIG, 1987). O comportamento de alguns outros parâmetros associados a eficiência fotoquímica (e.g. F_v'/F_m' ; ETR, ϕ PSII) (Figura 5B, C, D) foram,

em larga extensão, similares entre *S. sessiliflorum* e *S. lycopersicum*. No entanto, q_L e NPQ apresentaram diferenças entre essas espécies sendo que NPQ (Figura 5E) em *S. sessiliflorum* controle foi de 0.05 enquanto em *S. lycopersicum* foi de 0.67 (NASCIMENTO *et al.*, 2020), quase o mesmo valor obtido após nove dias de estresse em *S. lycopersicum*. Tais resultados indicam uma alta taxa de dissipação não fotoquímica em tomate, ou seja, perda de energia captada na forma de calor que poderia ter sido utilizada na redução da Q_A e que em *S. sessiliflorum* tal mecanismo ocorra de forma menos pronunciada. Em consonância com essa hipótese observa-se também uma maior taxa de dissipação fotoquímica em *S. sessiliflorum* ($q_L = 0.84$), que em *S. lycopersicum* ($q_L = 0.60$) (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Trabalhos futuros deverão investigar, em detalhes, como o comportamento fotoquímico em *S. sessiliflorum* pode influenciar sua resposta à limitação hídrica.

No presente estudo, a medida que a água foi reintroduzida em *S. sessiliflorum* ocorreram decréscimos nos valores de NPQ (Figura 5E) e reestabelecimento das condições normais de dissipação de energia não fotoquímica ao quinto dia após a reidratação. Em relação a q_L , o inverso aconteceu, uma vez que este parâmetro trata da extinção fotoquímica da energia, mais especificamente sobre a fração de centros de reação do PSII aptos a receber elétrons (Q_A oxidada) e utilizar essa energia para continuar o processo fotoquímico (MURCHIE e LAWSON, 2013; YANG *et al.*, 2017). É plausível sugerir que essa recuperação possa estar ligada, ao menos parcialmente, a síntese de pigmentos (clorofilas), como aqui demonstrado (Figura 8).

4.3. Alterações metabólicas frente a limitação hídrica e reidratação em *S. sessiliflorum*

Condições estressantes parecem estar ligadas a diminuição de atividades enzimáticas, causando prejuízos significativos a formação de metabólitos essenciais ao desenvolvimento vegetal (DU *et al.*, 2020). Dentre tais enzimas, a sacarose fosfato sintase, envolvida diretamente na síntese de sacarose, pode ter sua atividade enzimática reduzida (LISAR *et al.*, 2012). Com efeito, em *S. sessiliflorum* sob limitação hídrica diminuição da síntese de sacarose foi observada embora incremento nos teores de sacarose no dia de estresse hídrico mais severo tenham sido observados (Figura 9C). Esse incremento, no entanto, foi acompanhado de uma diminuição nos teores de amido possivelmente ligado ao consumo de reservas para manutenção das

concentrações de sacarose ajustando, portanto, o fluxo de carbono (POKHILKO *et al.*, 2014). Registre-se, também, que o período de reidratação foi acompanhado de aumentos nos teores de amido e sacarose (Figura 9).

Cabe mencionar também que as quantidades de sacarose encontradas em *S. lycopersicum* são bem menores que as observadas em *S. sessiliflorum*, tanto em condições controle como em deficiência hídrica. Apenas para efeitos de comparação, em *S. lycopersicum* foram obtidas concentrações de $40 \mu\text{mol g}^{-1}$ de sacarose em plena disponibilidade hídrica (MARTINS *et al.*, 2018) e $45 \mu\text{mol g}^{-1}$ em limitação hídrica de oito dias (OMENA-GARCIA *et al.*, 2018). Para *S. sessiliflorum*, em condições controle, a concentração de sacarose foi de $140 \mu\text{mol g}^{-1}$ e em deficiência hídrica de nove dias $117 \mu\text{mol g}^{-1}$ (Figura 9C). É preciso, no entanto, cautela ao realizar a associação entre altas concentrações de sacarose e baixo TRA, pois baixo TRA aumenta a viscosidade e dificulta o transporte de assimilados pelos vasos condutores (LEMOINE *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2019)

Concentrações de amido aqui observadas foram baixas (Figura 9D) comparadas as encontradas em *S. lycopersicum* (OMENA-GARCIA *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2018). Os níveis de amido diminuíram ainda mais em função do avanço da seca apresentando retomada com a reinserção de água no sistema (Figura 9D). Pequeno acúmulo de amido usualmente observado em plantas de rápido crescimento, onde o carbono é rapidamente fixado em carboidratos para distribuição pelo floema (sacarose) e manutenção de processos fisiológicos (SLEWINSKI e BRAUN, 2010; WEISE *et al.*, 2012; LEMOINE *et al.*, 2013). Assim, os resultados aqui obtidos sugerem que o rápido crescimento de *S. sessiliflorum* possa estar relacionado a uma alta capacidade de mobilização de energia tanto em condições ótimas quanto em situações de estresse.

Além de importante intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico, o malato desempenha inúmeras outras funções no metabolismo vegetal e algumas delas estão muito relacionadas ao funcionamento da atividade fotossintética, porém em níveis diferentes e em função da espécie em apreço (FERNIE e MARTINOIA, 2009). No cloroplasto, malato é utilizado como molécula estratégica para manutenção do estado redox do estroma garantindo, assim, melhor eficiência fotossintética. (BACKHAUSEN *et al.*, 1984). *S. sessiliflorum* apresentou quantidade equivalentes de malato quando comparado com *S. lycopersicum* em condições ótimas de crescimento (OMENA-

GARCIA *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2018). Em resposta a limitação hídrica, *S. sessiliflorum* apresentou maiores níveis de malato, o que pode indicar algum ajuste metabólico como a manutenção do estado redox no estroma do cloroplasto para a manutenção, a contento, dos processos fotossintéticos. É possível ainda que malato esteja envolvido em mecanismos de ajustes estomáticos em *S. sessiliflorum*, contribuindo para abertura estomática através de mecanismos osmoregulatórios (FERNIE e MARTINOIA, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2017). Tomados em conjunto, os resultados metabólicos aqui obtidos, embora sejam ainda incipientes, demonstram uma adequada plasticidade metabólica em *S. sessiliflorum* e, mais importante, que essa plasticidade seja utilizada, em larga extensão, para garantir a sobrevivência dessa espécie a limitação hídrica

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados aqui apresentados fica evidente que a limitação hídrica impõe efeitos significativos ao crescimento e desenvolvimento do cubiu. Cabe mencionar, no entanto, que nem todo parâmetro depreciado reflete em prejuízos podendo também indicar ajustes para manutenção da vida em condições adversas, associados à uma ampla plasticidade de características. Aparentemente, os resultados indicam boa atuação do sistema fotoquímico, prevenções a perda de água por transpiração e mobilização de energia frente à limitação hídrica e reinserção de água no sistema. Estudos futuros e cada vez mais específicos serão essenciais para validar e entender qualquer característica que esteja presente e buscar de fato a identificação e posterior elucidação de características, seja na própria espécie ou em outras relacionadas, que se tornem promissoras frente à condições adversas bióticas e abióticas

6. REFERÊNCIAS

- Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., Osorio, S., Usadel, B., Fuentes, D., Nagy, R., Fernie, A.R.** (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. *Plant Cell* 23, 600-627.
- Backhausen, J.E., Kitzmann, C., Scheibe, R.**, (1984). Competition between electron acceptors in photosynthesis – regulation of the malate valve during CO₂ fixation and nitrite reduction. *Photo. Res.* 42, 75–86.
- Balsera, M., Uberegui, E., Schürmann, P., and Buchanan, B. B.** (2014) Evolutionary development of redox regulation in chloroplasts. *Antioxid. Redox Signal.* 21: 1327–1355
- Baker, N. R.** (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59, 89–113.
- Barrs, H.D.; Weatherley, P.E.** (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*, 15:413-428.
- Basu, S.; Ramegowda, V.; Kumar, A.; Pereira, A.** (2016). Plant adaptation to drought stress. *F1000 Res* 5: 1554.
- Björkman O, Demmig B.** (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Plant* 170:489–504
- Bradford, M.M.** et al (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brucher H** (1968) Die genetischen Reserven Sudamcrises für die Kulturpflanzen zu züchtung. *Theor Appl Genet* 38:9–22
- Carrer Filho, R.** et al. (2015) Fontes de resistência múltipla à murcha de fusário em tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 50, n. 12, p. 1225-1231.
- Clauw P. et al** (2016). Leaf growth response to mild drought: natural variation in *Arabidopsis* sheds light on trait architecture. *Plant Cell* 28:2417–2434. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00483>.
- Cross, J.M., von Korff, M., Altmann, T., Bartzetko, L., Sulpice, R., Gibon, Y., Palacios, N., Stitt, M.**, (2006). Variation of Enzyme Activities and Metabolite Levels in 24 *Arabidopsis* Accessions Growing in Carbon-Limited Conditions. *Plant Physiol.* 142, 1574–1588. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086629>

Damatta, F. M., Loos, R. A., Silva, E. A., Loureiro, M. E. (2002) Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *J Plant Physiol* 159: 975-981

Du, H.; Huang, F.; Wu, N.; Li, X.; Hu, H.; Xiong, L.; (2018). Integrative regulation of drought escape through ABA dependent and independent pathways in rice molecular plant. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.01.004>

Du, Y. Zhao, Q. Chen, L. Yao, X. Zhang, W. Zhang, B. Xie, F. (2020). Effect of drought stress on sugar metabolism in leaves and roots of soybean seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 146. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.003>.

Duarte, O. (2011). Cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal). In: Yadhia Elhadi (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits. Volumen 3: Cocona to Mango.* Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Cambridge, UK, Number 208.

Duarte O, Paull R (2015) *Exotic fruits and nuts of the New World.* CABI, Wallingford

El-Beltagi, H.S, Mohamed, H.I, Sofy, M.R. (2020). Role of Ascorbic acid, Glutathione and Proline Applied as Singly or in Sequence Combination in Improving Chickpea Plant through Physiological Change and Antioxidant Defense under Different Levels of Irrigation Intervals. *Molecules*, 25, 1702; doi:10.3390/molecules25071702

Fernie, A.R., Martinoia, E.,(2009). Malate. Jack of all trades or master of a few? *Phytochem* 70, 828-832

Fernie, A.R., Roscher, A., Ratcliffe, R.G., Kruger, N.J., (2001). Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling heterotrophic cells. *Planta* 212, 250–263. <https://doi.org/10.1007/s004250000386>

Flexas J, Bota J, Galmes J, et al.(2006). Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Planta Fisiol.* 2006;127:343–352.

Fryer, M.J, Andrews, J.R, Oxborough, K. Blowers, D.A, Baker, N.R. (1998). Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiol.* 116:571–80

Gasparini, K., Moreira, J. D. R., Peres, L. E. P., & Zsögön, A. (2021). De novo domestication of wild species to create crops with increased resilience and nutritional value. *Current Opinion in Plant Biology*, 60, 102006. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102006>

Gojon, A., Nussaume, L., Luu, D. T., Murchie, E. H., Baekelandt, A., Rodrigues Saltenis, V. L., ... Nacry, P. (2022). Approaches and determinants

to sustainably improve crop production. *Food and Energy Security*.
<https://doi.org/10.1002/fes3.369>

Chernyad'ev I.I (2005). "Effect of water stress on the photosynthetic apparatus of plants and the protective role of cytokinins: A review," *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 41, pp. 115-128.

Lemoine, R. et al. (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front. Plant Sci.* 4, 272

Lima, C.Z. Buzan, J.R. Moore, F.C. Baldos, U.L.C. Huber, M. Hertel, T.H. (2021). Heat stress on agricultural workers exacerbates crop impacts of climate change. *Environ. Res. Lett.* 16 044020.

Lima, A. L. S., Damatta, F. M., Pinheiro, H. A., Totola, M, R., Loureiro, M. E. (2002) Photochemical response and oxidative stress in two of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ Exp Bot* 47: 239-247

Lisar, S.Y.S, Motafakkerzad, R, Hossain, M.M., Rahman, I.M.M. (2012) Water stress in plants: causes, effects and responses. in: *Water Stress*, Ismail Md. Mofizur Rahman and Hiroshi Hasegawa, IntechOpen, DOI: 10.5772/39363

Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J. et al. (2006) Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* 1, 387-396
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>

Lombardini L.; Rossi L. (2019). Ecophysiology of Plants in Dry Environments. In: D'Odorico P., Porporato A., Wilkinson Runyan C. (eds) *Dryland Ecohydrology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23269-6_4.

Kuromori, T. Seo, M. Shinozaki, K. (2018). ABA Transport and Plant Water Stress Responses. *Trends in Plant Science*. Vol. 23, 513-522.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.001>

Martins, A.O, Omena-Garcia, R.P, Oliveira, F.S, Silva, W.A, Hajirezaei M-Reza, Vallarino, J.G, Ribeiro, D.M, Fernie, A.R, Nunes-Nesi, A, Araujo, W. L. (2018) Differential root and shoot responses in the metabolism of tomato plants exhibiting reduced levels of gibberellin, *Environmental and Experimental Botany*, <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.036>

Martins, G.S, Freitas, N.C, Máximo, W.P.F, Paiva, L.V. (2018) Gene expression in two contrasting hybrid clones of *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla* grown under water deficit conditions. *Journal of Plant Physiology*, 229:122-131.

Medeiros, D.B., Barros, K.A., Barros, J.A.S., Omena-Garcia, R.P., Arrivault, S., Sanglard, L.M., DaMatta, F.M. (2017). Impaired malate and fumarate accumulation due to the mutation of the tonoplast dicarboxylate transporter has little effects on stomatal behavior. *Plant Physiol* 175, 1068-1081.

Murchie E. H; Lawson T. (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 64, No. 13, pp. 3983–3998.

Moreno, C.; Quiñones, J. C.; Jiménez, P. (2015). Phenological growth stages of *Solanum sessiliflorum* according to BBCH. *Ann. Appl. Biol.* 168 (1), 151-157

Nascimento, V. L, Pereira, A. M, Siqueira, J. A, Pereira, A. S, Silva, V. F, Costa, L. C, Ribeiro, D. M, Agustin Zsögön, Nunes-Nesi, A, Araújo, W. L, (2021). Exogenous ethylene reduces growth via alternations in central metabolism and cell wall composition in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153460>

Nascimento, V. L, Pereira, A. M, Pereira, A. S, Silva, V. F, Costa, L. C, Bastos, C.E.A, Ribeiro, D. M, Caldana, C. Sulpice, R. Nunes-Nesi, A. Agustin Zsögön, , Araújo, W. L (2020). Physiological and metabolic bases of increased growth in the tomato ethylene-insensitive mutant Never ripe: extending ethylene signaling Functions. *Plant Cell Reports*. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02623-y>

Nowicka B.; Ciura J.; Szymańska R.; Kruk J. (2018). Improving photosynthesis, plant productivity and abiotic stress tolerance – current trends and future perspectives, *Journal of Plant Physiology*, Volume 231, Pages 415-433, ISSN 0176-1617, <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.022>.

Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sulpice, R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham, J., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J., Fernie, A.R., (2007). Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J.* 50, 1093–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03115.x>

Omena-Garcia R. P, Oliveira Martins A, Barbosa Medeiros D, Vallarino JG, Mendes Ribeiro D, Fernie A. R, Araujo W. L, Nunes-Nesi A. (2018) Growth and metabolic adjustments in response to gibberellin deficiency in drought stressed tomato plants, *Environmental and Experimental Botany* <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.011>

PIRES, A. M. B et al (2006). Caracterização e processamento de cubiu (*Solanum sessiliflorum*). *Rev. Ceres*. Maio/Junho Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/20970/1/artigo.pdf>>. Acesso em: 08 mai 2022.

Paiva W (1999) Natural outcrossing in cocona. *Pesq Agropec Bras* 34:145–149

Pokhilko, A. Flis, A. Sulpice, R. Stitt, M. Ebenhoh, O. (2014). Adjustment of carbon fluxes to light conditions regulates the daily turnover of starch in plants: a computational model. *Mol. BioSyst*, 10, 613-627. DOI: 10.1039/C3MB70459A

Porra, R.J., Thompson, W.A., P.E., K., (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assay in chlorophylls a and b extracted with four different solvents. *Biochim. Biophys. Acta* 975, 384–394.

- R Core Team** (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramankutty, N. Mehrabi, Z. Waha, K. Jarvis, L. Kremen, C. Herrero, M. Rieseberg, L.H.** (2018). Trends in Global Agricultural Land Use: Implications for Environmental Health and Food Security. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 69:789-815. [Doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040256](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040256).
- Reddy A.R, Chaitanya K.V., Vivekanandan M.** (2004), "Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants," *Journal of Plant Physiology*, vol. 161, pp. 1189-1202.
- Rodrigues, J. Inzé, D. Hilde, N. Saibo, N.J.M.** (2019). Source-Sink Regulation in Crops under Water Deficit. *Trends in Plant Science*, Vol. 24, No. 7 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.04.005>
- Silva Filho D** (2005) Cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal): Cultivo y utilización. Secretaria Pro-tempore, Tratado de Cooperación Amazonica, Caracas
- Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9 : 671 – 675 .
- Sereno, A. B.; Bampi, M.; Rodrigues Ferreira, S. M.; Bertin, R. L.; Krüger, C. C. H.** (2018). Mineral profile, carotenoids and composition of cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal), a wild Brazilian fruit. *Journal of Food Composition and Analysis*, 72, 32-38. doi: 10.1016/j.jfca.2018.06.01.
- SILVA FILHO, D.F.** et al. (2013) Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal): Aspectos agronômicos e nutricionais. Projeto fronteira. Manaus: INPA.
- Slewinski, T.L. and Braun, D.M.** (2010) The Psychedelic genes of maize redundantly promote carbohydrate export from leaves. *Genetics*, 185, 221–232
- Sperlich, D.; Barbeta, A.; Ogaya, R.; Sabaté, S.; Peñuelas, J.** (2016). Balance between carbon gain and loss under long-term drought: impacts on foliar respiration and photosynthesis in *Quercus ilex* L. *J Exp Bot* 67:821-833. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv492>.
- Srivastava K.; Jentsch A.; Kreyling J.; Glaser B.; Wiesenberger G. L. B.** (2017). Short-term carbon dynamics in a temperate grassland and heathland ecosystem exposed to 104 days of drought followed by irrigation. *Isotopes Environ Health Stud* 54:41–62. <https://doi.org/10.1080/10256016.2017.1371714>
- Tardieu, F.; Simonneau, T.; Muller, B.** (2018). The physiological basis of drought tolerance in crop plants: a scenario-dependent probabilistic approach. *Annu Rev Plant Biology* 69:733–759.

Tombesi, S. et al.(2015) Stomatal closure is induced by hydraulic signals and maintained by ABA in drought-stressed grapevine.Sci. Rep.5, 12449

Vargas-Muños, D. P.; Kurozawa, L. E. (2020). Influence of combined hydrolyzed collagen and maltodextrin as carrier agents in spray drying of cocona pulp. Brazilian Journal of Food Technology, 23, e2019254. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.25419>

Venema, J. H. et al. (2008). Grafting tomato (*Solanum lycopersicum*) onto the rootstock of a high-altitude accession of *Solanum habrochaites* improves suboptimal-temperature tolerance. Environmental and Experimental Botany, Oxford, v. 63, n. 1, p. 359-367.

Vivas, M, Rolo, V, Wingfield, M.J, Slippers, B; (2019) Maternal environment regulates morphological and physiological traits in *Eucalyptus grandis*. Forest Ecology and Management, **432**:631-636.

Yang, L.Y.et al. (2017) Effects of light quality on growth and development, photosynthetic characteristics and content of carbohydrates in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants Photosynthetica55, 467–477

Yousfi, N.; Sihem, N.; Ramzi, A.; Abdelly, C. (2016). Growth, photosynthesis and water relations as affected by different drought regimes and subsequent recovery in *Medicago laciniata* (L.) populations. J Plant Biol 59:33 -43. <https://doi.org/10.1007/s12374-016-0422-8>

Weise S. E, Aung K, Jarou Z.J, Mehrshahi P, Ziru Li, Hardy A.C, Carr D.J. Sharkey T.D. (2012). Engineering starch accumulation by manipulation of phosphate metabolism of starch. Plant Biotechnology Journal 10, pp. 545–554. doi: 10.1111/j.1467-7652.2012.00684.x