

REBECA PATRICIA OMENA GARCIA

**EFEITOS DE GIBERELINAS PARA RESPOSTAS EM PLANTAS DE TOMATE À
DEFICIÊNCIA 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*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

G216e
2014

Garcia, Rebeca Patricia Omena, 1989-
Efeitos de giberelinas para respostas em plantas de tomate à
deficiência hídrica / Rebeca Patricia Omena Garcia. – Viçosa,
MG, 2014.
xv, 71f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Adriano Nunes Nesi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Plantas - Desenvolvimento. 2. Metabolismo de
giberelinas. 3. Déficit hídrico. 4. Tolerância. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa
de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 571.2

REBECA PATRICIA OMENA GARCIA

**EFEITOS DE GIBERELINAS PARA RESPOSTAS EM PLANTAS DE TOMATE À
DEFICIÊNCIA 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: 21 de fevereiro de 2014.

Wagner Luiz Araújo
(Coorientador)

Fábio Murilo DaMatta

Dimas Mendes Ribeiro

Adriano Nunes Nesi
(Orientador)

“Paciência e perseverança têm o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem.”

John Lennon

A minha irmã Evellyn Priscilla, pelo carinho e força de todos os momentos.

Ao meu “tio-pai” Paulo Ney pelo incentivo e amor dedicado.

Ofereço

Aos meus pais, Deyse e João por sempre acreditarem em mim e por tudo que representam em minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser presente na minha vida e guiar meus caminhos.

A Capes e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso de mestrado em Fisiologia Vegetal e estrutura oferecida.

Ao meu orientador Prof. Adriano Nunes Nesi, pela orientação, conhecimento transmitido, compreensão e paciência de sempre.

Aos meus coorientadores, Prof. Wagner Araújo e Marcelo Rogalski, pela disposição e apoio nos momentos em que precisei.

Aos demais Professores do curso, José Cambraia, Juraci Alves, Fábio DaMatta, Raimundo Barros e Marcelo Loureiro, pela contribuição no meu crescimento profissional.

A toda a equipe do laboratório de nutrição e metabolismo, Alice, Alyne, Danielle, Franklin, Jéssica, Jô, Jorge Condori, Kelly, Laíse, Leandro, Lilian, Paula, Paulo, Raphael, Samuel, Wilton, pela amizade, auxílio nos experimentos, convívio e momentos de descontração.

A toda equipe da Unidade de Crescimento de Plantas, Alberto, Dalton, Dora, Franciele, João Henrique, Mariana, Renan, Renato, Rinamara, Samira e Vitor, pela amizade, companheirismo e contribuições neste trabalho.

Aos amigos da turma de mestrado, Adinan, Amanda e Fernanda Vidal pelo apoio, pelas risadas e companhia em todos os momentos.

As minhas amigas de longas datas, Ana Francisca, Anna Carolina, Flávia e Laís Queiroz, por serem presentes mesmo na distância e por saber que sempre posso contar, agradeço do fundo do coração pela amizade.

A minha família Viçosense, Haroldo, Thais, Vivianny, Heloísa, David, Izabel e Aquidauana, pelos ótimos momentos compartilhados e por tornar essa trajetória “menos difícil”, a vocês meus profundos agradecimentos.

A minha família, irmãos, pais, padrasto, avós, tios e primos que mesmo tão distantes ajudaram a superar meus momentos de dificuldade, os dias de saudade, me dando amor e palavras de coragem como sempre.

Enfim, a todos que de maneira direta ou indiretamente participaram e contribuíram para que fosse possível a conclusão de mais esta etapa, sou sinceramente grata.

BIOGRAFIA

REBECA PATRICIA OMENA GARCIA, filha de João Chaves Garcia Filho e Deyse Maria Martins Omena, nasceu na cidade de Manaus, Estado do Amazonas, no dia 18 de julho do ano de 1989. Em março de 2007, iniciou o curso de Agronomia no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas (CCA – UFAM), em Manaus – AM, concluindo-o em fevereiro de 2012. Em fevereiro de 2012, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG, submetendo-se a defesa de dissertação em 21 de fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO	5
2.1.1 DESCRIÇÃO DOS GENÓTIPOS UTILIZADOS.....	5
2.1.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	6
2.2 ANÁLISES DE CRESCIMENTO E COLETA DE MATERIAL.....	8
2.3 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE TROCAS GASOSAS E DE FLUORESCÊNCIA	8
2.4 DETERMINAÇÃO DO STATUS HÍDRICO DA PLANTA	9
2.5 DETERMINAÇÃO DA PERDA DE ÁGUA EM FOLHA DESTACADA.....	10
2.6 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	11
2.6.1 EXTRAÇÃO ETANÓLICA.....	11
2.6.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILAS	11
2.6.3 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE AMINOÁCIDOS TOTAIS	12
2.6.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE AÇÚCARES	12
2.6.5 DETERMINAÇÃO DOS CONTEÚDOS DE MALATO E FUMARATO	13
2.6.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO	13
2.6.7 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS	14
2.6.8 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE AMIDO	15
2.6.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITO E ENZIMAS ENVOLVIDOS NO METABOLISMO ANTIOXIDATIVO E DANOS CELULARES	15
2.6.9.1 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	15
2.6.9.2 DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO ANTIOXIDATIVO.....	16
2.6.9.3 DETERMINAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA	17
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	19
4. RESULTADOS	20
4.1 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DE PLANTAS MUTANTES COM REDUÇÃO NOS NÍVEIS ENDÓGENOS DE GA	20
4.2 AVALIAÇÃO DO STATUS HÍDRICO EM PLANTAS MUTANTES NA BIOSÍNTESE GAS.....	21

4.3 ANÁLISES BIOMÉTRICAS DE PLANTAS MUTANTES NA BIOSÍNTESE GAS.....	23
4.4 PARÂMETROS DE FLUORESCÊNCIA E FOTOSSÍNTESE EM PLANTAS MUTANTES COM BAIXOS NÍVEIS ENDÓGENOS DE GAS SOB DEFICIÊNCIA HÍDRICA.....	27
4.5 EFEITOS DE BAIXOS NÍVEIS ENDÓGENOS DE GAS SOBRE O METABOLISMO DO CARBONO E DO NITROGÊNIO EM RESPOSTA A DEFICIÊNCIA HÍDRICA	33
4.6 AVALIAÇÃO DO ESTADO REDOX DE FOLHAS DE PLANTAS COM DIFERENTES NÍVEIS ENDÓGENOS DE GA SOB DEFICIÊNCIA HÍDRICA	38
4.7 METABÓLITOS E ENZIMAS ENVOLVIDOS NO METABOLISMO ANTIOXIDATIVO E DANOS CELULARES DE PLANTAS DE TOMATE COM BAIXOS NÍVEIS ENDÓGENOS DE GAS EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE HÍDRICO	40
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	49
7. REFERÊNCIAS	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema ilustrativo da rota biossintética de GAs pode ser dividida em três etapas conforme a localização das enzimas envolvidas. Setas em vermelho indicam as enzimas cuja atividade foi reduzida nos mutantes *gib1*, *gib2* e *gib3*, utilizados neste estudo.....6
- Figura 2.** Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv Moneymaker) com baixos níveis de giberelinas endógenas, *gib3*, *gib2* e *gib1*, ao final de oito, 15 e 20 dias sob deficiência hídrica, respectivamente.....21
- Figura 3.** Variação no *status* hídrico em resposta aos diferentes níveis de GAs endógenos e deficiência hídrica em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker).....22
- Figura 4.** Variação de parâmetros de crescimento relacionados com altura de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) em resposta a diferentes níveis de GA e deficiência hídrica.....24
- Figura 5.** Variação de parâmetros biométricos em resposta a diferentes níveis de GAs e deficiência hídrica em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv Moneymaker).....26
- Figura 6.** Variação nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em resposta aos diferentes níveis endógenos de GAs e deficiência hídrica em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker).....28
- Figura 7.** Alteração nos valores de fotossíntese líquida de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) com baixos níveis de GAs em resposta as condições testadas durante o período de aplicação dos tratamentos.....30
- Figura 8.** Variação nos parâmetros de tocas gasosas em resposta aos diferentes níveis endógenos de GAs em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) submetidos a deficiência hídrica.....32
- Figura 9.** Alterações nos conteúdos de metabólitos envolvidos no metabolismo do carbono em folhas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) com diferentes níveis de GAs endógenos cultivados sob deficiência hídrica.....35

Figura 10. Alteração nos teores de metabólitos envolvidos no metabolismo do nitrogênio em folhas de plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Moneymaker) com diferentes níveis de GAs endógenos cultivados sob deficiência hídrica.....	37
Figura 11. Alteração do conteúdo de nucleotídeos de piridina em folhas de plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Moneymaker) com diferentes teores endógenos de GAs cultivados sob deficiência hídrica.....	39
Figura 12. Variação no conteúdo de MDA (malonaldeído) e de enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo e danos celulares em folhas de plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Moneymaker) com diferentes níveis de GAs endógenos cultivados sob deficiência hídrica.....	41

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ψ_w	Potencial hídrico
Abs	Absorvância
AFT	Área foliar total
AFE	Área foliar específica
A_N	Taxa de assimilação líquida de CO_2
ANOVA	Análise de variância
APX	Peroxidase do ascorbato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
C1	Controle do tratamento de deficiência hídrica
C2	Controle do tratamento de reirrigação
CAT	Catalase
C_i	Concentração interna de CO_2
Chl	Clorofila
DH	Deficiência hídrica
DTT	Ditiotreitol
E	Transpiração
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EMS	Etil metano sulfonato
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Eficiência instantânea do uso da água
ETR	Taxa de transporte de elétrons
FSII	Fotossistema II
F_v/F_m	Eficiência fotoquímica máxima do FSII
F_v'/F_m'	Eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII
G6P	Glicose 6-fosfato
G6PDH	Glicose 6-fosfato desidrogenase
GA(s)	giberelina (s)
g_s	Condutância estomática

MDA	Malonaldeído
MF	Massa fresca
MS	Massa seca
MSF	Massa seca de folhas
MSH	Massa seca de hastes
MSR	Massa seca de raízes
MST	Massa seca total
MT	Massa turgida
MTT	Brometo de metiltiazolildifeniltetrazólio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fofatado forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatado forma reduzida
NBT	P-nitro tetrazólio
NED	Dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina
NPQ	Coeficiênte de extinção não-fotoquímica
OD	Densidade ótica
PES	Fenazinaetosulfato
PMS	Fenazinametosulfato
PVPP	Polivinilpirrolidona
q_L	Coeficiênte de extinção fotoquímica
R_d	Respiração noturna
RI	Reirrigação
R/PA	Razão raiz/parte aérea
SOD	Desmutase do superóxido
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloracético
TCR-h	Taxa de crescimento relativo em altura
TRA	Teor relativo de água
WT	Tipo selvagem (Wild type)

RESUMO

GARCIA, Rebeca Patricia Omena, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2014. **Efeitos de giberelinas para respostas em plantas de tomate à deficiência hídrica**. Orientador: Adriano Nunes Nesi. Coorientadores: Marcelo Rogalski e Wagner Luiz Araújo

A deficiência hídrica é reconhecidamente um dos mais importantes fatores que afetam o crescimento, o desenvolvimento, o metabolismo, a sobrevivência e o rendimento em plantas superiores. Para garantir a sua sobrevivência, as plantas desenvolveram mecanismos para lidar com estresses. Trabalhos recentes tem sugerido um papel importante das giberelinas (GAs) na sobrevivência das plantas sob condições adversas. No entanto, pouco se sabe sobre as implicações fisiológicas, metabólicas e bioquímicas em plantas com alterações nos níveis endógenos de GAs quando submetidas à deficiência hídrica. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos fisiológicos e bioquímicos da alteração endógena nos níveis de GAs em tomateiros mutantes, *gib1*, *gib2* e *gib3*, deficientes na biossíntese de GAs, em condições de deficiência hídrica. Demonstrou-se que plantas mutantes tem a capacidade de manter a água na folha por mais tempo e são capazes de recuperar a fotossíntese mais rapidamente, quando comparado ao WT, após passarem por um período de deficiência hídrica. Adicionalmente, plantas *gib2* e *gib1* não apresentaram murcha aparente mesmo com valores de potencial hídrico baixos. Este fenótipo foi relacionado ao nanismo, encarquilhamento e engrossamento de folhas dos genótipos mutantes. No entanto, plantas mutantes apresentaram investimento no crescimento radicular em detrimento da parte aérea. Assim, plantas menores com sistemas radiculares desenvolvidos tem a capacidade de manter a água na folha por mais tempo por utilizarem a água disponível no solo mais lentamente. A restrição do crescimento pela menor disponibilidade de GAs pode ser vantajosa em ambientes adversos, por permitir o redirecionamento de recursos energéticos para mecanismos que promovem a sobrevivência. Os resultados aqui apresentados sugerem um papel importante das GAs para respostas de aclimação ou de tolerância à deficiência hídrica.

ABSTRACT

GARCIA, Rebeca Patricia Omena, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2014. **Effects of gibberellins to responses in tomato plants to water deficit.** Adviser: Adriano Nunes Nesi. Co-advisers: Marcelo Rogalski and Wagner Luiz Araújo

Drought stress is admittedly one of the most important factors that affect growth, development, metabolism, survival, and yield in higher plants. To ensure their survival, plants have evolved mechanisms to deal with stress. Recent work has suggested an important role of gibberellins (GAs) in plant survival under adverse conditions. However, little is known about the physiological, metabolic and biochemical implications in plants with changes in endogenous levels of GAs when subjected to water deficit. Thus, this study aimed to evaluate the physiological and biochemical effects of changes in endogenous levels of GAs in mutant tomato, *gib1*, *gib2* and *gib3*, deficient in the biosynthesis of GAs in water stress conditions. It was shown that mutant plants have the ability to retain water on the sheet for a longer time and are able to recover more quickly photosynthesis when compared to WT after undergoing a period of drought stress. Additionally, *gib2* and *gib1* plants showed no wilting apparent even with low values of water potential. This phenotype was related to stunting, leaf curling and thickening of the mutant genotype. However, mutant plants showed investment in root growth at the expense of shoot. Thus, plants with smaller root systems have developed the capacity to retain water on the leaves for a longer time by using the available water more slowly in the soil. The growth restriction due to lower availability of GAs can be advantageous in adverse environments by allowing redirection of energy resources for mechanisms that promote survival. The results presented here suggest an important role of GAs responses to acclimation or drought tolerance.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os fatores abióticos aos quais as plantas podem ser acometidas, destaca-se a deficiência hídrica, que ocorre quando a perda de água pela planta excede à capacidade de absorção de água pelas raízes a partir do solo durante tempo suficiente para provocar danos irreversíveis à planta (Jaleel et al., 2007). A deficiência hídrica é um dos fatores mais importantes que afetam o crescimento das plantas, o desenvolvimento, o metabolismo, a sobrevivência e o rendimento em plantas superiores (Charlton et al., 2008; Ramírez et al., 2009; Urano et al., 2009; Ning et al., 2010; Begcy et al., 2012; Loyola et al., 2012). As plantas respondem à deficiência hídrica promovendo o fechamento dos estômatos, reduzindo a atividade fotossintética, alterando a elasticidade da parede celular e até mesmo gerando compostos tóxicos que podem levar a morte da planta (Ahuja et al., 2010).

Tem-se observado que em condições de estresse hídrico ocorrem alterações no transcriptoma, proteoma e metaboloma de diferentes espécies indicando uma reprogramação metabólica em decorrência do estresse (Bokhari et al., 2007; Shulaev et al., 2008; Chae et al., 2009; Ahuja et al., 2010). Consequentemente, alterações no crescimento são frequentemente observadas em decorrência da deficiência hídrica. Essas alterações incluem redução da biomassa da parte aérea em trigo (Loggini et al., 1999), diminuição do comprimento do caule e da massa seca em batata (Ravindra et al., 1991; Lerna e Mauromicale, 2006) e diminuição da massa e da área foliar total em tomate (Shao et al., 2008). Adicionalmente, a falta de água pode diminuir o tamanho da folha, a longevidade e o número de folhas por planta (Tahi et al., 2008; Sánchez-Rodríguez et al., 2010). Apesar das alterações no crescimento, alguns genótipos têm a capacidade de se adaptar a períodos de escassez de água, combinando alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas que melhoram a sua capacidade para suportar a falta de água (Seki et al., 2007; Loyola et al., 2012).

Em geral, as plantas utilizam mecanismos que retardam o aparecimento dos sintomas do déficit hídrico como a produção de ácido abscísico (ABA). Esse composto atua como um regulador central de diversas respostas a estresses ambientais em plantas exercendo papel importante na integração de sinais após a

percepção do estresse (Tran et al., 2007). Têm-se observado que altas concentrações de ABA promovem o fechamento estomático e induzem a expressão de genes relacionados com o estresse hídrico (Seki et al., 2007). Ademais, vários genes que respondem ao estresse hídrico em nível de transcrição foram identificados por microarranjo e outras técnicas. Alguns desses genes são induzidos por tratamento de ABA ao passo que outros não. Registra-se também que análises moleculares têm demonstrado a existência de sistemas regulatórios dependentes e independentes de ABA na regulação transcricional sob estresse hídrico (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2005, 2006; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Outro mecanismo que permite que as plantas evitem e/ ou tolerem o estresse hídrico inclui o acúmulo de osmólitos e antioxidantes (Bartels e Sunkar, 2005; Medeiros et al., 2012). O acúmulo de solutos orgânicos compatíveis (osmólitos) é utilizado no ajustamento osmótico que é considerado um importante mecanismo de tolerância por manter a turgescência celular e favorecer a absorção de água em ambientes com deficiência hídrica (Medeiros et al., 2012). Estudos têm demonstrado que sob deficiência hídrica, ocorre acúmulo de açúcares não-redutores (tais como oligossacarídeos da família rafinose, a sacarose, a trealose e o sorbitol), açúcares redutores (como glicose e frutose), aminoácidos (tais como prolina) e aminas (tais como glicina, betaína e poliaminas) em diferentes espécies vegetais (Taji et al., 2002; Bartels e Sunkar, 2005; Seki et al., 2007). As espécies têm capacidade para sintetizar esses metabólitos, os quais acumulam naturalmente em cultivares tolerantes. Em espécies susceptíveis, programas de engenharia genética para produção de plantas transgênicas tolerantes a seca têm utilizado genes que codificam componentes de vias metabólicas relacionadas a estresses, tais como para o acúmulo de ABA ou compostos osmoticamente ativos, e para a síntese de proteínas específicas relacionadas com a remoção de espécies reativas de oxigênio, e proteínas chaperonas (Umezawa et al., 2006).

Como descrito acima, plantas cultivadas sob deficiência hídrica podem ter seu crescimento regulado por ABA (Munns, 2005). No entanto, outros hormônios responsáveis pela promoção do crescimento como as citocininas e as giberelinas (GAs) também parecem estar envolvidos em respostas a estresses (Magome et al., 2004; Achard et al., 2006; Rivero et al., 2007; Albacete et al., 2008; Ha et al., 2012). Acredita-se que os níveis desses hormônios na planta afetam o seu desempenho

em condições de estresse e, conseqüentemente, a sua tolerância. Adicionalmente, além das citocininas e GAs, destacam-se as auxinas e brassinosteróides como responsáveis pelo crescimento, ao passo que, assim como o ABA, o etileno e ácido jasmônico são mais comumente associados com respostas a estresses (Wolters e Juergens, 2009).

As GAs são uma grande família de fitormônios diterpenóides tetracíclicos que controlam vários processos do desenvolvimento ao longo do ciclo de vida da planta (Hedden e Kamiya, 1997) incluindo a germinação das sementes, expansão foliar, alongamento do colmo, desenvolvimento de tricomas, indução e desenvolvimento da flor e de frutos até o desenvolvimento da semente (Olszewski et al., 2002; Sakamoto et al., 2004; Sun e Gubler, 2004; Zhu et al., 2006; Gao et al., 2011), os quais são suprimidos por estresses osmóticos (Hu et al., 2007). Além disso, GAs intermediam estímulos ambientais, modificando o fluxo através da própria via biossintética. Portanto, a regulação da biossintese de GAs é de fundamental importância para o desenvolvimento da planta e sua adaptação ao meio ambiente (Hedden e Kamiya, 1997; Hedden e Kamiya., 1997). Além disso, o conteúdo de GAs bioativas atua de modo a promover a sua homeostase através da regulação via feedback negativo sobre as enzimas GA₃ oxidase e GA₂₀ oxidase, que são responsáveis pelas etapas finais da biossintese das GAs, e por feedback positivo sobre a GA₂ oxidase que realiza a inativação das GAs (Hedden e Kamiya, 1997; Hedden e Proebsting, 1999). Apesar de já terem sido identificadas inúmeras diferentes GAs em plantas, somente poucas agem como reguladores endógenos de crescimento por serem precursores da via biossintética ou se encontrarem na sua forma inativa (Cowling et al., 1998; Yamaguchi e Kamiya, 2000; Richards et al., 2001).

Estudos com o intuito de avaliar a relação dos baixos níveis de GAs endógenas com tolerância a estresses abióticos (e.g. seca) têm sido realizados em diferentes espécies vegetais (Dubois et al., 2013; Ho et al., 2013; Nir et al., 2013); (Zawaski e Busov, 2014). Em um destes estudos, objetivando esclarecer o mecanismo responsável pela tolerância a deficiência hídrica, plantas de tomate mutantes apresentando superexpressão do gene *GA-metil-transferase 1* de *Arabidopsis thaliana* (*AtGAMT1*) foram geradas e analisadas (Nir et al., 2013). Estas plantas apresentaram baixos níveis de GAs bioativas visto que o gene *AtGAMT1* codifica uma enzima que catalisa a metilação das GAs ativas gerando GAs inativas.

As plantas de tomate superexpressando *AtGAMT1* exibiram fenótipo típico de deficiência de GA e uma maior tolerância ao estresse hídrico. Não obstante, ao se realizar aplicação exógena de GA o crescimento normal e a sensibilidade a seca foi restabelecida (Nir et al., 2013). Em adição, verificou-se que estas plantas apresentaram menor transpiração da planta inteira sob limitação hídrica. A transpiração reduzida foi atribuída a menor condutância estomática uma vez que a superexpressão do *GAMT1* inibiu a expansão de células epidérmicas da folha conduzindo à formação de estômatos menores, com redução de poros estomáticos (Nir et al., 2013).

Neste contexto, onde o envolvimento do baixo conteúdo de GAs ativas com a maior tolerância a deficiência hídrica em plantas já é conhecido, verifica-se que estudos mais aprofundados em plantas com reduzidos níveis endógenos de GAs são ainda necessários e fundamentais para melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pelas respostas apresentadas por essas plantas visto que, muito provavelmente, são variáveis e não sejam mantidas sob condições extremas diversas. Portanto, uma detalhada caracterização fisiológica e metabólica destas plantas deve ser realizada para um maior entendimento do envolvimento do metabolismo de GAs e respostas à deficiência hídrica. Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram verificar a hipótese de que o reduzido conteúdo endógeno de GAs está envolvido em respostas aclimatativas e de tolerância de plantas mutantes submetidas à deficiência hídrica. Esse estudo permitirá uma maior compreensão das respostas metabólicas à seca envolvendo as GAs.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

2.1.1 DESCRIÇÃO DOS GENÓTIPOS UTILIZADOS

As plantas de tomate mutantes deficientes na biossíntese de GAs utilizadas neste estudo foram produzidas e caracterizadas genotípica e fenotipicamente previamente (Koornneef et al., 1990). Esses mutantes foram obtidos pela imersão de sementes da cultivar comercial *Money-Maker* em solução do agente mutagênico etil metano sulfonato (EMS). A análise genotípica realizada inicialmente revelou que as mutações geradas pelo EMS ocorreram em diferentes *loci*, localizados em diferentes cromossomos (Koornneef et al., 1990). Os mutantes denominados *gib3*, *gib2* e *gib1* possuem mutações nos cromossomos sete, um e seis, respectivamente (Koornneef et al. 1990). A caracterização dos mutantes *gib1* e *gib3* revelou que esses genótipos possuem reduzidas as atividades da enzima *ent*-copalil difosfato sintase, com redução de 94% em relação ao tipo selvagem (WT) e *ent*-caureno sintase, com redução de 93% comparado ao WT, respectivamente. Essas enzimas participam das primeiras reações de síntese de GA localizadas nos plastídeos. Já para *gib2*, apesar de não se conhecer o nível de redução da atividade, deve ter afetado a expressão da enzima ácido *ent*-caurenóico oxidase localizada no retículo endoplasmático (Figura 1; Bensen e Zeevaart, 1990; Zeevaart 1986). Em conjunto, a baixa expressão de genes e baixa atividade dessas três enzimas resultaram em plantas mutantes com níveis reduzidos de GAs (Koornneef et al., 1990).

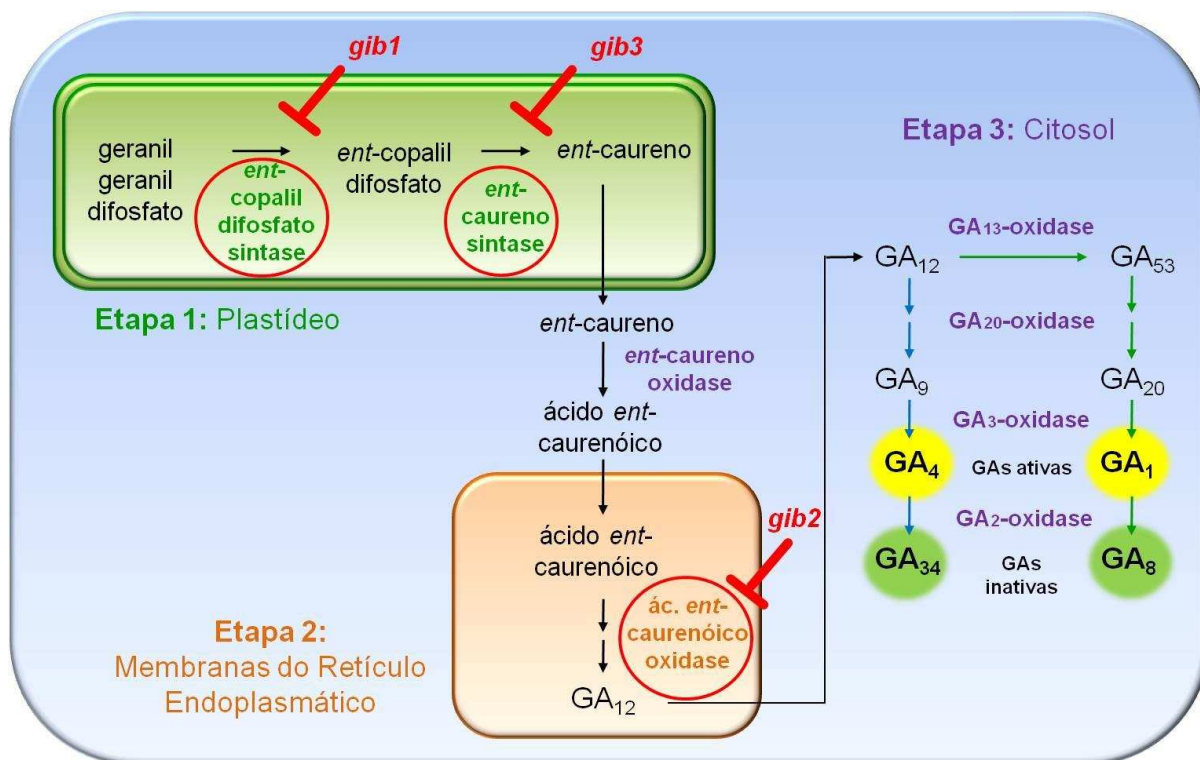


Figura 1. Esquema ilustrativo da rota biossintética das GAs. Setas em vermelho indicam as enzimas cuja atividade foi reduzida nos mutantes *gib1*, *gib2* e *gib3*, utilizados neste estudo.

2.1.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

O experimento foi realizado em Viçosa (20°45'S, 650 m altitude), Minas Gerais, em casa de vegetação e no Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

Sementes de plantas de tomate do tipo selvagem e mutantes deficientes na biossíntese de GAs, *gib1*, *gib2* e *gib3* (altamente, intermediária e moderadamente deficiente), gentilmente cedidas pelo Dr. Koornneef (Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Colônia, Alemanha), foram utilizadas.

As sementes foram germinadas em placa de Petri (15 cm de diâmetro) contendo duas camadas de papel toalha do tipo germiteste umedecido com solução de GA₄₊₇ 10 µM. Posteriormente, as placas foram acondicionadas em câmara de crescimento do tipo BOD (Forma Scientific, Inc, Ohio, EUA), sob fotoperíodo de 12/12 horas (dia/noite), temperatura 25/16 °C (dia/noite), umidade relativa 65 ± 5 %

e intensidade luminosa de $150 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, por um per\u00edodo de sete dias. Diariamente, as sementes germinadas, com emiss\u00e3o da rad\u00edcula com um cent\u00edmetro de comprimento, foram transferidas para vasos de $0,08 \text{ dm}^3$ contendo substrato comercial Tropstrato HT[®] para hortali\u00e7as e permaneceram nas c\u00e2maras de crescimento at\u00e9 expans\u00e3o das folhas cotiledonares. Os vasos foram mantidos em casa de vegeta\u00e7\u00e3o e, ap\u00f3s o aparecimento de tr\u00eas folhas completamente expandidas, as pl\u00e2ntulas foram transplantadas para vasos de $1,4 \text{ dm}^3$ contendo substrato para hortali\u00e7as suplementado com a formula\u00e7\u00e3o NPK granulada 4:14:8 (equivalente a 4% de $(\text{NH}_4)^+(\text{NO}_3)^-$, 14% de P_2O_5 , 8% de K_2O) na propor\u00e7\u00e3o de 0,5 kg de NPK para 10,0 kg de substrato. Depois de cultivadas por 6 semanas em casa de vegeta\u00e7\u00e3o, aplicou-se o tratamento que consistiu de plantas irrigadas periodicamente (controle, C1), plantas sob defici\u00eancia h\u00eddrica (DH) onde a \u00e1gua foi suprimida totalmente e plantas que passaram por um per\u00edodo de defici\u00eancia h\u00eddrica mas que receberam irriga\u00e7\u00e3o at\u00e9 recupera\u00e7\u00e3o total dos par\u00e2metros fotossint\u00e9ticos, como fotoss\u00edntese e condut\u00e2ncia estom\u00e1tica, (RI). Adicionalmente, para que fosse poss\u00edvel a compara\u00e7\u00e3o da condi\u00e7\u00e3o estressante com a condi\u00e7\u00e3o \u00f3tima ao cultivo, os tratamentos DH e RI apresentaram, cada um, o seu controle, sendo C1 e C2 respectivamente. Plantas do tratamento controle foram irrigadas diariamente a fim de manter-se a umidade do substrato dos vasos pr\u00f3xima \u00e0 capacidade de campo at\u00e9 o fim do experimento. As avalia\u00e7\u00f5es fisiol\u00f3gicas, bem como coletas de folhas e ra\u00edzes para an\u00e1lises bioqu\u00edmicas foram iniciadas quando o potencial h\u00eddrico de pelo menos 50% das plantas de cada gen\u00f3tipo atingiu $-1,3 \text{ MPa}$. A determina\u00e7\u00e3o do potencial h\u00eddrico foi realizada na antemanh\u00e3 com o aux\u00edlio de uma bomba de press\u00e3o do tipo Scholander. Para o tratamento que consistiu de reirriga\u00e7\u00e3o das plantas, o par\u00e2metro utilizado para iniciar as coletas foi a fotoss\u00edntese e condut\u00e2ncia estom\u00e1tica medidos com um Analisador de gases infravermelho em sistema aberto, sendo a m\u00e9dia dos valores das plantas de cada tratamento id\u00eanticos a m\u00e9dia dos valores de plantas totalmente irrigadas (controle, C2) indicando a recupera\u00e7\u00e3o ap\u00f3s o estresse.

As avalia\u00e7\u00f5es foram realizadas em folhas completamente expandidas ap\u00f3s as an\u00e1lises de potencial h\u00eddrico e trocas gasosas para plantas sob defici\u00eancia h\u00eddrica e sob recupera\u00e7\u00e3o acompanhados dos seus controles, C1 e C2, respectivamente.

2.2 ANÁLISES DE CRESCIMENTO E COLETA DE MATERIAL

Durante o experimento, os parâmetros de crescimento foram analisados no que diz respeito à taxa de crescimento relativo em altura. O crescimento das plantas foi monitorado a cada três dias. Para tal, a altura das plantas foi quantificada com auxílio de uma régua milimétrica desde a altura do colo até a gema apical durante todo o experimento. Ao final, foram determinadas a massa seca da parte aérea (folhas e caule) e raiz e área foliar total e área foliar específica. Posteriormente a taxa de crescimento relativo em altura (TCR-h) foi calculada conforme Evans (1972) e Hunt (1982).

Para a determinação da área foliar específica (AFE), oito discos foliares de 0,212 cm² (0,519 cm de diâmetro), foram secos em estufa a 65 °C, até peso seco constante. A área foliar total (AFT) foi estimada a partir da AFE utilizando a massa seca de todas as folhas. A determinação de ambas AFE e AFT foi realizada seguindo protocolo descrito (Mielke et al., 1995). A AFE foi calculada utilizando a fórmula:

$$AFE (m^2 g^{-1}) = \frac{\text{área foliar dos discos } (m^2)}{\text{massa seca dos discos } (g)}$$

Amostras foliares foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até análise. Uma vez coletadas as amostras, as folhas, hastes e raízes foram separadas e imediatamente levadas à estufa com ventilação forçada a 65 °C para obtenção da massa seca (MS) após peso constante. Valores de massa seca, alocação de biomassa de folhas, hastes e raízes e a razão raiz parte aérea (R/PA) foram calculados segundo Benincasa (2003).

2.3 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE TROCAS GASOSAS E DE FLUORESCÊNCIA

A taxa fotossintética (A_N), a condutância estomática ao vapor de água (g_s), a concentração interna de CO₂ (C_i) e a taxa de transpiração foliar (E) foram medidas simultaneamente aos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, no penúltimo folíolo da terceira folha, contada a partir do ápice. Para tal utilizou-se um analisador de

gases a infravermelho em sistema aberto (IRGA – *Infrared Gas Analyzer*), dotado de uma câmara de área amostral de 2 cm², modelo LI 6400XT (LI-COR, Lincoln, NE, EUA), com fluorômetro acoplado (LI-6400-40, LI-COR Inc.). As medições foram realizadas no período de 8:00 às 12:00 h, sob irradiância de 1000 μmol de fótons m⁻² s⁻¹, condição padrão de CO₂ de 400 ppm e sem controle da temperatura da câmara do IRGA. A quantidade de luz azul aplicada foi de 10% da densidade do fluxo fotossintético para maximizar a abertura estomática. A temperatura da casa de vegetação durante as avaliações foi de 23,7 ± 2,5 °C. Além das medições descritas acima, também foram determinadas as taxas respiratórias no escuro (R_d) utilizando-se o mesmo equipamento, durante o período de escuro (entre 21:00 e 01:00 h), após duas horas do término do período luminoso, sendo utilizado o mesmo folíolo usado para determinar os demais parâmetros de fotossíntese.

A determinação da fluorescência da clorofila *a* ocorreu em seguida da aferição da R_d com um fluorômetro acoplado ao IRGA. As folhas foram inicialmente expostas a um fraco pulso de luz vermelho-distante (1-2 μmol de fótons m⁻² s⁻¹), para a determinação da fluorescência inicial (F₀). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de 6000 μmol de fótons m⁻² s⁻¹ e duração de 1 s, foi aplicado para estimar-se a fluorescência máxima emitida (F_m). A fluorescência mínima de folhas adaptadas à luz (F₀') e a fluorescência máxima da clorofila (F_m') foram determinadas utilizando o mesmo equipamento concomitantemente a coleta dos dados de trocas gasosas. Procedeu-se ainda, à estimativa da eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m), da eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (F_v'/F_m'), dos coeficientes de extinção fotoquímica (q_L) e não-fotoquímica (NPQ) e da taxa de transporte de elétrons (ETR), conforme DaMatta e Rena (2002).

Os resultados de A_N, R_d e E foram expressos por unidade de massa (kg) enquanto que g_s e ETR foram expressos por unidade de área (m²).

2.4 DETERMINAÇÃO DO STATUS HÍDRICO DA PLANTA

O status hídrico da planta foi determinado durante o experimento por meio de uma câmara de pressão do tipo Scholander (modelo 1000, PMS Instruments, Albany, NY, USA) na antemãnhã (3:00 - 5:30 horas). O penúltimo folíolo da quarta

folha do ápice para a base foi cortado na inserção do peciólulo e imediatamente colocado na câmara para aferição do potencial hídrico (Ψ_w) (Scholander et al., 1964). Os resultados foram expressos em MPa.

Adicionalmente, o status hídrico também foi determinado mediante o teor relativo de água (TRA), segundo protocolo descrito por Cairo (1995). Após as avaliações não destrutivas, oito discos foliares de 0,212 cm² (0,519 cm de diâmetro) foram coletados de folhas localizadas na base, meio e ápice da planta no fim do experimento. Imediatamente os discos foram pesados para determinação da massa fresca (MF) e colocados em placas de Petri contendo água destilada. Após um período de quatro horas, no qual os discos permaneceram imersos em água, os discos foram secos cuidadosamente entre papel adsorvente sob uma mesma pressão sobre eles, de forma que houvesse a perda da umidade externa sem extravasamento de água dos tecidos, e novamente pesados para obtenção da massa turgida (MT). Posteriormente, os discos foram colocados em sacos de papel e levados a estufa com ventilação forçada à temperatura de 65 °C para obtenção da massa seca (MS) até peso constante. De posse da massa fresca, túrgida e seca, o TRA foi calculado conforme a equação abaixo e os resultados foram expressos em porcentagem.

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

2.5 DETERMINAÇÃO DA PERDA DE ÁGUA EM FOLHA DESTACADA

Para a determinação da perda de água, o penúltimo folíolo da quinta folha completamente expandida, a contar do ápice, foi destacada e imediatamente teve sua massa determinada. Em seguida o folíolo foi mantido com o lado abaxial voltado para cima nas mesmas condições de crescimento das plantas. Durante um período de 2 h foi determinada a massa da folha em intervalos de 10 min. Posteriormente, a perda de água foi calculada como a porcentagem de perda da massa fresca, relativa à massa fresca inicial (Araújo et al., 2011).

2.6 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Para a determinação das atividades das enzimas, metabólitos e danos celulares, amostras foliares foram coletadas no meio do período de luz e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C até o momento do uso.

2.6.1 EXTRAÇÃO ETANÓLICA

Alíquotas de aproximadamente 30 mg de massa fresca macerada foram utilizadas para as análises bioquímicas. As amostras foram submetidas à extração etanólica, a quente, pela adição de 250 µL de álcool etílico 98% aos microtubos de 1,5 mL contendo o macerado. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 20 min, a 80 °C, sob agitação de 822 g. Após esse período os microtubos foram centrifugados a 17.000 g por 10 min a temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em um novo tubo de 1,5 mL. O precipitado resultante foi submetido a outras duas extrações conforme descrito acima, utilizando 150 e 250 µL de álcool etílico 80% e 50%, respectivamente. Os sobrenadantes obtidos nessas etapas foram combinados e, assim como o precipitado resultante, armazenados a -20 °C para análises dos metabólitos como descrito anteriormente (Nunes-Nesi et al., 2007). Os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, foram determinados imediatamente e posteriormente quantificaram-se açúcares, malato, fumarato, aminoácidos totais e nitrato, todos quantificados a partir do extrato etanólico. Proteínas totais e amido foram determinados a partir do precipitado.

2.6.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILAS

Para a determinação de clorofilas *a* e *b* utilizou-se protocolo descrito anteriormente (Porra et al., 1989) por meio de um leitor de microplacas (OptiMax Tunable Microplate Reader). Para tanto, em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados em cada poço 25 µL do extrato etanólico fresco, 25 µL do mix etanólico (contendo etanol 98%, 80% e 50% na proporção 2:1:2, respectivamente) e 120 µL de etanol 98%. Posteriormente foram feitas leituras em dois comprimentos de onda, 665 e 645 nm, correspondendo a clorofilas (Chl) *a* e Chl *b*, respectivamente. Os

teores de clorofilas foram determinados por meio das equações abaixo e expressos em mg g^{-1} de massa fresca (MF).

$$\text{Chl } a = 5,21 * \text{Abs}_{665} - 2,07 * \text{Abs}_{645}$$

$$\text{Chl } b = 9,29 * \text{Abs}_{645} - 2,74 * \text{Abs}_{665}$$

2.6.3 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE AMINOÁCIDOS TOTAIS

O conteúdo de aminoácidos totais foi quantificado conforme previamente descrito (Gibon et al., 2004). Para tanto, em uma microplaca adicionaram-se 25 μL do extrato etanólico, 25 μL de etanol 70%, 50 μL de tampão citrato pH 5,2 acrescido de ácido ascórbico 0,2 % (p/v) e 100 μL de ninhidrina 1% (p/v) em etanol 70% (v/v), em cada poço. A microplaca foi incubada no escuro por 20 min, a 95 °C e centrifugada por 15 segundos a 12.800 g. Posteriormente, foi feita a leitura da placa no comprimento de onda de 570 nm. Para a determinação de aminoácidos totais fez-se a curva de calibração utilizando leucina como padrão, nas concentrações de 0, 0,04, 0,06, 0,20, 0,40 e 1,00 mM. Os dados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

2.6.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE AÇÚCARES

Os teores de glicose, frutose e sacarose foram determinados segundo metodologia descrita anteriormente (Fernie et al., 2001). Inicialmente foi preparado uma mistura (meio de reação) contendo tampão HEPES/KOH 100 mM com MgCl_2 3 mM pH 7, ATP 118 mM, NADP^+ 48,4 mM, e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato - G6PDH (5 mg mL^{-1}). Em uma microplaca, foram adicionados em cada poço 160 μL do *mix*, 25 μL do extrato e 25 μL de etanol 76%. Foram feitas leituras das absorvâncias a 340 nm com intervalos entre leituras de um minuto. Uma vez ocorrida a estabilização da densidade óptica (OD), adicionaram-se 5 μL , sucessivamente, das seguintes enzimas: hexocinase (1,5 U por reação), fosfoglicose isomerase (0.7 U por reação) e invertase (5 U por reação) com intervalos de 20 min entre cada aplicação. Todas as enzimas foram resuspendidas no mesmo tampão do meio de reação. Para estimar a concentração dos respectivos açúcares, resultados

expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$, utilizou-se a seguinte equação, baseada na lei de Lambert-Beer:

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

2.6.5 DETERMINAÇÃO DOS CONTEÚDOS DE MALATO E FUMARATO

Os conteúdos de malato e fumarato foram determinados como descrito anteriormente (Nunes-Nesi et al., 2007). Em cada reação foram adicionados 25 μL de tampão Tricina/KOH 0,4 M com MgCl_2 20 mM pH 9,0, 10 μL de brometo de metiltiazolildifeniltetrazólio - MTT (10 mM), 5 μL de NAD^+ (60 mM), 2 μL de fenazinaetosulfato - PES (20 mM), 5 μL de Triton X-100 10% (v/v), 28 μL de H_2O , adicionando-se ainda 15 μL do extrato etanólico. Por meio de um leitor de microplacas, as leituras foram feitas a 570 nm com intervalo entre leituras de 1 min. Uma vez estabilizado a OD, foram adicionados sucessivamente aos poços 5 μL de malato desidrogenase (1 U por reação) e, após nova estabilização da OD, 5 μL de fumarase (0,1 U por reação). Ambas as enzimas foram ressuspensas no mesmo tampão do meio de reação. A determinação das concentrações de malato e fumarato foram feitas a partir de curvas de calibração utilizando-se o ácido málico e fumárico como padrões. Para a confecção da curva de malato utilizou-se as concentrações de 0, 0,125, 0,25, 0,375, 0,5, 0,75, 0,875 e 1 mM. Para a construção da curva de fumarato utilizou-se as seguintes concentrações: 0, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,15, 0,175 e 0,2 mM. Os resultados desses ácidos orgânicos obtidos foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

2.6.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO

Para a quantificação de nitrato utilizou-se a metodologia descrita previamente (Fritz et al., 2006). Em cada reação foram adicionado 10 μL de tampão fosfato 1 M pH 7,5, 0,5 μL de NADPH 50 mM preparado em NaOH 5 mM, 1 μL de redutase do nitrato (0,005 U por reação) preparada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5, 78,5 μL de H_2O e 10 μL do extrato etanólico. Foram preparadas duas reações para cada

amostra, em uma delas foi adicionado a redutase do nitrato e na outra substituiu-se a enzima por H₂O. A enzima promove a redução do nitrato a nitrito. Desse modo, tornou-se possível quantificar e descontar o conteúdo de nitrito já presente na amostra e quantificar apenas o nitrito oriundo da redução do nitrato na reação em que se adicionou a redutase do nitrato. Uma vez montada a placa com as duas reações em paralelo, a placa foi incubada no escuro, por 30 min, a 25 °C. Posteriormente, adicionaram-se 15 µL de fenazinametossulfato (PMS) 0,25 mM e incubou-se novamente por 20 min a 25 °C. Após esse período, acrescentaram-se a reação 120 µL do *mix* contendo sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 3 M (p/v) e dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina – NED 0,02% (p/v) na proporção de 1:1. Após uma terceira incubação por 10 min a 25 °C, as absorbâncias foram determinadas no comprimento de onda de 540 nm em um leitor de microplacas. A determinação da absorvância correspondente ao nitrato presente nas amostras se deu pela subtração do valor de absorvância de amostras contendo o meio de reação com redutase do nitrato pelas absorvâncias de amostras contendo o meio de reação com exceção da enzima. A determinação do conteúdo de nitrato foi possível a partir da curva de calibração utilizando nitrato de potássio (KNO₃) como padrão nas seguintes concentrações: 0, 0,4, 0,8 e 1,6 µM. Os resultados foram expressos em µM g⁻¹ de MF.

2.6.7 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS

O conteúdo de proteínas solúveis totais foi determinado segundo Gibon e colaboradores (2004). Inicialmente, o precipitado resultante da extração etanólica, fração insolúvel em etanol, foi ressuspensionado em 400 µL de NaOH 0,1 M e homogeneizado. Os microtubos foram incubados por 1 h a 95 °C, sob vigorosa agitação e, após centrifugados por 5 min, 21.023 g, a 4 °C. Uma alíquota de 3 µL do sobrenadante foi retirada dos microtubos e adicionada à microplaca já contendo 180 µL da solução de Bradford (diluição 1:5 do reagente) em cada poço. O comprimento de onda utilizado para leitura da microplaca foi de 595 nm. Pôde-se determinar a concentração de proteína nas amostras após a confecção da curva de calibração, sendo albumina sérica bovina (BSA) o padrão utilizado, nas concentrações de 0,

0,08, 0,16, 0,24, 0,32, 0,40, 0,60, 0,80 mg mL⁻¹. Os resultados foram expressos em mg g⁻¹ MF.

2.6.8 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE AMIDO

A concentração de amido foi determinada como descrito previamente (Ferne et al., 2001). Aos tubos contendo o precipitado resultante da extração etanólica e o NaOH 0,1 M (mesmo extrato utilizado para quantificação de proteínas), foram adicionados 70 µL de ácido acético 1 M para neutralização do extrato, e homogeneizado vigorosamente. Uma alíquota de 40 µL da suspensão foi retirada e colocada em uma microplaca, que continha 60 µL do *mix* de hidrolise do amido, composto pelas enzimas amiloglicosidase (0,14 unidades µL⁻¹) e α-amilase (0,01 U µL⁻¹) ressuspendidas em acetato de sódio 0,5 M pH 4,9. A microplaca foi vedada com fita de alumínio (3M Modelo 425®) e incubada por 1 h a 55 °C, com leve agitação. Posteriormente, a microplaca foi centrifugada por 15 s a 12.800 g e só então retirados e transferidos para uma nova microplaca 15 µL da suspensão. Em cada poço foram adicionados 160 µL do meio de reação composto por tampão Hepes/KOH 1M pH 7,0 MgCl₂ 3 mM, ATP 118 mM, NADP⁺ 48,4 mM e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato– G6PDH (0,7 unidades µL⁻¹). Por meio de um leitor de microplacas, mencionado anteriormente, foram lidas as absorvâncias das respectivas amostras a 340 nm, com 1 min de intervalo entre leituras. Uma vez estabilizado a OD, foram adicionados aos poços 5 µL de hexocinase (2 unidades por reação). O conteúdo de amido foi então calculado com a mesma equação utilizada para determinação de açúcares. Os resultados expressos em µmol de glicose g⁻¹ MF.

2.6.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITO E ENZIMAS ENVOLVIDOS NO METABOLISMO ANTIOXIDATIVO E DANOS CELULARES

2.6.9.1 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação de lipídeos durante o estresse oxidativo foi estimada indiretamente pela determinação do teor de malonaldeído (MDA) segundo metodologia descrita anteriormente (Lima et al., 2002). Alíquotas de

aproximadamente 100 mg de massa fresca foliar foram utilizadas para essa análise. As amostras foram submetidas à extração com ácido tricloracético (TCA). Aos microtubos de 1,5 mL contendo o material macerado foi adicionado 1 mL de TCA 1% (p/v), homogeneizados e centrifugados por 15 min, a 10.000 g a 4 °C. A fração sobrenadante foi transferida para outro microtubo. Esse processo foi realizado duas vezes, os sobrenadantes, misturados em um mesmo microtubo, foram quantificados e o precipitado descartado. A quantificação do MDA ocorreu após adição de 750 µL de TCA 20% com ácido tiobarbitúrico – TBA 0,5%, em um microtubo de rosca já contendo uma alíquota de 500 µL do extrato. Os tubos foram incubados por 30 min a 95 °C com leve agitação e, após esse período, a reação foi paralisada em banho de gelo. Em uma microplaca foram adicionados 300 µL de cada amostra em triplicata. As leituras foram feitas em dois comprimentos de onda, 532 e 600 nm. De posse dos valores de absorbância, as médias das triplicadas foram obtidas e a determinação da concentração de MDA foi determinada pela equação de (Heath e Packer, 1968), como se segue, expressando-se os resultados em nmol g⁻¹ MF.

$$MDA (nmol mL^{-1}) = \frac{(A_{532} - A_{600}) * 10^6}{155000}$$

2.6.9.2 DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO ANTIOXIDATIVO

Para avaliar a atividade de enzimas do sistema antioxidante, 50 mg de massa fresca de folhas foram homogeneizados em meio de extração constituído por tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, DTT 2 mM, ácido ascórbico 20 mM e polivinilpirrolidona – PVPP 4% (p/v). O extrato enzimático bruto foi utilizado para determinação da atividade de catalases (CAT), peroxidases do ascorbato (APX) e dismutase do superóxido (SOD) conforme descrito por Cakmak e Horst (1991).

A atividade da CAT foi determinada a partir de 10 µL do extrato bruto enzimático. Em uma microplaca contendo o extrato foi adicionado o meio de reação composto de 15 µL de tampão fosfato de potássio 1 M, pH 7,0, 245 µL de H₂O. A reação foi iniciada com a adição de 30 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As leituras foram feitas em 240 nm por 3 min, com intervalos de 5 s entre leituras,

observando-se o decréscimo na concentração de H_2O_2 . A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $16,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

Para a atividade da APX, em cada poço de uma microplaca, foram adicionados 5 μL do extrato enzimático e o meio de reação contendo 15 μL de tampão fosfato de potássio 1 M, pH 6,0, 1,5 μL de ácido ascórbico 200 mM e 275,5 μL de H_2O . A reação foi iniciada com adição de 3 μL de H_2O_2 . A APX foi determinada estimando-se a taxa de oxidação do ascorbato nos três primeiros minutos da reação, a 290 nm, com intervalo de 5 s entre as leituras. A atividade foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os resultados expressos em $\mu\text{mol de ácido ascórbico min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

A atividade da SOD foi estimada utilizando-se 10 μL do extrato enzimático (diluído 1:2) e o meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, p-nitro tetrazólio – NBT 75 μM , metionina 13 mM, riboflavina 2 μM e H_2O . Foram montadas duas reações para cada amostra, sendo que uma delas foi incubada no escuro, por 10 min, e a outra permaneceu em uma câmara de luz fluorescente de 15 Watts durante o mesmo período. A reação foi iniciada ao acender a luz. Após o tempo de reação, as leituras foram realizadas em 560 nm. Para os cálculos, a absorvância utilizada foi aquela obtida pela subtração da absorvância da reação no claro pela reação no escuro. A determinação da atividade da SOD é dada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do NBT na presença de luz, e a reação é paralisada com o apagar da luz. A formação da formazana azul, composto arroxeadado, foi facilmente visualizada utilizando o meio de reação sem adição do extrato vegetal (branco). Dessa forma, uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT e os resultados obtidos foram expressos em unidades de SOD $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.6.9.3 DETERMINAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA

Os conteúdos de NAD(H) e NADP(H) foram determinados como descrito anteriormente (Schippers et al., 2008). Para tanto, aproximadamente 30 mg de material fresco foliar macerado foram utilizados para cada uma das duas extrações,

a extração da forma oxidada (NAD^+ e NADP^+) e da forma reduzida (NADH e NADPH), pois são distinguidas pela destruição preferencial em base ou ácido, respectivamente. Para a extração da forma oxidada, em uma alíquota de material macerado foram adicionados 400 μL de HClO_4 0,1 M, homogeneizado e incubado a 4 °C (gelo) por 10 min. Após esse período, foi centrifugado por 10 min, a 21.023 g, a 4 °C, e uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi transferido para outro microtubo, o qual foi incubado por 2 min, a 95 °C. Aos microtubos, já em gelo, foram adicionado 100 μL de KOH 0,1 M em Tris 0,2 M, pH 8,4 e, após 15 min em gelo, o extrato foi diluído na proporção de 1:2. O processo de extração para a forma reduzida foi o mesmo, entretanto, a solução extratora nesse caso foi KOH 0,1 M e a solução neutralizante foi HClO_4 0,1 M em Tris 0,2, pH 8,4.

A concentração de NAD^+ foi determinada utilizando-se 10 μL do extrato, 90 μL de H_2O e 50 μL do *mix* de reação contendo 15 μL de tampão Tricina/ KOH 1 M, pH 9,0, 1,2 μL EDTA 0,5 M, 20 μL de MTT 9 mM, 0,5 μL de PES 30 mM, 4,4 μL de etanol 100%, 0,9 μL de desidrogenase álcoolica do estoque de 2000 unidades mL^{-1} e 8 μL de H_2O . Após incubar a microplaca por 5 min a 30 °C, foram realizadas as leituras no comprimento de onda de 570 nm, durante um período de 40 min, com intervalos entre leituras de 1 min. A determinação do conteúdo de NAD^+ foi possível a partir da curva de calibração utilizando NAD^+ como padrão, nas seguintes concentrações: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 pmol. Os resultados foram expressos em nmol de NAD^+ g^{-1} MF. Seguiu-se com o mesmo procedimento para determinação do NADH , sendo o NADH o padrão para construção da curva.

Para a determinação do conteúdo de NADP^+ , uma alíquota de 10 μL do extrato foi adicionada em uma microplaca e, além de 90 μL de H_2O , adicionou-se o meio de reação contendo 15 μL tampão Tricina/ KOH 1 M, pH 9,0, 1,2 μL de EDTA 0,5 M, 20 μL de MTT 9 mM, 0,5 μL de PMS 30 mM, 2,5 μL de glicose-6-fosfato – G6P 180 mM, 0,645 μL de G6PDH grade I (700 unidades mL^{-1}) em tampão tricina e 10,16 μL de H_2O . Após incubar a microplaca por 5 min, a 30 °C, as leituras foram realizadas no comprimento de onda de 570 nm, durante um período de 40 min, com intervalos entre leituras de 1 min. A determinação do conteúdo de NADP^+ foi possível a partir da curva de calibração utilizando NADP^+ como padrão nas seguintes concentrações: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 pmol. Os resultados foram

expressos em nmol de NADP⁺ g⁻¹ MF. Seguiu-se com o mesmo procedimento para determinação do NADPH, sendo o NADPH o padrão para a confecção da curva.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental usado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4x4, correspondendo a quatro regimes hídricos: (i) plantas irrigadas (C1), controle do tratamento sob deficiência hídrica, (ii) plantas sob deficiência hídrica (DH), (iii) plantas irrigadas, controle do tratamento de reirrigação (C2), e (iv) plantas reirrigadas, recuperação após passar por período de seca (RI). Também foram utilizados quatro genótipos (WT, *gib3*, *gib2* e *gib1*), com seis repetições para cada tratamento, considerando-se como repetição cada indivíduo amostrado. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, para verificar diferença estatística entre os genótipos em cada um dos tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste *t Student* a 5% de probabilidade ($P < 0,05$), comparando sempre as linhagens mutantes ao tipo selvagem (WT), com auxílio dos algoritmos presentes no programa Microsoft Excel® (Microsoft, Seattle).

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DE PLANTAS MUTANTES COM REDUÇÃO NOS NÍVEIS ENDÓGENOS DE GA

Plantas do tipo selvagem (WT) e mutantes na biossíntese de GA (*gib3*, *gib2* e *gib1*) apresentaram um fenótipo distinto quando comparadas entre si. Observou-se que, em condições ótimas (C) ao cultivo das plantas, o crescimento de plantas WT e *gib3* foi semelhante, enquanto plantas *gib2* e *gib1* apresentaram menor crescimento, entretanto semelhante entre esses genótipos (Figura 2). Adicionalmente, foi observado que folhas das plantas mutantes apresentaram cor verde escura quando comparado ao WT, principalmente os genótipos *gib2* e *gib1*. Cumpre ressaltar que essa coloração verde intensa de *gib2* e *gib1* não se correlaciona com os teores de clorofila (Chl) (Figura 10). Este fato foi atribuído à morfologia e anatomia das folhas, caracterizadas pelo encarquilhamento e engrossamento foliar (Figura 2).

Ao serem submetidas à condição de deficiência hídrica (DH) por oito dias, verificou-se que ao passo que as plantas WT e *gib3* apresentaram sintomas visíveis de murcha, as plantas *gib2* e *gib1* não apresentaram qualquer sintoma de murcha. Assim, plantas *gib2* necessitaram de 15 dias sob estresse para apresentar murcha aparente. Por outro lado, as plantas do genótipo *gib1*, mesmo em condições de falta de água por 20 dias, não apresentaram sinais de murcha aparente (Figura 2). É importante destacar que o período sob deficiência hídrica necessário para que todos os genótipos atingissem o potencial hídrico (Ψ_w) de -1,3 MPa foi variável, e plantas mutantes, com menor conteúdo endógeno de GA, necessitaram de um maior tempo para chegar ao Ψ_w desejado (Figura 3). Com o intuito de verificar a recuperação das plantas ao estresse hídrico, após alcançarem um Ψ_w de -1,3 MPa, foram imediatamente reirrigadas. Verificou-se claramente que no dia seguinte a reirrigação (RI), as plantas apresentaram-se completamente turgidas (Figura 2).

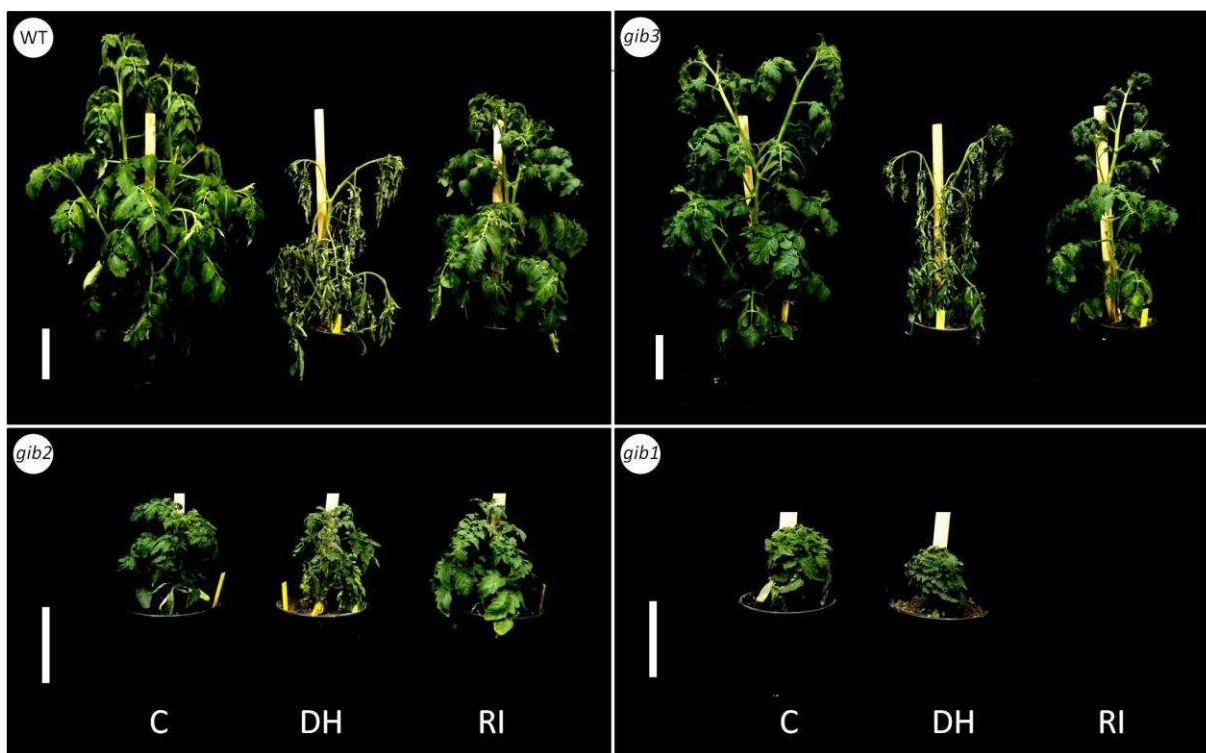


Figura 2. Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) com baixos níveis de giberelinas endógenas, *gib3*, *gib2* e *gib1*, ao final de oito, 15 e 20 dias sob deficiência hídrica, respectivamente. C representa o tratamento controle em que as plantas foram irrigadas durante todo o experimento; DH representa tratamento de deficiência hídrica no qual as plantas permaneceram sem irrigação por um período de oito, 15 e 20 dias para *gib3*, *gib2* e *gib1*, respectivamente; e RI, tratamento de reirrigação, no qual as plantas passaram por um período de deficiência hídrica (variável para cada genótipo) e posteriormente foram reirrigadas até recuperação de parâmetros fisiológicos. Barras verticais representativas equivalentes a 11,5 cm.

4.2 AVALIAÇÃO DO STATUS HÍDRICO EM PLANTAS MUTANTES NA BIOSÍNTESE GAS

O *status* hídrico de plantas WT e mutantes na biossíntese de GA foi determinado diariamente durante 23 dias após aplicação dos tratamentos (Figura 3). Como descrito acima, observou-se que plantas WT e *gib3* atingiram o Ψ_w próximo a -1,3 MPa após oito dias de suspensão da irrigação, enquanto *gib2* e *gib1* atingiram o mesmo Ψ_w somente após 15 e 20 dias, respectivamente (Figura 3A). Posteriormente, ao alcançarem o Ψ_w de -1,3 MPa, as plantas foram reirrigadas e após um dia de irrigação o Ψ_w retornou a valores próximo de zero, com exceção de plantas do genótipo *gib2* que necessitaram de dois dias para a recuperação do Ψ_w próximo a zero (Figura 3C).

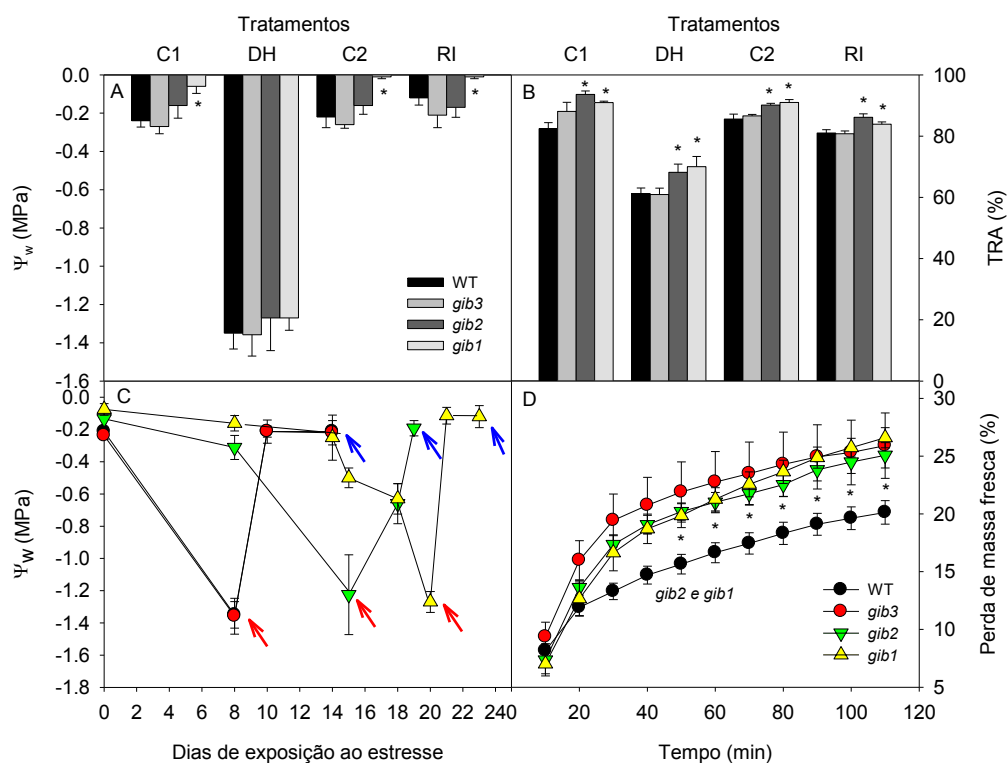


Figura 3. Variação no *status* hídrico em resposta aos diferentes níveis de GAs endógenos e deficiência hídrica em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker). Potencial hídrico (Ψ_w) de folhas de plantas com diferentes níveis endógenos de GAs ao fim de cada tratamentos (A); teor relativo de água (TRA) das plantas ao final da exposição de cada tratamento (B); Ψ_w de folhas de plantas com reduzidos níveis endógenos de GAs durante os dias de exposição ao estresse hídrico (C) e; Perda de água de folhas destacadas de plantas mutantes na biossíntese de GAs com 8 semanas de cultivo durante duas horas (D). Valores estão apresentados como medias \pm erro padrão de pelo menos seis plantas. Setas em vermelho indicam pontos de coleta de amostras do tratamento com plantas sob deficiência hídrica (DH) e seu respectivo controle (C1). Setas em azul indicam pontos de coleta de amostras do tratamento com plantas que passaram por um período de seca e recuperaram os parâmetros fisiológicos (RI) e seu respectivo controle (C2). Asterisco na figura D indica o momento (em minutos) onde os valores dos mutantes *gib2* e *gib1* mostram-se significativamente diferentes ($P < 0.05$) pelo teste *t* de Student em relação ao WT. Asterisco das figuras A e B indicam diferença significativa pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade ($P < 0,05$) entre genótipos em um mesmo tratamento, comparando sempre em relação ao WT.

Adicionalmente, o *status* hídrico também foi determinado por meio do teor relativo de água (TRA) (Figura 3C) no dia da coleta de amostras de cada tratamento como indicado pelas setas vermelhas e azuis na Figura 3A. Em condições ótimas (C1 e C2) e após a reirrigação, maiores valores de TRA, superiores a 80% para o WT e os genótipos mutantes foram observados, no entanto, os genótipos *gib2* e *gib1* apresentaram valores significativamente superiores quando comparados ao WT.

Sob deficiência hídrica, reduções no TRA foram observadas, chegando a 61% para WT e *gib3* enquanto para *gib2* e *gib1* os valores foram iguais a 68% e 70%, respectivamente.

Para tentar entender o fato de plantas mutantes com níveis endógenos de GA reduzidos alcançarem mais tardiamente o Ψ_w -1,3 MPa, realizou-se um ensaio para avaliar a perda de água em folhas destacadas (Figura 3B). Surpreendentemente, os mutantes *gib3*, *gib2* e *gib1* apresentaram taxas de perdas semelhantes ao WT apenas nos primeiros 50 min, posteriormente, maiores perdas de massa fresca em relação ao WT foram observadas nos genótipos. Dessa forma, após 50 minutos *gib3*, *gib2* e *gib1* apresentaram 22%, 20% e 19% de perda de água, respectivamente, ao passo que em plantas WT essas perdas chegaram a 16%. Apesar de as plantas mutantes apresentarem maior perda de água, apenas *gib2* e *gib1* diferiram significativamente do WT após os 50 min de análise.

4.3 ANÁLISES BIOMÉTRICAS DE PLANTAS MUTANTES NA BIOSÍNTESE GAS

Os parâmetros de crescimento avaliados apresentaram os menores valores em plantas mutantes com baixos níveis endógenos de GAs quando comparados aos das plantas WT (Figura 4). Ao final do experimento, foram determinadas as alturas absolutas de plantas WT e dos mutantes (Figura 4A). Como esperado, verificou-se que plantas *gib2* e *gib1*, com menores níveis de GA, apresentaram menor crescimento quando comparadas ao WT. Interessante que as plantas do mutante *gib3* apresentaram maior altura que o WT, diferindo significativamente no tratamento em que plantas foram submetidas à deficiência hídrica (DH) e seu controle (C1). No tratamento DH e RI, pôde-se observar uma leve redução na altura final em plantas WT e *gib3*.

Durante a condução do experimento, medições de altura foram realizadas em intervalos de três dias e a taxa de crescimento relativo em altura (TCR-h) antes da aplicação do estresse e durante o estresse foram calculadas (Figura 4B e C). Observou-se que plantas *gib2* e *gib1* obtiveram TCR-h reduzidas em condições normais de cultivo (Figura 4B). Durante o estresse hídrico, observou-se que as TCR-h das plantas *gib2* e *gib1* foram superiores às do controle WT. Entretanto, sob esta mesma condição, plantas WT e *gib3* diminuíram consideravelmente seu crescimento

comparado com os mesmos genótipos no tratamento controle (C1). Após a reirrigação, o WT e os mutantes retomaram seu crescimento normal observado em C2.

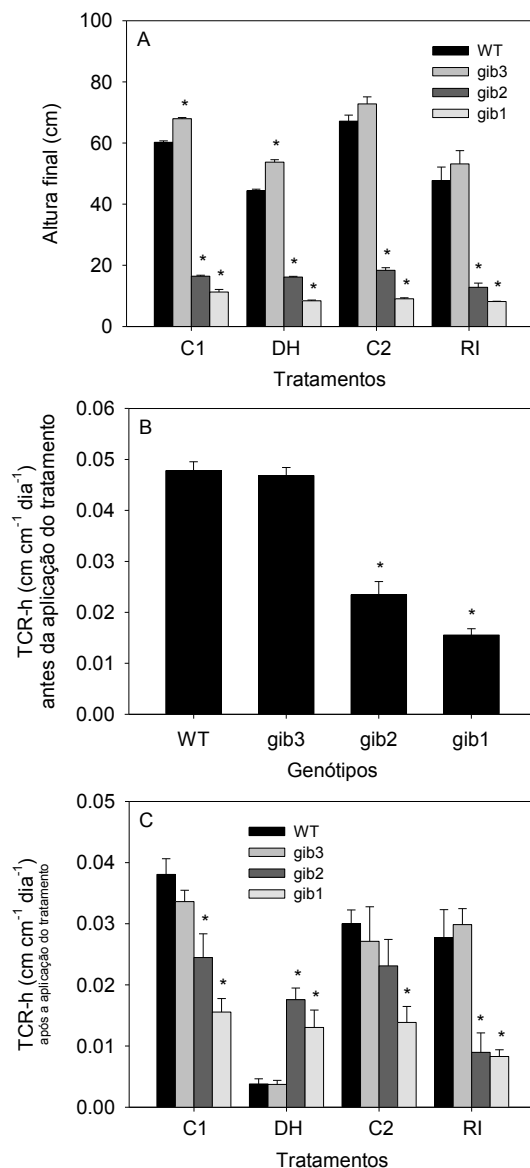


Figura 4. Variação em parâmetros de crescimento relacionados com altura de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker) em resposta à deficiência hídrica. Altura das plantas ao final do experimento (A); taxa de crescimento relativo em altura (TCR-h) de plantas antes da aplicação dos tratamentos (B); e TCR-h após a aplicação da deficiência hídrica (C). Valores representam médias \pm erro padrão de pelo menos seis plantas. Asterisco indica diferença significativa pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade ($P < 0,05$) entre genótipos em um mesmo tratamento, comparando sempre os mutantes com o tipo selvagem.

A baixa concentração endógena de GAs em plantas mutantes promoveu reduções na área foliar total (AFT) e específica (AFE), na massa seca de folhas (MSF), de hastes (MSH), de raízes (MSR), total (MST), na razão raiz/parte aérea (R/PA) e conseqüentemente na alocação de biomassa (Figura 5), independentemente de alterações promovidas por fatores externos sendo, portanto, característica intrínseca ao genótipo mutante. A AFT foi menor nas plantas mutantes (*gib3*, *gib2* e *gib1*) em todas as condições testadas (Figura 5A). A exposição de plantas a deficiência hídrica (DH), mesmo naquelas em que a irrigação é retomada (RI), ocasionou em redução da AFT tanto em plantas mutantes como no WT, sendo as reduções mais drásticas em plantas com reduzidos níveis de GAs. Em se tratando de AFE, os resultados foram semelhantes aos encontrados para AFT em que plantas mutantes apresentam menor AFE em todas as condições testadas com exceção do tratamento controle (C2) utilizado para comparações com o tratamento RI (Figura 4B). Adicionalmente, destaca-se que os dois tratamentos controles (C1 e C2) são compostos de plantas com idades distintas, uma vez que cada um deles serviu de parâmetro de comparação para o tratamento de deficiência hídrica (DH) e para o de reirrigação (RI), respectivamente. Tal fato pode explicar, em parte, os resultados distintos destes tratamentos onde plantas permaneceram irrigadas durante todo o experimento.

Ao final do experimento, foram realizadas coletas e determinados a massa seca dos órgãos da planta bem como a MST, R/PA e alocação de biomassa (Figura 5). A MSF (Figura 5C), MSH (Figura 5D), MSR (Figura 5E) e a MST (Figura 5F) foram reduzidas em plantas mutantes contendo os menores níveis endógenos de GA, quando comparados ao WT, em todos os tratamentos analisados, sendo as reduções mais drásticas nos genótipos *gib1* e *gib2*, respectivamente. Quando as plantas foram submetidas ao tratamento de DH, houve uma maior redução da MSF, MSH e MST quando comparada ao do tratamento C1, enquanto a MSR foi reduzida apenas em plantas WT e *gib3*. Plantas no tratamento RI também apresentaram reduções na massa seca dos órgãos da planta e na total quando comparadas ao tratamento C2. Isso ocorreu devido ao período de oito, 15 e 20 dias sob deficiência hídrica ao qual foram submetidos os genótipos WT e *gib3*, *gib2* e *gib1*, respectivamente.

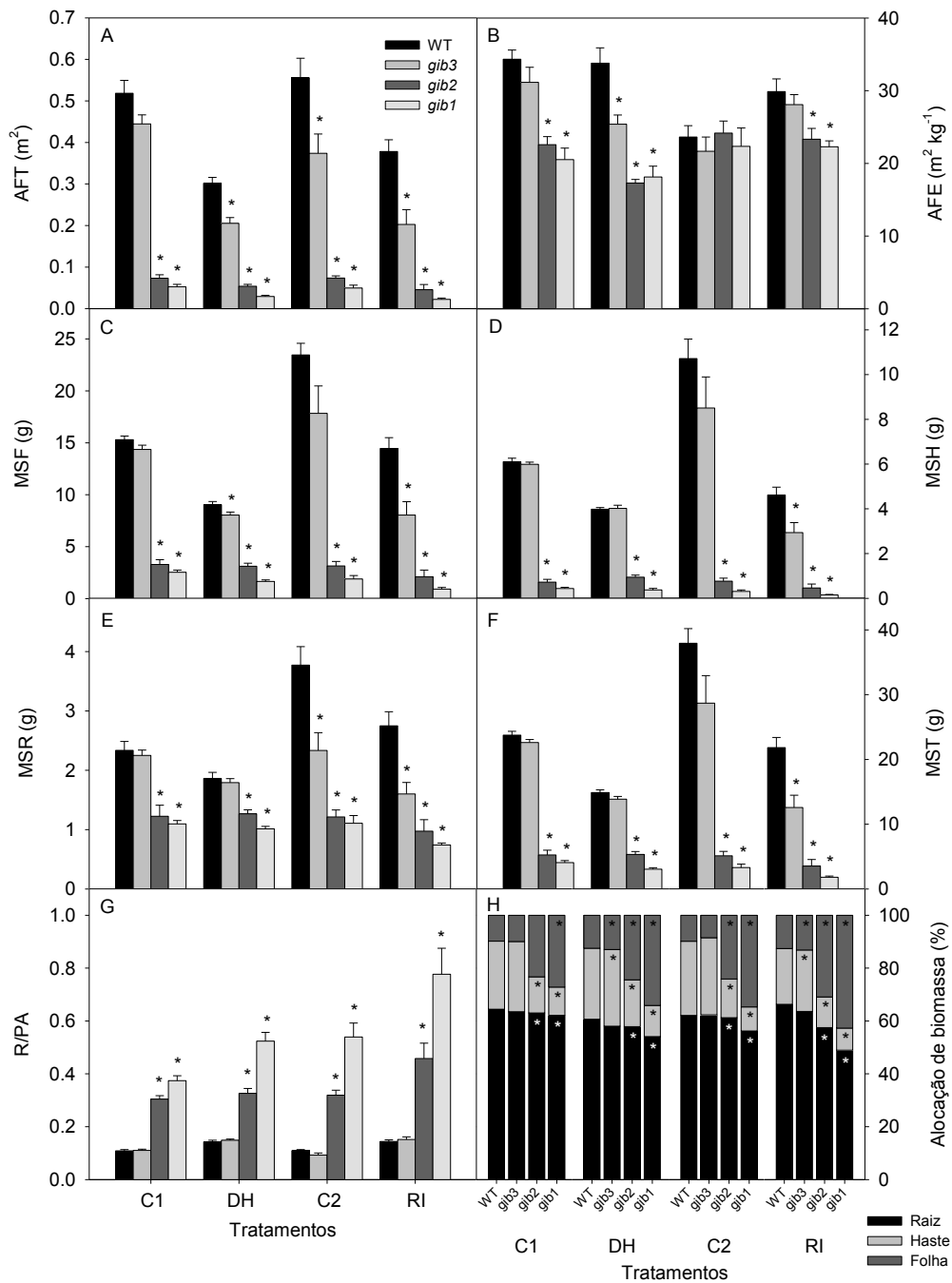


Figura 5. Variação de parâmetros biométricos em resposta a deficiência hídrica em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker). Área foliar total (AFT) (A); área foliar específica (AFE) (B); massa seca de folhas (MSF) (C); massa seca de hastes (MSH) (D); massa seca de raiz (MSR) (E); massa seca total da planta (MST) (F); razão entre raiz e parte aérea (R/PA) (G) e; alocação de biomassa (H) onde barras representam o percentual da MST de cada órgão. Valores estão apresentados como médias \pm erro padrão de pelos menos seis plantas. Análise estatística conforme descrito na Figura 4.

A razão entre raiz e parte aérea indicou que plantas *gib2* e *gib1* apresentaram uma maior alocação de biomassa em raízes em todos os tratamentos, fato este que pode explicar o maior tempo necessário para observação de murcha nessas plantas quando comparadas as WT e *gib3*. Assim, os maiores valores de R/PA sugerem que esses mutantes dispõem de uma maior área de raiz para absorver água do solo e uma menor área transpirante, diminuindo assim as perdas de água por transpiração (Figura 5G). Os valores absolutos da razão R/PA aumentaram no tratamento DH e no RI, demonstrando que, sob escassez de água, as plantas têm um maior investimento em raízes com o intuito de aumentarem a área de absorção de água e também para o alongamento das raízes em busca de água em locais mais profundos. Os resultados de alocação de biomassa confirmam que plantas *gib2* e *gib1* apresentam uma elevada taxa de alocação de biomassa em raízes, seguido de folhas e hastes, enquanto WT e *gib3* apresentam maior alocação de biomassa também em raízes, seguido de hastes e folhas neste caso (Figura 5H).

4.4 PARÂMETROS DE FLUORESCÊNCIA E FOTOSÍNTESE EM PLANTAS MUTANTES COM BAIXOS NÍVEIS ENDÓGENOS DE GAS SOB DEFICIÊNCIA HÍDRICA

De forma geral, a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) (F_v/F_m) embora tenha sido afetada negativamente em *gib2* no tratamento DH e positivamente em *gib3* em C1 e RI e em *gib1* no tratamento C1 apenas, esse parâmetro foi superior a 0,80 indicando que tanto o cultivo das plantas em condições ótimas quanto naquela sob deficiências hídrica não ocasionaram danos severos a cadeia de transporte de elétrons cloroplastídica e ao FSII (Figura 6A). Entretanto, foram observados maiores diferenças entre genótipos quanto à eficiência de captura dos centros de reação (F_v'/F_m') (Figura 6B). Foram também observadas diferenças significativas em *gib3* e *gib1* nos dois tratamentos controle (C1 e C2) enquanto que plantas sob deficiência hídrica apresentaram redução em *gib2* e plantas que foram reirrigadas após um período de deficiência hídrica apresentaram incremento nos genótipos *gib3* e *gib1*, sendo estatisticamente diferente do WT apenas este último neste tratamento. Além disso, os valores absolutos de F_v'/F_m' no WT e mutantes foram inferiores a 0,80. Dessa forma, as plantas apresentaram um certo grau de

estresse durante o dia e parecem se recuperar durante a noite, até mesmo no tratamento DH.

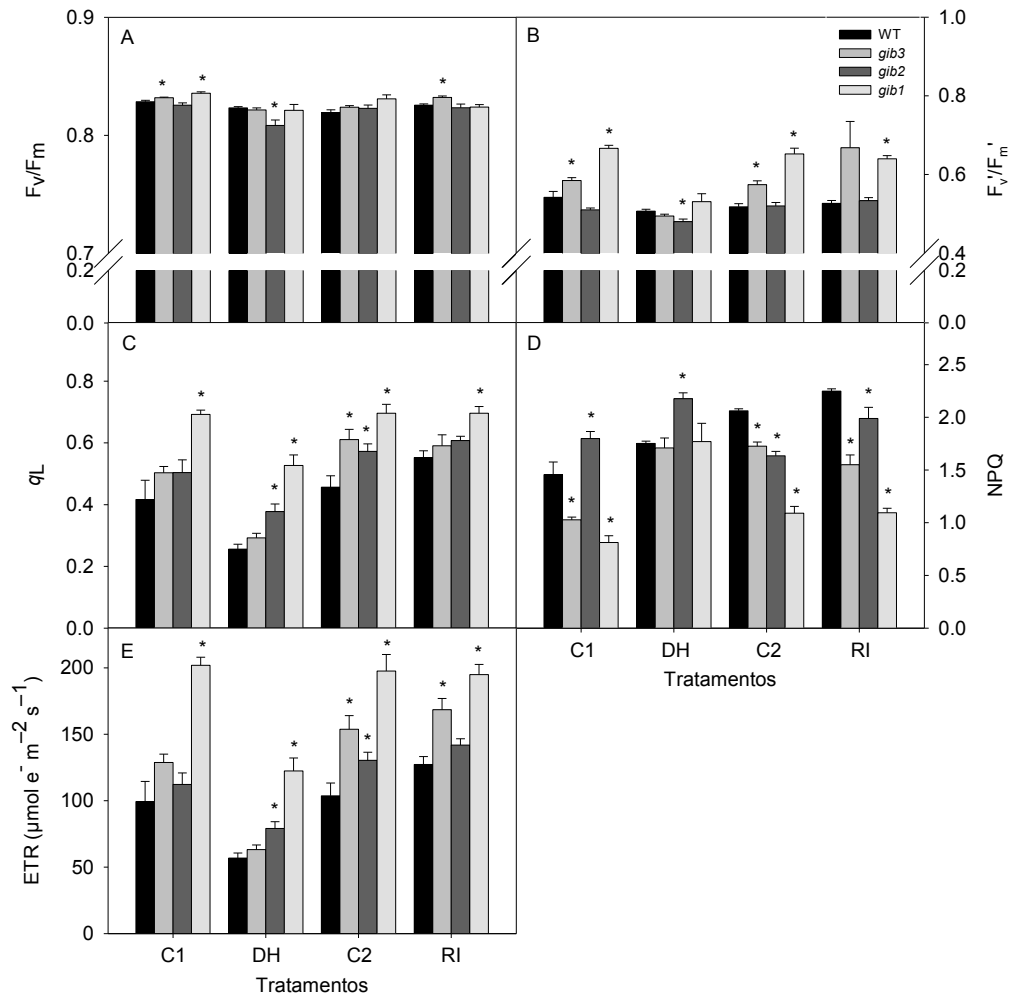


Figura 6. Variação nos parâmetros de fluorescência da clorofila a em resposta aos diferentes níveis endógenos de GAs e deficiência hídrica em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker). Eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m) (A); rendimento quântico efetivo do transporte de elétrons no FSII (F_v'/F_m') (B); coeficiente de extinção fotoquímica (q_L) (C); coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) (D) e; taxa de transporte de elétrons (ETR) (E). Valores estão apresentados como médias \pm erro padrão de pelos menos seis plantas. Análise estatística conforme descrito na Figura 4

O coeficiente de extinção fotoquímica (q_L) foi variável entre os genótipos em todos os tratamentos (Figura 6C). As condições de seca (tratamento DH) ocasionaram reduções em WT e *gib3*, não sendo tão drásticas em *gib2* e *gib1* que

diferiram significativamente do WT. Em condições de seca com posterior irrigação (tratamento RI), as plantas recuperaram os valores de qL tanto do WT quanto dos genótipos mutantes. O coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) apresentou um padrão variável entre os genótipos (Figura 6D). Em condições controle (C1), *gib3* e *gib1* apresentaram menores valores enquanto que *gib2* mostrou incrementos no NPQ. Sob deficiência hídrica, *gib2* também apresentou os maiores valores diferindo do WT. Plantas mutantes e o WT apresentaram reduções significativas nos tratamentos RI e seu respectivo controle (C2).

O efeito do genótipo foi evidente na taxa de transporte de elétrons (ETR) observando-se incrementos em *gib3*, *gib2* e *gib1* quando comparados ao WT, ainda que em alguns tratamentos esses incrementos não tenham sido significativos, é muito clara a tendência de aumento dos valores de ETR nos genótipos mutantes em relação ao WT em cada uma das condições analisadas (Figura 6E). Plantas *gib2* e *gib1* apresentaram maior ETR diferindo significativamente do WT quando submetidas a condições de estresse hídrico. Após a reirrigação, os genótipos *gib3* e *gib1* apresentaram as maiores taxas de transporte de elétrons. Em todas as condições em que as plantas foram submetidas, pôde-se observar que em *gib1* os valores de ETR foram extremamente aumentados quando comparados ao WT.

Durante o cultivo das plantas nas diferentes condições testadas, foi monitorada a taxa de assimilação líquida de CO₂ (A_N) no início da aplicação do tratamento de deficiência hídrica e após a reirrigação até o momento em que fosse observada total recuperação das plantas no que diz respeito a este parâmetro, ou seja, quando a média dos valores de A_N de plantas reirrigadas (RI) estivessem próximos a médias dos valores de plantas irrigadas durante todo o experimento (C2) (Figura 7). Assim, quando as plantas atingiram o Ψ_w -1,3 MPa (como citado anteriormente, Figura 3C) foram realizadas as análises de trocas gasosas correspondendo aos dias oito, 15 e 20 após a suspensão da irrigação para WT e *gib3*, *gib2* e *gib1*, respectivamente (Figura 7). Pôde-se observar que, plantas ao atingirem o Ψ_w desejado, apresentaram reduzidos valores de A_N , principalmente em plantas WT e *gib3*, ao passo que *gib2* e *gib1* apresentaram menores reduções.

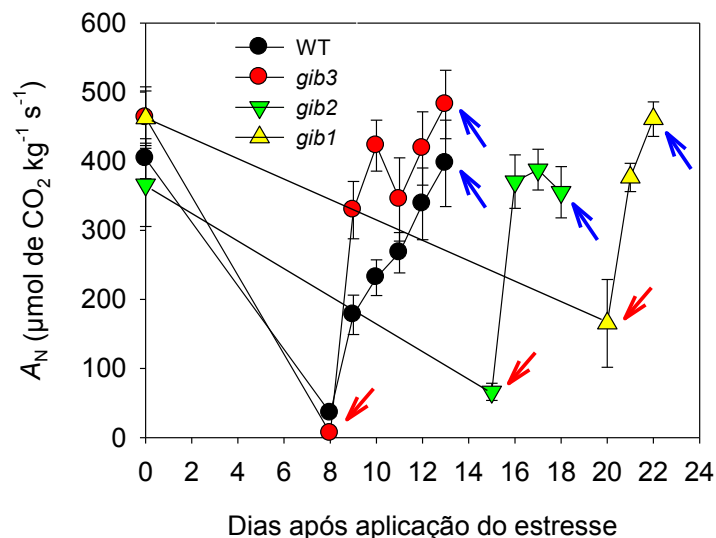


Figura 7. Alteração nos valores de fotossíntese líquida de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker) com baixos níveis de GAs em resposta as condições testadas durante o período de aplicação dos tratamentos. Valores estão apresentados como médias \pm erro padrão de pelos menos seis plantas. Setas em vermelho indicam pontos de coleta de amostras do tratamento com plantas sob deficiência hídrica (DH) e seu respectivo controle (C1). Setas em azul indicam pontos de coleta de amostras do tratamento com plantas que passaram por um período de seca e recuperaram os parâmetros fisiológicos (RI) e seu respectivo controle (C2). Análise estatística conforme descrito na Figura 4.

Posteriormente a reirrigação, apesar do Ψ_w das plantas atingirem valores próximos de zero já no dia seguinte, as plantas necessitaram de um período de tempo maior para recuperar os parâmetros fisiológicos, representados pela A_N . Dessa forma, WT e *gib3*, que apresentam similaridades fenotípicas entre si, apresentaram A_N similar ao das plantas controle após cinco dias da reirrigação, enquanto *gib2* e *gib1* recuperam a A_N após três e dois dias da reirrigação, respectivamente. Tais resultados evidenciam novamente o efeito do genótipo sobre os tratamentos, sendo aqueles com menores concentrações endógenas de GAs os que apresentaram recuperação mais rápida e menor perda de água atrasando, em dias, o momento em que o Ψ_w alcançou os valores desejados e, conseqüentemente, não apresentaram reduções tão discrepantes na A_N quando comparados ao WT e *gib3* (Figura 7).

Tendo em vista a importância do processo fotossintético e respiratório sobre os parâmetros de crescimento, análises de trocas gasosas e respiração no escuro foram realizadas em plantas WT e mutantes na biossíntese de GA no dia da coleta de cada tratamento (setas na Figura 7 indicam os pontos de coleta). De forma geral, as plantas mutantes exibiram uma tendência de maiores valores nos parâmetros instantâneos de trocas gasosas analisados (Figura 8). A A_N de plantas WT e mutantes apresentou um padrão variável entre os genótipos dentro de cada tratamento (Figura 8A). Em C1 houve redução na A_N em *gib2* enquanto os outros genótipos não diferiram do WT. Sob DH, todos os genótipos apresentam drástica redução em A_N principalmente plantas *gib3* enquanto que as *gib1* apresentaram os maiores valores. No tratamento RI e C1 houve incremento nas taxas fotossintéticas nos genótipos mutantes quando comparados ao WT em cada condição. A fotossíntese por unidade de massa e TCR em *gib2* e *gib1* apresentou uma relação diretamente proporcional sob deficiência hídrica sugerindo que os baixos níveis de GAs ocasionaram em investimento no crescimento em altura mesmo sob estresse. De forma inversa, foi observada uma relação inversamente proporcional entre fotossíntese por unidade de massa e crescimento em massa seca em ambos os tratamentos indicando que plantas com baixo níveis de GAs endógenos acumulam pouca massa seca mesmo tendo uma maior taxa fotossintética. Dessa forma, parece que plantas deficientes na biossíntese de GA investem em A_N na tentativa de manutenção do metabolismo e não propriamente no acúmulo de biomassa.

A condutância estomática (g_s) apresentou a mesma tendência observada para A_N verificando-se que as plantas com baixos níveis de GAs apresentaram maior g_s (Figura 8B). Interessante observar que em todas as condições testadas as plantas mutantes apresentaram maiores valores de g_s , até cinco vezes mais que nas plantas WT, com exceção do tratamento DH onde g_s foi apenas levemente superior ao selvagem. Em condições ótimas ao cultivo (C1 e C2) as plantas mutantes apresentaram aumentos significativos na g_s , com exceção de *gib3* no tratamento C1. Quando as plantas foram expostas a deficiência hídrica, houve redução da g_s em todos os genótipos, quando comparados ao controle, sendo as reduções mais drásticas em plantas com níveis de GAs adequados. Após a reirrigação, a g_s das plantas foi reestabelecida e os genótipos mutantes apresentaram ainda maiores valores em relação ao WT. Semelhantemente a g_s , os mutantes apresentaram

maiores valores de transpiração (E) (Figura 8C). O tratamento de deficiência hídrica interferiu negativamente na E das plantas enquanto plantas $gib1$ apresentaram os maiores valores que os demais genótipos. Após recuperação do estresse, verificou-se que as taxas transpiratórias foram incrementadas nos mutantes.

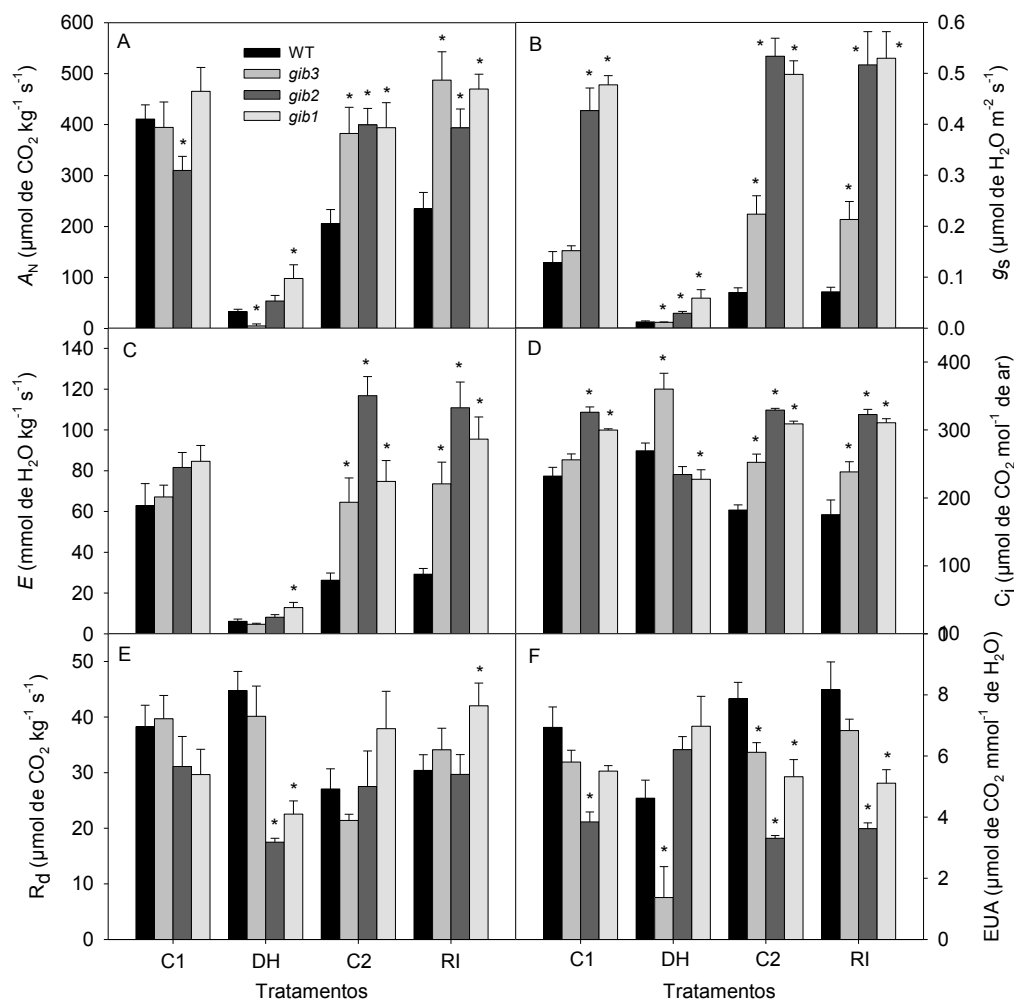


Figura 8. Variação nos parâmetros de tocas gasosas em resposta aos diferentes níveis endógenos de GAs em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) submetidas a deficiência hídrica. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A_N) (A); Condutância estomática (g_s) (B); Taxa de transpiração (E) (C); Concentração interna de CO₂ (C_i) (D); Taxa de respiração no escuro (R_d) (E) e; Eficiência instantânea do uso da água (EUA) (F). Valores estão apresentados como médias \pm erro padrão de pelos menos seis plantas. Análise estatística conforme descrito na Figura 4.

A concentração interna de CO₂ (C_i) também foi calculada para que fosse possível uma inferência a respeito de limitações difusivas e bioquímicas da fotossíntese quando tomados em conjunto com os dados de trocas gasosas (Figura 8D). Verificou-se que as plantas com baixos níveis de GAs apresentaram maior C_i em nos tratamentos C1, C2 e RI quando comparados aos de WT. Sob o tratamento DH observou-se maiores valores de C_i para *gib 3* e menores para *gib 2* e *gib 1* (significativamente para *gib 1* apenas).

Em geral, observou-se que a taxa respiratória (R_d) não diferiu drasticamente entre os genótipos (Figura 8E). Entretanto, quando as plantas foram submetidas à DH, os genótipos *gib 2* e *gib 1* apresentaram redução na R_d e, quando foram reirrigadas, apenas o genótipo *gib 1* apresentou alta R_d. Sob deficiência hídrica, verificou-se que *gib 2* e *gib 1* apresentaram maiores valores de eficiência instantânea do uso da água (EUA) comparado ao WT (Figura 8F). Entretanto, após o estresse nas condições RI e C2, todos os genótipos mutantes apresentaram reduzidas EUA.

4.5 EFEITOS DE BAIXOS NÍVEIS ENDÓGENOS DE GAS SOBRE O METABOLISMO DO CARBONO E DO NITROGÊNIO EM RESPOSTA A DEFICIÊNCIA HÍDRICA

Com o intuito de compreender o impacto das GAs sobre o metabolismo do carbono e do nitrogênio sob condições de estresse por deficiência hídrica, foi realizada uma caracterização bioquímica de folhas dos genótipos utilizados. De modo geral, foram observadas várias alterações nos níveis de compostos associados ao metabolismo do carbono e do nitrogênio em função dos níveis endógenos de GA e em função das condições ambientais as quais as plantas foram submetidas (Figura 9 e 10).

Os conteúdos de glicose e frutose apresentaram-se semelhantes no que diz respeito ao tratamento C1 e DH, sendo que neste último tratamento foram verificadas reduções no conteúdo destes carboidratos nas plantas mutantes (Figura 9A e B). Entretanto, verifica-se que a exposição das plantas a deficiência hídrica favorece o acúmulo de glicose e frutose em todos os genótipos quando comparado ao tratamento controle (C1), mesmo com valor significativamente menor em *gib 1* para frutose em DH. Após a reirrigação, os níveis desses açúcares em *gib 2* e *gib 1* também foram reduzidos quando comparados ao WT e, em plantas *gib 3*, também

houve menor acúmulo de frutose. Dentre os açúcares quantificados, a sacarose foi o açúcar que menos se acumulou em WT e *gib3*, enquanto em *gib2* e *gib1* apresentou os valores mais elevados, nos tratamentos analisados (Figura 9C). O efeito do genótipo foi evidenciado em plantas mutantes quando cultivadas em condições ótimas (C1 e C2). Nos tratamentos DH e RI não foram observadas diferenças significativas no conteúdo de sacarose.

A concentração de amido ao meio dia foi reduzida nos genótipos mutantes nos tratamentos controle (C1 e C2) (Figura 9D). Entretanto, sob a deficiência hídrica observaram-se maiores teores de amido nos genótipos *gib2* e *gib1*. Quando a irrigação foi restabelecida, o comportamento das plantas WT e mutantes foi semelhante as plantas mantidas sob condições ótimas durante todo o período.

Em adição aos principais açúcares solúveis e amido, dois ácidos orgânicos foram quantificados (Figura 9E e 9F). Observou-se que a deficiência hídrica levou a incrementos nos teores de malato em *gib2* e *gib1* e reduções em *gib3* (Figura 9E). No tratamento RI, também foram verificadas reduções nos níveis de malato nos genótipos mutantes com diferenças significativas em *gib2* e *gib1*. Interessante ressaltar que sob condições ótimas (C1 e C2) não foram observadas diferenças significativas entre os mutantes e o controle para os níveis de malato. Quanto aos níveis de fumarato, foram observados incrementos significativos nas plantas *gib1* e, principalmente, em *gib2*, sob condições ótimas (Figura 9F). Entretanto, plantas *gib2* e *gib1* tiveram os níveis de fumarato reduzidos quando cultivadas sob deficiência hídrica. Durante o período de recuperação das plantas após a DH, não foram observadas diferenças significativas nos teores de fumarato entre os genótipos estudados.

Compostos importantes do metabolismo do nitrogênio também foram avaliados (Figura 10). Sob condições ótimas verificou-se uma clara tendência de redução nos teores de clorofila (Chl) total em *gib2* e *gib1* em plantas cultivadas sob condições ótimas e redução significativa nos mesmos genótipos quando tais plantas foram submetidas a condições de seca (Figura 10A). Também foram observados incrementos do conteúdo de Chl totais em plantas *gib2* com maior idade, cultivadas sob irrigação contínua. Após a reirrigação, não foram observados diferenças entre os genótipos. Apesar da pequena alteração dos teores totais de clorofila, as plantas com os menores níveis de GA, *gib2* e *gib1*, apresentaram as menores razões Chl

a/Chl b em todas as condições testadas (Figura 10B). Sob deficiência hídrica, além das reduções da razão entre *Chl a/Chl b*, também houve incremento na razão de plantas *gib3* quando comparado ao WT.

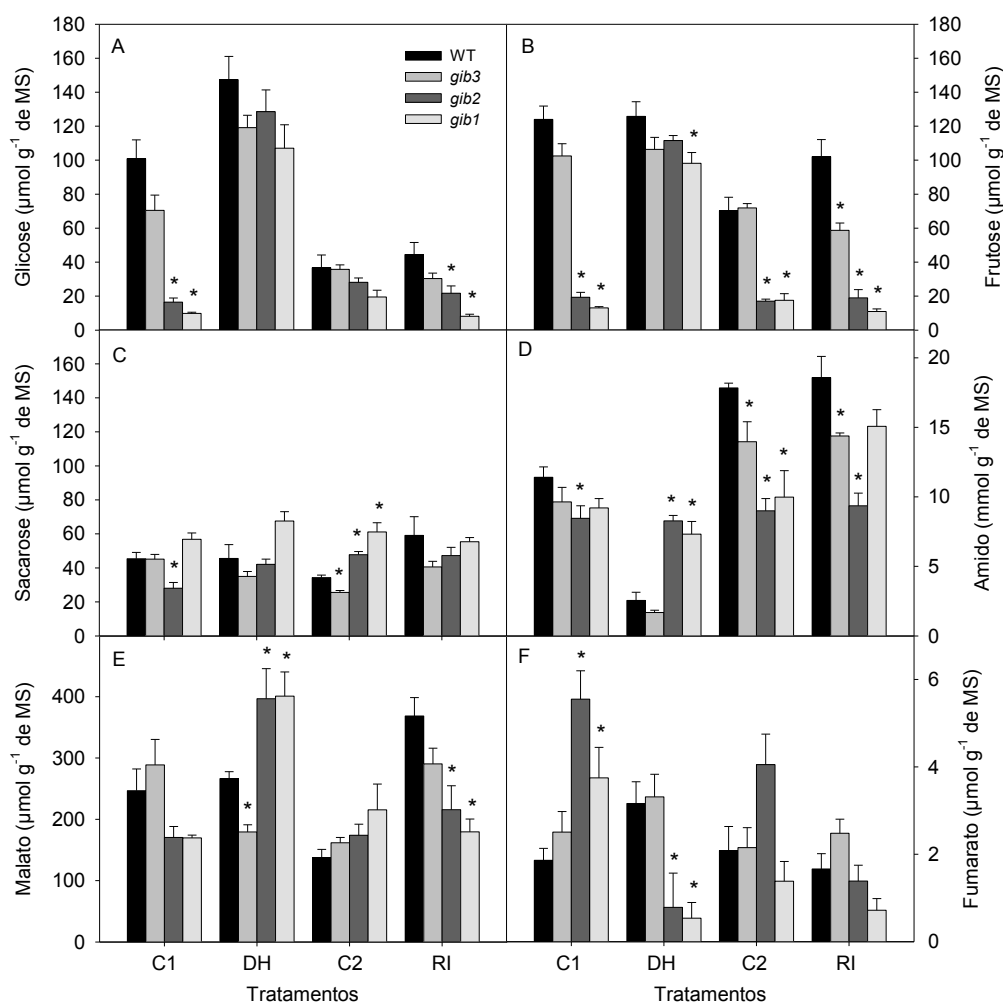


Figura 9. Alterações nos conteúdos de metabólitos envolvidos no metabolismo do carbono em folhas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) com diferentes níveis de GAs endógenos cultivados sob deficiência hídrica. Glicose (A); Frutose (B); Sacarose (C); Amido (D); Malato (E) e; Fumarato (F). Valores estão apresentados como médias \pm erro padrão de seis plantas. Análise estatística conforme descrito na Figura 4.

Plantas com baixos níveis endógenos de GAs tiveram uma tendência de aumento na concentração de aminoácidos totais, porém, sem diferença significativa em relação ao WT no tratamento C1. Entretanto, diferenças significativas entre as plantas mutantes e selvagens foram observadas no tratamento C2 (Figura 10C). Em condições de DH e até mesmo após a reirrigação, plantas WT e mutantes

apresentaram resultados semelhantes. Nos dados de proteínas solúveis totais pode-se observar um acúmulo inversamente relacionado com o conteúdo de GAs (Figura 10D). Após suspensão da irrigação (tratamento DH), valores absolutos de proteínas foram reduzidos, no entanto, as maiores concentrações ainda foram encontradas no genótipos mutantes, sendo *gib1* o genótipo que apresentou diferença estatística quando comparado ao WT. Plantas que passaram por um período de deficiência hídrica e recuperação (RI) não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao WT. O conteúdo de nitrato encontrado em folhas dos quatro genótipos utilizados apresentou um padrão variável entre os tratamentos (Figura 10E). Os genótipos *gib3* e *gib1* apresentaram um aumento significativo nos teores de nitrato enquanto *gib2* apresentou menores concentrações desse íon. O efeito da deficiência hídrica foi evidente nas plantas mutantes para nitrato verificando-se maiores concentrações com diferenças significativas em *gib2* e *gib1* nos tratamentos DH e RI.

Uma vez quantificados os teores de Chl, aminoácidos, proteínas e nitrato, foram calculadas as razões nitrato/Chl total, nitrato/aminoácidos e nitrato/proteínas (Figura 10F, G e H). Essas razões nos permitem inferir sobre a assimilação do nitrato livre em seus respectivos metabólitos nitrogenados. Em função das maiores razões nitrato/aminoácidos de *gib3* e *gib1* e menores em *gib2*, pode-se dizer que plantas *gib3* e *gib1* apresentam menor assimilação do nitrato livre em aminoácidos ao passo que *gib2* apresentou maior assimilação, indicativo do efeito do genótipo (Figura 10F). Enquanto a DH e mesmo RI influenciaram as respostas dos genótipos mutantes de forma que apresentaram elevadas razões nitrato/aminoácidos, sugerindo assim baixas taxas de assimilação do nitrato. As diferenças significativas entre os genótipos na razão nitrato/proteínas nos tratamentos controles (C1 e C2) foram similares à razão nitrato/aminoácidos nos mesmos tratamentos (Figura 10G). No entanto, o período de exposição das plantas a seca não ocasionou em diferenças significativas na razão nitrato/proteínas sugerindo então que os genótipos mutantes e WT possuem as mesmas taxas de assimilação do nitrato em proteínas. Da mesma forma, os resultados da razão nitrato/proteína também foram semelhantes ao DH após a RI, porém com incremento na assimilação do nitrato em proteínas. Da mesma forma que na razão nitrato/aminoácidos e nitrato/proteínas, as diferenças significativas nos tratamentos C1 e C2 foram os mesmos genótipos já

mencionados. No entanto, o efeito da seca foi mais pronunciado na razão nitrato/Chl sugerindo uma relação diretamente proporcional entre conteúdo endógeno de GA a assimilação do nitrato em pigmentos (Figura 10H).

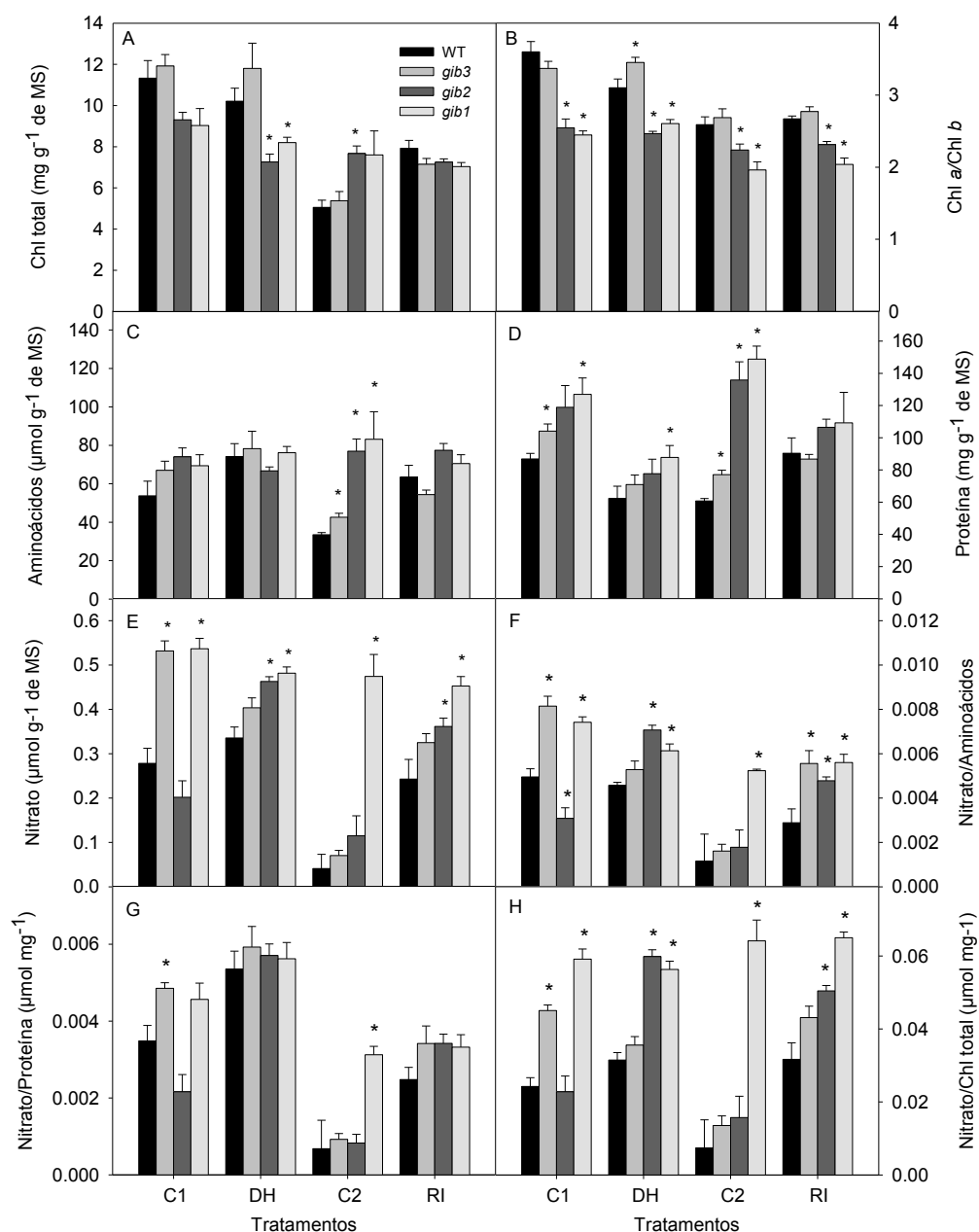


Figura 10. Alteração nos teores de metabólitos envolvidos no metabolismo do nitrogênio em folhas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) com diferentes níveis de GAs endógenos cultivados sob deficiência hídrica. Chl (Clorofila) total (A); Razão entre Chl a e Chl b (B); Aminoácidos solúveis totais (C); Proteínas solúveis totais (D); Nitrato (E); Razão entre nitrato e aminoácidos (F); Razão entre nitrato e proteínas (G) e; Razão entre nitrato e clorofilas totais (H). Valores estão apresentados como medias \pm erro padrão de seis plantas. Análise estatística conforme descrito na Figura 4.

4.6 AVALIAÇÃO DO ESTADO REDOX DE FOLHAS DE PLANTAS COM DIFERENTES NÍVEIS ENDÓGENOS DE GA SOB DEFICIÊNCIA HÍDRICA

Com o intuito de compreender as variações metabólicas observadas em plantas com reduzidos níveis de GA em resposta a deficiência hídrica, o estado redox foi determinado por meio da quantificação dos teores de NAD(P)(H) (Figura 11). Os níveis de NAD⁺ apresentaram maiores valores em plantas mutantes em condições ótimas ao cultivo enquanto que ao serem submetidas ao estresse hídrico, houve uma tendência de diminuição, sendo que plantas *gib2* e *gib1* diferiram do WT no tratamento DH e o genótipo *gib3* diferiu do WT no tratamento RI (Figura 11A). A forma reduzida (NADH) não apresentou diferenças significativas no tratamento DH e nem no seu respectivo controle (Figura 11B). Já as plantas que foram reirrigadas após um período de seca apresentaram incrementos no conteúdo de NADH em *gib2* e *gib1*. Dessa forma, ao serem estimadas as razões NAD⁺/NADH observou-se pequena variação entre os genótipos nas condições controle de cultivo com exceção do genótipo *gib3* que apresentou incrementos significativos no tratamento C1 (Figura 11C). Plantas que passaram por um período de seca e mesmo aquelas que foram reirrigadas posteriormente, apresentaram menor razão diferindo significativamente do WT, com exceção de *gib3* sob seca, que apresentou tendência de maiores valores comparados ao WT. Dessa forma, os resultados referentes aos nucleotídeos não fosfatados indicam maior acúmulo da forma reduzida em relação à oxidada.

Em se tratando dos nucleotídeos fosfatados, pode-se observar elevado grau de similaridade entre os resultados encontrados para NADP⁺ entre os genótipos, pois a única diferença encontrada foi no tratamento C2 em plantas *gib2* (Figura 11D). Entretanto, os teores de NADPH em plantas mutantes foram superiores comparadas ao WT em todos os tratamentos aplicados, o que pode ser reflexo dos baixos níveis endógenos de GA (Figura 11E). Os genótipos mutantes diferiram significativamente do WT em condições ótimas enquanto as diferenças mais pronunciadas nos tratamentos em que plantas passaram pela seca foram nos genótipos *gib2* e *gib1*. A razão NADP⁺/NADPH foi alterada e plantas mutantes apresentaram menor razão indicando que a forma reduzida foi acumulada em maior quantidade que a forma oxidada (Figura 11F).

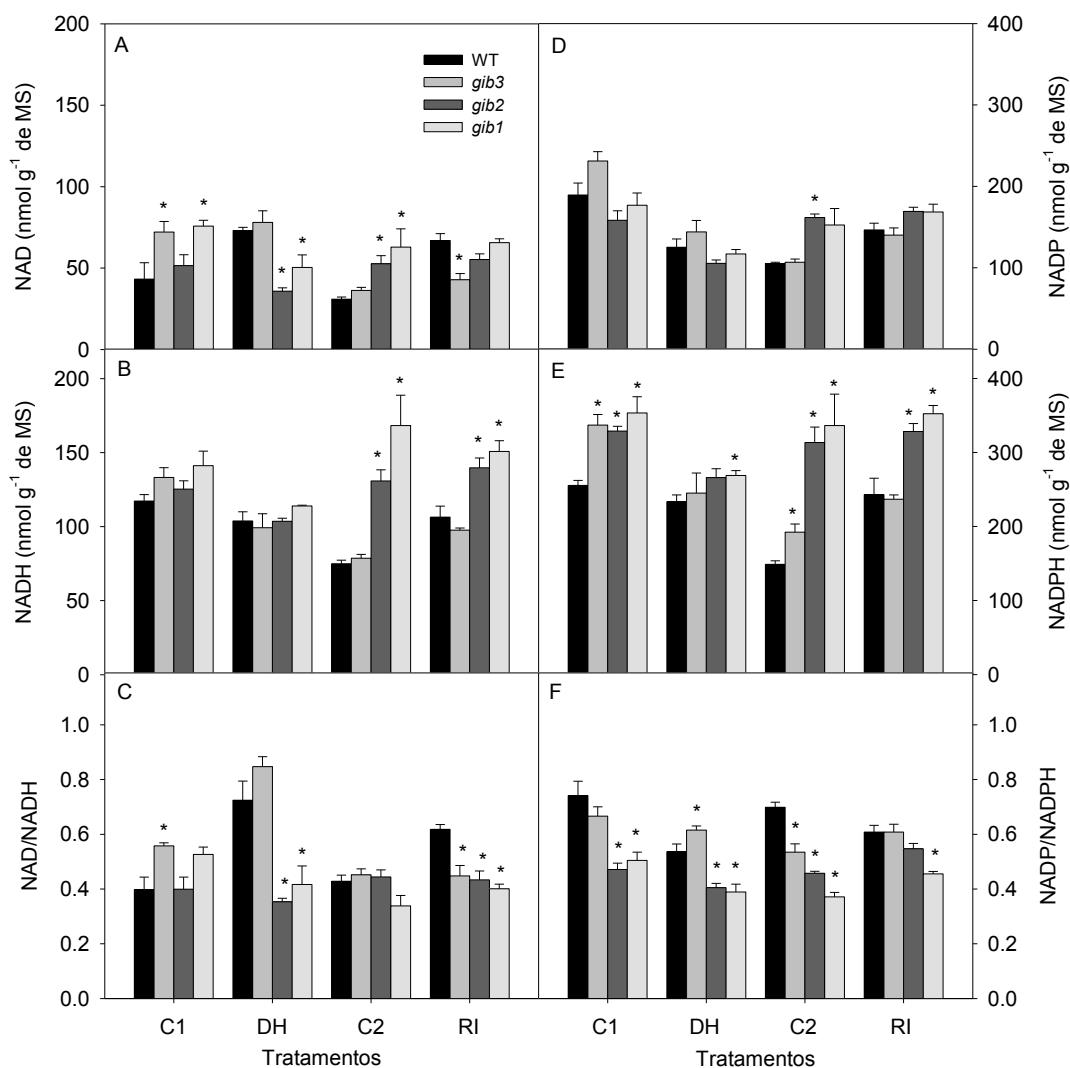


Figura 11. Alteração do conteúdo de nucleotídeos de piridina em folhas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) com diferentes teores endógenos de GAs cultivados sob deficiência hídrica. NAD^+ (A); NADH (B); Razão entre NAD^+ e NADH (C); NADP^+ (D); NADPH (E) e; Razão entre NADP^+ e NADPH (F). Valores estão apresentados como médias \pm erro padrão (n = 6). Análise estatística conforme descrito na Figura 3.

4.7 METABÓLITOS E ENZIMAS ENVOLVIDOS NO METABOLISMO ANTIOXIDATIVO E DANOS CELULARES DE PLANTAS DE TOMATE COM BAIXOS NÍVEIS ENDÓGENOS DE GAS EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE HÍDRICO

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas naturalmente durante algumas reações do metabolismo celular. No entanto, a presença de um sistema antioxidante enzimático e não enzimático mantém essas EROs em concentrações tais que não promovam danos às células em condições normais. Esse sistema enzimático é composto por algumas enzimas, dentre elas a catalase (CAT), a peroxidase do ascorbato (APX) e a dismutase do superóxido (SOD) que atuam como linha de frente na remoção das EROs e tais enzimas foram quantificadas (Figura 12). Dentre essas três enzimas, a CAT foi a enzima que apresentou maior atividade (Figura 12A). Plantas mutantes com os menores níveis de GA, *gib2* e *gib1*, apresentaram também a menor atividade da CAT que foi significativamente diferente do WT, demonstrando claramente o efeito do genótipo. Esse padrão de redução da atividade da CAT só não foi o mesmo no tratamento RI em que plantas *gib3* apresentaram elevada atividade desta enzima enquanto os demais genótipos apresentaram atividade reduzida. Mesmo com valores absolutos reduzidos, ainda observa-se atividade da APX nas plantas (Figura 12B). A APX apresentou uma relação diretamente proporcional com os genótipos mutantes em que, quanto menor o nível endógeno de GA, menor foi atividade da enzima. Tais resultados foram contrastantes quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica pois plantas WT apresentaram elevada atividade da APX enquanto que plantas mutantes apresentaram menor atividade. Após a reirrigação dos vasos, a atividade da APX em plantas WT foi reduzida e dessa forma não houve mais diferença entre o WT e os mutantes. De modo similar, as variações na atividade da APX (Figura 12B), assemelharam-se às observadas para a SOD (Figura 12C).

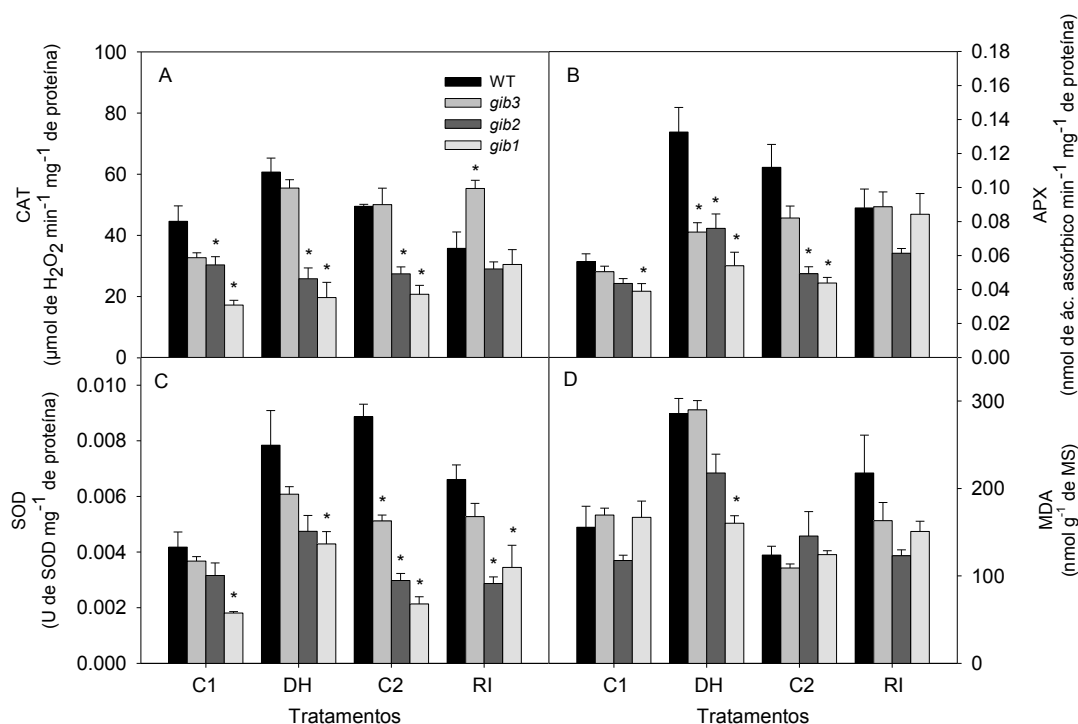


Figura 12. Variação no conteúdo de MDA (malonaldeído) e de enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo e danos celulares em folhas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) com diferentes níveis de GAs endógenos cultivados sob deficiência hídrica. CAT (catalase) (A); APX (peroxidase do ascorbato) (B); SOD (desmutase do superóxido) (C) e; MDA (D). Valores estão apresentados como médias \pm erro padrão de seis plantas. Análise estatística conforme descrito na Figura 3.

Tem-se sugerido que a perda da compartimentalização celular durante a deficiência hídrica é acompanhada pelo aumento na peroxidação de lipídeos causados pela formação de EROs. A peroxidação lipídica durante o estresse pode ser estimada pela concentração de malonaldeído (MDA) e para tanto esse metabólito foi quantificado (Figura 12D). A concentração de MDA entre os genótipos foi similar em condições ótimas ao cultivo (C1 e C2), indicando que não está ocorrendo danos na membrana das células. No entanto, quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica os genótipos WT e *gib3* apresentaram altas concentrações de MDA enquanto em *gib2* e *gib1* foram observadas as menores concentrações. Após a reirrigação, os valores tenderam a diminuição dos teores de MDA. Portanto, mesmo que as plantas sejam submetidas a condições extremas de falta de água, os baixos níveis endógenos de GA influenciam positivamente as

respostas dessas plantas de modo que apresentaram menor peroxidação de lipídeos em comparação aquelas que possuem maiores níveis de GA.

5. DISCUSSÃO

Embora o conteúdo endógeno de GA seja reconhecidamente importante para processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Olszewski et al., 2002; Sun e Gubler, 2004; Zhu et al., 2006; Gao et al., 2011; Ribeiro et al., 2012b), pouco se conhece a respeito do papel do metabolismo deste fitormônio em plantas expostas a condições abióticas adversas. Nesse contexto, tem-se sugerido que o metabolismo de GA desempenha um papel importante na resistência e adaptação das plantas a condições de deficiência hídrica (Dubois et al., 2013; Ho et al., 2013; Nir et al., 2013; Zawaski e Busov, 2014). Entretanto, os processos metabólicos envolvendo o metabolismo de GAs nessas condições ainda não foram completamente caracterizados. Assim, para investigar o papel da biossíntese de GAs nestas condições, utilizou-se neste trabalho plantas de tomate com redução dos níveis endógenos de GAs.

Neste estudo, demonstrou-se que plantas com baixos níveis endógenos de GAs (*gib2* e *gib1*) sob deficiência hídrica tiveram uma maior capacidade de retenção de água em relação aos genótipos selvagem e *gib3*. Verificou-se que *gib1* e *gib2* necessitaram de um maior número de dias para alcançar Ψ_w de -1,3 MPa sob deficiência hídrica (Figura 3C). Em adição, verificou-se que apesar da redução do Ψ_w nessas plantas terem afetado a A_N , com uma redução de aproximadamente 80 e 78% em *gib2* e *gib1* respectivamente, no WT essa redução na A_N foi maior, correspondendo aproximadamente a 90% quando comparada a condição controle (C1, Figura 7 e 8A). Observou-se ainda que plantas dos três genótipos *gib1*, *gib2* e *gib3*, que passaram por um período de deficiência hídrica, apresentaram altas taxas fotossintéticas após a reirrigação, de forma que as plantas apresentaram um tempo reduzido para a recuperação total da A_N (Figura 7). Além disso, apesar de as plantas apresentarem valores de Ψ_w baixo (-1,3 MPa), sintomas de murcha não foram observados em *gib1* e de forma menos pronunciada em *gib2* (Figura 2). Este fenótipo tanto em *gib1* quanto em *gib2* pode estar relacionado com a arquitetura da planta e a morfologia das folhas, que têm sido caracterizados pelo nanismo, encarquilhamento e engrossamento de folhas (Koorneef et al., 1990) que pode dificultar a perda de água e o desenvolvimento de murcha. Outra possível explicação

para este fenótipo seria que as plantas *gib2* e *gib1* por terem altos níveis de osmólitos ativos sejam capazes de manter a turgescência na folha por um período maior de tempo (Medeiros et al., 2012); Medeiros et al., 2013). Neste sentido, alterações no metabolismo de osmólitos ativos relacionados com o ajustamento osmótico da célula também podem estar envolvidos na manutenção da turgescência em *gib2* e *gib1*, como tem sido observado em outras espécies (Medeiros et al., 2012); Medeiros et al., 2013).

Neste trabalho demonstrou-se que plantas mutantes com baixos níveis endógenos de GAs são capazes de manter a água na folha por mais tempo do que as plantas do genótipo WT quando a água no solo é escassa (Figura 3A e 3C). Resultados semelhantes também foram observados em experimentos com plantas de tomate superexpressando um gene de *Arabidopsis thaliana*, *AtGAMT1*, que codifica a enzima de inativação da GA (GA₂ oxidase) (Nir et al., 2013). Esse trabalho sugere que os baixos níveis de GAs induzem uma maior tolerância à deficiência hídrica em função da capacidade de manter os tecidos da folha hidratados por mais tempo, uma vez que apresentam menor transpiração e, dessa forma, utilizam a água disponível do solo de forma mais lentamente (Nir et al., 2013). Outros estudos sugerem que a redução dos níveis de GA ativos promovem a tolerância ao estresse hídrico indiretamente, via supressão do crescimento (Magome et al., 2004; Achard et al., 2006; Shan et al., 2007; Wang et al., 2012). Quando as plantas são submetidas ao estresse hídrico, as trocas gasosas entre a folha e a atmosfera normalmente diminuem devido a redução na *g_s* e condutância hidráulica provocando menor assimilação de CO₂ atmosférico (Silva et al., 2013). No presente trabalho, observou-se que plantas com baixos níveis de GA apresentaram maior *g_s* e *E* sob seca, que em conjunto com maiores valores de *A_N* levaram a uma maior eficiência de uso da água (EUA) (Figura 8F). Estes resultados diferem, em parte, daqueles obtidos por Nir et al. (2013), que relatam menor *g_s*, *E*, apesar de também apresentar maior EUA em plantas com baixos níveis de GAs ativas. Cabe lembrar que, diferente do observado por Nir et al. (2013), folhas de plantas dos genótipos *gib2* e *gib1* apresentam maior densidade e abertura estomática (Martins, 2013). O alto número de estômatos encontrado, bem como a maior abertura dos estômatos, também explicou os resultados observados de elevada perda de água da folha em plantas com menores níveis endógenos de GA (Figura 3B). Cabe salientar que outros

estudos com plantas de tomate também têm demonstrado efeitos de baixos níveis de GAs sobre a densidade estomática. Tem-se observado que plantas de tomate superexpressando o gene que codifica a proteína de ligação ao elemento de resposta de desidratação (*S/DREB*), envolvida com o fator de transcrição AP2/ERF (gene *APETALA2* / fator de ligação respondente ao etileno), possuem menores níveis de GA por terem inibidas a expressão das enzimas *ent*-caureno sintase (CPS) e GA_{20} oxidase ($GA_{20}ox$). Nessas plantas, foram verificados uma menor expansão de folhas, alongamento de entrenós e menor densidade estomática e maior resistência a seca (Li et al., 2012).

O fenótipo anão característico (Figura 2) observado em *gib2* e *gib1* também tem sido observado em genótipos de outras espécies (Fujioka et al., 1988; Magome et al., 2004; Sakamoto et al., 2004; Nir et al., 2013) e pode ser vantajoso em ambientes adversos (Magome et al., 2004; Li et al., 2012). Acredita-se que o menor crescimento possa levar a redirecionamento de recursos destinados para promover o crescimento para apoiar os mecanismos que promovem a sobrevivência (Achard et al., 2006). Assim, plantas com menor crescimento podem ser menos vulneráveis a estresses (Achard et al., 2006). Embora a natureza desses mecanismos permaneça desconhecida, acredita-se que os níveis de GAs possam estar relacionados com o controle do crescimento em função da condição ambiental onde a planta se encontra, estando assim relacionados com a sobrevivência em condições adversas (Achard et al., 2006).

Neste trabalho, observou-se uma relação entre o metabolismo do carbono e o crescimento quando as plantas mutantes submetidas à deficiência hídrica. O amido é acumulado durante o dia e degradado durante a noite para promover o crescimento na ausência da fotossíntese (Wiese et al., 2007). Um estudo recente demonstrou que os carboidratos produzidos pela fotossíntese modulam a biossíntese de GA e é através desse mecanismo que é determinado o tamanho da planta (Paparelli et al., 2013). No entanto, outros autores sugerem que o crescimento a exposição de elevadas concentrações de CO_2 é desacoplado do efeito das GAs (Ribeiro et al., 2012a; Ribeiro et al., 2013). Embora as informações sejam, de certa forma, contraditórias, foi verificado que plantas exploram o metabolismo do amido durante a noite como uma medida confiável da eficiência da fotossíntese no dia anterior (Paparelli et al., 2013). Neste mesmo trabalho, também

foi identificado que a *ent*-caureno sintase (KS) tem maior atividade durante o dia somente quando a disponibilidade de amido durante a noite é elevada. A evidência de que a disponibilidade de açúcares afeta a biossíntese de GA (Paparelli et al., 2013), e também a de outros hormônios como as auxinas (Sairanen et al., 2012), sugere que a alocação de carbono é fundamental para garantir um padrão de crescimento que seja adequado ao ambiente da planta. Em condições de deficiência hídrica, verificou-se maior taxa de crescimento relativo das plantas mutantes (Figura 4C) que provavelmente foi influenciada pelos altos níveis de amido (Figura 9D). Plantas com reduzidos níveis de GAs, *gib2* e *gib1*, não apresentaram redução drástica no crescimento relativo em altura por estarem sofrendo menos com o estresse aplicado.

Observou-se acúmulo de malato em *gib2* e *gib1* no tratamento DH, correspondendo a um incremento de aproximadamente 37% em plantas com menor conteúdo de GA quando comparado ao WT (Figura 9E). O malato pode servir como fonte alternativa de carbono podendo ser metabolizado para favorecer o crescimento (Martinoia e Rentsch, 1994). De outro modo, o malato pode ser transportado para as células-guardas contribuindo para a abertura estomática por diminuir o potencial osmótico e hídrico e, portanto sendo uma molécula osmorreguladora (Nunes-Nesi et al., 2007; Fernie e Martinoia, 2009; Araújo et al., 2011) com provável atuação também em outras células promovendo o ajustamento osmótico. O malato acumulado nas *gib2* e *gib1* provavelmente serviu de fonte de carbono utilizado no crescimento das plantas e como uma molécula osmorreguladora contribuindo para manutenção do *status* hídrico.

Estudos têm relatado que não somente os conteúdos endógenos de GAs estão relacionados com o crescimento, mas também é essencial a ativação de proteínas DELLA (Achard et al., 2006; Achard et al., 2008). As proteínas DELLA são conhecidas como fortes repressores das respostas de GA e conseqüentemente resultam em inibição do crescimento (Dill et al., 2001; Itoh et al., 2005; Achard et al., 2008). Além disso, as proteínas DELLA não apenas inibem o crescimento, mas também promovem a sobrevivência das plantas cultivadas sob diferentes estresses, como aqueles causados pela alta concentração salina e de manitol (Magome et al., 2004; Achard et al., 2006; Achard et al., 2008). Acredita-se que as proteínas DELLA limitam acúmulos de EROs e assim retardam a morte celular decorrente do estresse

(Achard et al., 2008). Em *Arabidopsis* a estabilidade das proteínas DELLA esta envolvida com a redução do crescimento e o aumento da sobrevivência sob estresse salino (Achard et al., 2006). Em adição, as proteínas DELLA integram as respostas de GAs com as diferentes vias de sinalização envolvendo outros hormônios, como o ácido abscísico (ABA), etileno e ácido jasmônico, em resposta a estresses (Hou et al., 2010; Zhu et al., 2011; Wild et al., 2012; Yang et al., 2012; Colebrook et al., 2014). Tem-se observado que a expressão do gene RGL3, o qual codifica a proteína DELLA, aumenta em plantas de *Arabidopsis* submetidas a baixas temperaturas (Achard et al., 2006), alta salinidade (Magome et al., 2008) e seca (Colebrook et al., 2014). Em adição, o gene XERICO, inibe ou degrada um regulador negativo da biossíntese de ABA, é induzido por DELLA e também esta envolvido em respostas a estresse abióticos sendo, portanto, um regulador positivo da biossíntese de ABA aumentando a tolerância a seca (Zentella et al., 2007).

Alguns genes envolvidos com a sinalização via proteínas DELLA são expressos em diferentes locais e tecidos nas plantas podendo haver alguma sinalização integrando as raízes e a parte aérea, como acontece com o hormônio do estresse, o ABA (Zawaski e Busov, 2014). Em um estudo com *populus* verificou que alguns genes que codificam a GA2ox são expressos em diferentes parte da planta em condições de seca ou dias curtos, sendo o gene GA2ox3 expresso no meristema apical (SAM) e o gene GA2ox7 em raízes, induzindo a produção de raízes laterais (Zawaski e Busov, 2014). No presente trabalho observou-se em todas as condições testadas uma maior alocação de biomassa em raízes em plantas dos genótipos *gib1* e *gib2* (Figura 5G) com aumento nas taxas de A_N (Figura 8A) e ausência de danos nos fotossistemas mesmo sob condições de seca (Figura 6). No estudo com *populus* com mutantes deficientes em GA observou-se maior A_N e tais recursos foram desviados para um maior investimento em raízes (Zawaski e Busov, 2014). Tomados em conjunto, estas respostas encontradas por Zawaski e Busov (2014) são muito semelhantes as encontradas no presente trabalho sugerindo assim que as proteínas DELLA podem estar relacionadas com as respostas encontradas em *gib3*, *gib2* e *gib1*. O envolvimento de proteínas DELLA pode estar relacionado em respostas ao estresse alterando mecanismos de resistência a seca ou a rápida percepção da deficiência hídrica. Adicionalmente, foram observados elevadas taxas na A_N e E (Figura 7A e C) que podem explicar o fato de maior crescimento radicular em

detrimento da PA. O carbono oriundo da A_N pode estar sendo usado para melhorar os mecanismos de tolerância protegendo contra o dano celular (a partir da produção de solutos compatíveis e eliminação de EROs ou para o crescimento das raízes, o que seria vantajoso para a maior captação de água (Zawaski e Busov, 2014). Sugere-se ainda que o maior acúmulo de massa seca nas raízes das plantas dos genótipos *gib1*, *gib2* e *gib3*, indicando um maior crescimento do sistema radicular, pode permitir que um maior volume de solo seja explorado e assim sustentando elevadas taxas de transpiração e maior eficiência no uso da água (Figura 8F) (Elias et al., 2012). Entretanto, apesar das evidências sugerindo o envolvimento da proteína DELLA, análises adicionais são necessárias para comprovar tal relação nos genótipos *gib*.

Estudos mostram que em ambientes adversos, as proteínas DELLA não são degradadas ocasionando em menores níveis de GA e, portanto, diminuindo o crescimento e aumentando a sobrevivência das plantas (Achard et al., 2006; Achard et al., 2008). Adicionalmente, estresses induzidos por salinidade ou por manitol promovem acúmulo de proteínas DELLA e assim promovendo a expressão de genes que codificam as enzimas de eliminação de EROs, atrasando a morte celular e aumentando a tolerância de plantas a estresses (Achard et al., 2008). Apesar das evidências, o mecanismo envolvendo proteínas DELLA pode não ser o único responsável pelas menores atividades de CAT, APX e SOD encontradas nos genótipos *gib2* e *gib1* (Figura 12). As menores atividades dessas enzimas do sistema antioxidativo também podem indicar que estas plantas estejam sofrendo menos com o estresse aplicado do que as WT. Uma evidência para esse mecanismo é o fato de menor peroxidação lipídica ter sido observada nos mutantes *gib2* e *gib1* durante o período de seca (Figura 12D) sugerindo que danos fotooxidativos não tenham ocorrido em função dos baixos níveis endógenos de GAs. Embora tenha sido observado uma leve redução nos teores de clorofilas (Figura 10 A e B) nas plantas *gib1* e *gib2*, degradação esta característica comum de plantas sob deficiência hídrica, acredita-se que estas plantas não estavam sofrendo drasticamente com o estresse aplicado um vez que os valores observados de F_v/F_m foram maiores que 0,80 (Figura 6A), indicando eficiência no uso da radiação sem causar danos ao aparato bioquímico fotossintético.

6. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados aqui apresentados demonstraram o efeito das GAs para respostas de aclimação ou de tolerância à deficiência hídrica. Verificou-se que investimentos no crescimento radicular em detrimento da parte aérea observados em plantas com baixos níveis endógenos de GA, provavelmente permitiram que um maior volume de solo fosse explorado em busca de água. Da mesma forma, o acúmulo de osmorreguladores também pode estar envolvido no processo de tolerância em plantas com baixos níveis de GAs, uma vez que tais plantas mantiveram a turgidez por mais tempo, o que pode ter evitado danos celulares. A ausência de murcha em *gib2* e *gib1* também pode ser atribuída a arquitetura e a morfologia das folhas, pois plantas mutantes apresentam engrossamento e encarquilhamento das folhas, o que pode ter reduzido as perdas de água. Indiretamente, o reduzido crescimento dessas plantas também pode estar relacionado com a maior tolerância ao estresse hídrico, uma vez que plantas menores com sistema radicular mais desenvolvido tem a capacidade de manter a água na folha por mais tempo por utilizarem a água disponível no solo mais lentamente. Assim, a restrição do crescimento pela menor disponibilidade de GAs pode ser vantajosa em ambientes adversos, por permitir o redirecionamento de recursos energéticos para mecanismos que promovem a sobrevivência.

Contudo, apesar das evidências indicando a importância das GAs na tolerância e sobrevivência à deficiência hídrica, ainda não está bem esclarecido os mecanismos metabólicos e moleculares que envolvem esse fitormônio. Portanto, estudos complementares das redes de sinalização, da interação entre GAs e outros fitormônios, da identificação de genes bem como a expressão gênica e do metabolismo das GAs como um todo ainda são necessários para elucidação dos mecanismos envolvidos.

7. REFERÊNCIAS

- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP** (2006) Integration of Plant Responses to Environmentally Activated Phytohormonal Signals. *Science* **311**: 91-94
- Achard P, Renou J-P, Berthomé R, Harberd NP, Genschik P** (2008) Plant DELLAs Restrain Growth and Promote Survival of Adversity by Reducing the Levels of Reactive Oxygen Species. *Current Biol* **18**: 656-660
- Ahuja I, de Vos RCH, Bones AM, Hall RD** (2010) Plant molecular stress responses face climate change. *Trends Plant Sci* **15**: 664-674
- Albacete A, Ghanem ME, Martínez-Andújar C, Acosta M, Sánchez-Bravo J, Martínez V, Lutts S, Dodd IC, Pérez-Alfocea F** (2008) Hormonal Changes in Relation to Biomass Partitioning and Shoot Growth Impairment in Salinized Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *J Exp Bot* **59**: 4119-4131
- Araújo 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. *Plant Cell* **23**: 600-627
- Bartels D, Sunkar R** (2005) Drought and Salt Tolerance in Plants. *Crit Rev Plant Sci* **24**: 23-58
- Begcy K, Mariano ED, Gentile A, Lembke CG, Zingaretti SM, Souza GM, Menossi M** (2012) A Novel Stress-Induced Sugarcane Gene Confers Tolerance to Drought, Salt and Oxidative Stress in Transgenic Tobacco Plants. *PLoS One* **7**: e44697
- Benincasa MMP** (2003). Análise de Crescimento de Plantas (noções básicas). FUNEP, Jaboticabal
- Bensen RJ, Zeevaart JAD** (1990) Comparison of Ent-kaurene Synthetase A and B Activities in Cell-free Extracts From Young Tomato Fruits of Wild-type and gib-1, gib-2, and gib-3 Tomato Plants. *J Plant Growth Regul* **9**: 237-242
- Bokhari SA, Wan X-Y, Yang Y-W, Zhou L, Tang W-L, Liu J-Y** (2007) Proteomic Response of Rice Seedling Leaves to Elevated CO₂ Levels. *J Proteome Res* **6**: 4624-4633
- Cairo PAR** (1995) Curso Básico de Relações Hídricas de Plantas. UESB, Vitória da Conquista
- Cakmak I, Horst WJ** (1991) Effect of Aluminium on Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase, Catalase, and Peroxidase Activities in Root Tips of Soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* **83**: 463-468
- Chae L, Sudat S, Dudoit S, Zhu T, Luan S** (2009) Diverse Transcriptional Programs Associated with Environmental Stress and Hormones in the Arabidopsis Receptor-Like Kinase Gene Family. *Mol Plant* **2**: 84-107
- Charlton A, Donarski J, Harrison M, Jones S, Godward J, Oehlschlager S, Arques J, Ambrose M, Chinoy C, Mullineaux P, Domoney C** (2008) Responses of the Pea (*Pisum sativum* L.) Leaf Metabolome to Drought Stress Assessed by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Metabolomics* **4**: 312-327

- Colebrook EH, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P** (2014) The Role of Gibberellin Signalling in Plant Responses to Abiotic Stress. *J Exp Biol* **217**: 67-75
- Cowling RJ, Kamiya Y, Seto H, Harberd NP** (1998) Gibberellin Dose-Response Regulation of GA4 Gene Transcript Levels in Arabidopsis. *Plant Physiol* **117**: 1195-1203
- DaMatta FM, Rena AB** (2002) Ecofisiologia de Cafezais Sombreados e a Pleno Sol. In L Zambolim, ed, *O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café*, UFV, Viçosa, pp. 93-135
- Dill A, Jung H-S, Sun T-p** (2001) The DELLA Motif is Essential for Gibberellin-induced Degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 14162-14167
- Dubois M, Skirycz A, Claeys H, Maleux K, Dhondt S, De Bodt S, Vanden Bossche R, De Milde L, Yoshizumi T, Matsui M, Inzé D** (2013) ETHYLENE RESPONSE FACTOR6 Acts as a Central Regulator of Leaf Growth under Water-Limiting Conditions in Arabidopsis. *Plant Physiol* **162**: 319-332
- Elias AA, Busov VB, Kosola KR, Ma C, Etherington E, Shevchenko O, Gandhi H, Pearce DW, Rood SB, Strauss SH** (2012) Green Revolution Trees: Semidwarfism Transgenes Modify Gibberellins, Promote Root Growth, Enhance Morphological Diversity, and Reduce Competitiveness in Hybrid Poplar. *Plant Physiol* **160**: 1130-1144
- Evans GC** (1972). *The Quantitative Analysis of Plant Growth*. University of California Press, Berkeley
- Fernie AR, Martinoia E** (2009) Malate. Jack of all trades or master of a few? *Phytochem* **70**: 828-832
- 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
- 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 J* **46**: 533-548
- Fujioka S, Yamane H, Spray CR, Gaskin P, Macmillan J, Phinney BO, Takahashi N** (1988) Qualitative and Quantitative Analyses of Gibberellins in Vegetative Shoots of Normal, dwarf-1, dwarf-2, dwarf-3, and dwarf-5 Seedlings of *Zea mays* L. *Plant Physiol* **88**: 1367-1372
- Gao X-H, Xiao S-L, Yao Q-F, Wang Y-J, Fu X-D** (2011) An Updated GA Signaling 'Relief of Repression' Regulatory Model. *Mol Plant* **4**: 601-606
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Höhne 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. *Plant Cell* **16**: 3304-3325
- Ha S, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-SP** (2012) Cytokinins: Metabolism and Function in Plant Adaptation to Environmental Stresses. *Trends Plant Sci* **17**: 172-179
- Heath RL, Packer L** (1968) Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts: I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. *Arch Biochem Biophys* **125**: 189-198

- Hedden P, Kamiya Y** (1997) Gibberellin Biosynthesis: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Plant Physiol* **48**: 431-460
- Hedden P, Proebsting WM** (1999) Genetic Analysis of Gibberellin Biosynthesis. *Plant Physiol* **119**: 365-370
- Ho S-L, Huang L-F, Lu C-A, He S-L, Wang C-C, Yu S-P, Chen J, Yu S-M** (2013) Sugar Starvation and GA-inducible Calcium-dependent Protein kinase 1 Feedback Regulates GA Biosynthesis and Activates a 14-3-3 Protein to Confer Drought Tolerance in Rice Seedlings. *Plant Mol Biol* **81**: 347-361
- Hou X, Lee LYC, Xia K, Yan Y, Yu H** (2010) DELLAs Modulate Jasmonate Signaling via Competitive Binding to JAZs. *Dev cell* **19**: 884-894
- Hu Y, Burucs Z, von Tucher S, Schmidhalter U** (2007) Short-term Effects of Drought and Salinity on Mineral Nutrient Distribution Along Growing Leaves of Maize Seedlings. *Environ Exp Bot* **60**: 268-275
- Hunt R** (1982). *Plant Growth Curves: the Functional Approach to Plant Growth Analysis*. Edward Arnold, London
- Itoh H, Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Kamiya N, Hasegawa Y, Ashikari M, Matsuoka M** (2005) Overexpression of a GRAS Protein Lacking the DELLA Domain Confers Altered Gibberellin Responses in Rice. *Plant J* **44**: 669-679
- Jaleel C, Gopi R, Manivannan P, Panneerselvam R** (2007) Responses of Antioxidant Defense System of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. to Paclobutrazol Treatment under Salinity. *Acta Physiol Plant* **29**: 205-209
- Koornneef M, Bosma TDG, Hanhart CJ, Veen JH, Zeevaart JAD** (1990) The Isolation and Characterization of Gibberellin-deficient Mutants in Tomato. *Theor Appl Genet* **80**: 852-857
- Li J, Sima W, Ouyang B, Wang T, Ziaf K, Luo Z, Liu L, Li H, Chen M, Huang Y, Feng Y, Hao Y, Ye Z** (2012) Tomato SIDREB Gene Restricts Leaf Expansion and Internode Elongation by Downregulating Key Genes for Gibberellin Biosynthesis. *J Exp Bot* **63**: 6407-6420
- 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
- Loggini B, Scartazza A, Brugnoli E, Navari-izzo F** (1999) Antioxidative Defense System, Pigment Composition, and Photosynthetic Efficiency in Two Wheat Cultivars Subjected to Drought. *Plant Physiol* **119**: 1091-1100
- Loyola J, Verdugo I, González E, Casaretto JA, Ruiz-Lara S** (2012) Plastidic Isoprenoid Biosynthesis in Tomato: Physiological and Molecular Analysis in Genotypes Resistant and Sensitive to Drought Stress. *Plant biology* (Stuttgart, Germany) **14**: 149-156
- Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, Kamiya Y, Oda K** (2004) Dwarf and Delayed-flowering 1, a Novel Arabidopsis Mutant Deficient in Gibberellin Biosynthesis Because of Overexpression of a Putative AP2 Transcription Factor. *Plant J* **37**: 720-729
- Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, Kamiya Y, Oda K** (2008) The DDF1 Transcriptional Activator Upregulates Expression of a Gibberellin-deactivating Gene, GA2ox7, under High-salinity Stress in Arabidopsis. *Plant J* **56**: 613-626

- Martinoia E, Rentsch D** (1994) Malate Compartmentation-Responses to a Complex Metabolism. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**: 447-467
- Martins AO** (2013). Impactos Ecofisiológicos e Metabólicos da Alteração nos Níveis de Giberelina em Tomate. Dissertação, UFV, Viçosa, pp. 26-27
- Medeiros DB, Silva ECd, Santos HRB, Pacheco CM, Musser RdS, Nogueira RJMC** (2012) Physiological and Biochemical Responses to Drought Stress in Barbados cherry. *Braz J Plant Physiol* **24**: 181-192
- Medeiros DB, Silva EC, Teixeira MM, Buckeridge MS, Nogueira RJMC** (2013). Physiological Limitations in Two Sugarcane Varieties under Water Suppression and After Recovering. *Theor Exp Plant Physiol* **25**(3):213-222
- Mielke MS, Hoffmann A, Endres L, Fachinello JC** (1995) Comparison of Laboratory and Field Methods for the Estimation of Leaf Area of Wild Fruit Species. *Sci Agri* **52**: 82-88
- Munns R** (2005) Genes and Salt Tolerance: Bringing them Together. *New Phytol* **167**: 645-663
- Ning J, Li X, Hicks LM, Xiong L** (2010) A Raf-Like MAPKKK Gene DSM1 Mediates Drought Resistance through Reactive Oxygen Species Scavenging in Rice. *Plant Physiol* **152**: 876-890
- Nir IDO, Moshelion M, Weiss D** (2013) The Arabidopsis Gibberellin Methyl Transferase 1 Suppresses Gibberellin Activity, Reduces Whole-plant Transpiration and Promotes Drought Tolerance in Transgenic Tomato. *Plant Cell Environ*: n/a-n/a
- 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 J* **50**: 1093-1106
- Olszewski N, Sun T-p, Gubler F** (2002) Gibberellin Signaling: Biosynthesis, Catabolism, and Response Pathways. *Plant Cell* **14**: S61-S80
- Paparelli E, Parlanti S, Gonzali S, Novi G, Mariotti L, Ceccarelli N, van Dongen JT, Kölling K, Zeeman SC, Perata P** (2013) Nighttime Sugar Starvation Orchestrates Gibberellin Biosynthesis and Plant Growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 3760-3769
- 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
- Ramírez V, Coego A, López A, Agorio A, Flors V, Vera P** (2009) Drought Tolerance in Arabidopsis is Controlled by the OCP3 Disease Resistance Regulator. *Plant J* **58**: 578-591
- Ribeiro DM, Araújo WL, Fernie AR, Schippers JHM, Mueller-Roeber B** (2012a) Action of Gibberellins on Growth and Metabolism of Arabidopsis Plants Associated with High Concentration of Carbon Dioxide. *Plant Physiol* **160**: 1781-1794
- Ribeiro DM, Araújo WL, Fernie AR, Schippers JHM, Mueller-Roeber B** (2012b) Translatome and Metabolome Effects Triggered by Gibberellins During Rosette Growth in Arabidopsis. *J Exp Bot* **63**: 2769-2786

- Ribeiro DM, Mueller-Roeber B, Schippers JHM** (2013) Promotion of Growth by Elevated Carbon Dioxide is Coordinated Through a Flexible Transcriptional Network in *em Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* **8**: e23356
- Richards DE, King KE, Ait-ali T, Harberd NP** (2001) How Gibberellin Regulates Plant Growth and Development: A Molecular Genetic Analysis of Gibberellin Signaling. *Annu Rev Plant Phys* **52**: 67-88
- Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, Sakakibara H, Mittler R, Gepstein S, Blumwald E** (2007) Delayed Leaf Senescence Induces Extreme Drought Tolerance in a Flowering Plant. *P Natl Acad Sci* **104**: 19631-19636
- Sairanen I, Novák O, Pěnčík A, Ikeda Y, Jones B, Sandberg G, Ljung K** (2012) Soluble Carbohydrates Regulate Auxin Biosynthesis via PIF Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 4907-4916
- Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal GK, Takeda S, Abe K, Miyao A, Hirochika H, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M** (2004) An Overview of Gibberellin Metabolism Enzyme Genes and Their Related Mutants in Rice. *Plant Physiol* **134**: 1642-1653
- Sánchez-Rodríguez E, Rubio-Wilhelmi MM, Cervilla LM, Blasco B, Rios JJ, Rosales MA, Romero L, Ruiz JM** (2010) Genotypic Differences in Some Physiological Parameters Symptomatic for Oxidative Stress under Moderate Drought in Tomato Plants. *Plant Sci* **178**: 30-40
- Schippers JHM, Nunes-Nesi A, Apetrei R, Hille J, Fernie AR, Dijkwel PP** (2008) The *Arabidopsis* Onset of Leaf Death 5 Mutation of Quinolinate Synthase Affects Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthesis and Causes Early Ageing. *Plant Cell* **20**: 2909-2925
- Scholander PF, Hammel HT, Hemmingsen EA, Bradstreet ED** (1964) Hydrostatic Pressure and Osmotic Potentials in Leaves of Mangroves and Some Other Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **52**: 119-125
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K** (2007) Regulatory Metabolic Networks in Drought Stress Responses. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 296-302
- Shan D-P, Huang J-G, Yang Y-T, Guo Y-H, Wu C-A, Yang G-D, Gao Z, Zheng C-C** (2007) Cotton GhDREB1 Increases Plant Tolerance to Low Temperature and is Negatively Regulated by Gibberellic Acid. *New Phytol* **176**: 70-81
- Shao H-B, Chu L-Y, Jaleel CA, Zhao C-X** (2008) Water-deficit Stress-induced Anatomical Changes in Higher Plants. *CR Biol* **331**: 215-225
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2007) Gene Networks Involved in Drought Stress Response and Tolerance. *J Exp Bot* **58**: 221-227
- Shulaev V, Cortes D, Miller G, Mittler R** (2008) Metabolomics for Plant Stress Response. *Physiol Plantarum* **132**: 199-208
- Silva PEM, Cavatte PC, Morais LE, Medina EF, DaMatta FM** (2013) The Functional Divergence of Biomass Partitioning, Carbon Gain and Water Use in *Coffea canephora* in Response to the Water Supply: Implications for Breeding Aimed at Improving Drought Tolerance. *Environ Exp Bot* **87**: 49-57
- Sun T-p, Gubler F** (2004) Molecular Mechanism of Gibberellin Signaling in Plants. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 197-223

- Tahi H, Wahbi S, El Modafar C, Aganchich A, Serraj R** (2008) Changes in Antioxidant Activities and Phenol Content in Tomato Plants Subjected to Partial Root Drying and Regulated Deficit Irrigation. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **142**: 550-562
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2002) Important Roles of Drought- and Cold-inducible Genes for Galactinol Synthase in Stress Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **29**: 417-426
- Tran L-SP, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2007) Functional Analysis of AHK1/ATHK1 and Cytokinin Receptor Histidine kinases in Response to Abscisic Acid, Drought, and Salt Stress in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 20623-20628
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Engineering Drought Tolerance in Plants: Discovering and Tailoring Genes to Unlock the Future. *Curr Opin Biotech* **17**: 113-122
- Urano K, Maruyama K, Ogata Y, Morishita Y, Takeda M, Sakurai N, Suzuki H, Saito K, Shibata D, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2009) Characterization of the ABA-regulated Global Responses to Dehydration in *Arabidopsis* by Metabolomics. *Plant J* **57**: 1065-1078
- Wang S-S, Liu Z-Z, Sun C, Shi Q-H, Yao Y-X, You C-X, Hao Y-J** (2012) Functional Characterization of the Apple MhGAI1 Gene Through Ectopic Expression and Grafting Experiments in Tomatoes. *Plant Physiol* **169**: 303-310
- Wiese A, Christ MM, Virnich O, Schurr U, Walter A** (2007) Spatio-temporal Leaf Growth Patterns of *Arabidopsis thaliana* and Evidence for Sugar Control of the Diel Leaf Growth Cycle. *New Phytol* **174**: 752-761
- Wild M, Davière J-M, Cheminant S, Regnault T, Baumberger N, Heintz D, Baltz R, Genschik P, Achard P** (2012) The *Arabidopsis* DELLA RGA-LIKE3 Is a Direct Target of MYC2 and Modulates Jasmonate Signaling Responses. *Plant Cell* **24**: 3307-3319
- Wolters H, Juergens G** (2009) Survival of the Flexible: Hormonal Growth Control and Adaptation in Plant Development. *Nat Rev Genet* **10**: 305-317
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2005) Organization of cis-acting Regulatory Elements in Osmotic and Cold Stress Responsive Promoters. *Trends Plant Sci* **10**: 88-94
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 781-803
- Yamaguchi S, Kamiya Y** (2000) Gibberellin Biosynthesis: Its Regulation by Endogenous and Environmental Signals. *Plant Cell Physiol* **41**: 251 - 257
- Yang D-L, Yao J, Mei C-S, Tong X-H, Zeng L-J, Li Q, Xiao L-T, Sun T-p, Li J, Deng X-W, Lee CM, Thomashow MF, Yang Y, He Z, He SY** (2012) Plant Hormone Jasmonate Prioritizes Defense Over Growth by Interfering with Gibberellin Signaling Cascade. *Proc Natl Acad Sci* **109**: E1192-E1200

- Zawaski C, Busov VB** (2014) Roles of Gibberellin Catabolism and Signaling in Growth and Physiological Response to Drought and Short-Day Photoperiods in Populus Trees. *PLoS ONE* **9**: e86217
- Zentella R, Zhang Z-L, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, Sun T-p** (2007) Global Analysis of DELLA Direct Targets in Early Gibberellin Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 3037-3057
- Zeevaart JAD** (1986). Characterization of Three Single-gene Dwarf Mutants of Tomato. *J Cell Biochem* **S10B**: 33
- Zhu Y, Nomura T, Xu Y, Zhang Y, Peng Y, Mao B, Hanada A, Zhou H, Wang R, Li P, Zhu X, Mander LN, Kamiya Y, Yamaguchi S, He Z** (2006) Elongates Uppermost Internode Encodes a Cytochrome P450 Monooxygenase That Epoxidizes Gibberellins in a Novel Deactivation Reaction in Rice. *Plant Cell* **18**: 442-456
- Zhu Z, An F, Feng Y, Li P, Xue L, A M, Jiang Z, Kim J-M, To TK, Li W, Zhang X, Yu Q, Dong Z, Chen W-Q, Seki M, Zhou J-M, Guo H** (2011) Derepression of Ethylene-stabilized Transcription Factors (EIN3/EIL1) Mediates Jasmonate and Ethylene Signaling Synergy in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 12539-12544