

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE VEGETAL**

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE MUTANTES
FOTOMORFOGENÉTICOS DE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L. cv.
Micro-Tom) SOB DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Frederico Rocha Rodrigues Alves				
E-mail:	fred_rra@hotmail.com				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim		<input type="checkbox"/> Não		
Vínculo empregatício do autor:	Técnico de laboratório – Universidade Federal de Goiás				
Agência de fomento:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás	Sigla:	FAPEG		
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	
Título:	Respostas bioquímicas e fisiológicas de mutantes fotomorfogenéticos de tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Micro-Tom) sob deficiência hídrica				
Palavras-chave:	aurea, high-pigment 1, fluorescência da clorofila, enzimas antioxidantes				
Título em outra língua:	Biochemical and physiological responses of photomorphogenic tomato mutants (<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Micro-Tom) under water-withholding				
Palavras-chave em outra língua:	aurea, high-pigment 1, chlorophyll fluorescence, antioxidant enzymes				
Área de concentração:	Botânica				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	26/02/15				
Programa de Pós-Graduação:	Biodiversidade Vegetal				
Orientador (a):	Hyrandir Cabral de Melo				
E-mail:	hyrandir@yahoo.com.br				
Co-orientador (a):*					
E-mail:					

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

_____ Data: ____ / ____ / ____
Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

FREDERICO ROCHA RODRIGUES ALVES

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE MUTANTES
FOTOMORFOGENÉTICOS DE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L. cv.
Micro-Tom) SOB DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Botânica

Orientador: Prof. Dr. Hyrandir Cabral de Melo

GOIÂNIA
2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Alves, Frederico Rocha Rodrigues

Respostas bioquímicas e fisiológicas de mutantes fotomorfogênicos de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) sob deficiência hídrica [manuscrito] / Frederico Rocha Rodrigues Alves. - 2015.

73 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Hyrandir Cabral de Melo.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal, Goiânia, 2015.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, lista de figuras.

1. aurea. 2. high-pigment 1. 3. fluorescência da clorofila. 4. enzimas antioxidantes. I. Melo, Hyrandir Cabral de, orient. II. Título.

RESUMO

Respostas Bioquímicas e Fisiológicas de Mutantes Fotomorfogênicos de Tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) Sob Deficiência Hídrica - Processos fisiológicos dependentes de fitocromos estão sendo elucidados por meio de plantas mutantes fotomorfogênicos. Em tomate (*Solanum lycopersicum* L.), o mutante *aurea* é deficiente em fitocromo e o mutante *high-pigment 1 (hp1)* possui respostas exageradas à luz. Fitocromos estão relacionados a várias respostas de estresse abiótico e biótico devido ao seu papel na regulação da transcrição de genes específicos, agindo sobre mecanismos bioquímicos e moleculares de sinalização celular. Neste trabalho, foram analisados os efeitos da deficiência hídrica sobre o potencial hídrico, as taxas de trocas gasosas, parâmetros de fluorescência da clorofila, conteúdo de pigmentos cloroplastídicos e malondialdeído (MDA) e atividade de enzimas do metabolismo antioxidativo de tomates mutantes fotomorfogênicos *aurea* e *hp1*, bem como a cultivar selvagem Micro-Tom (MT). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação sob condições controladas de temperatura (24-27°C) e umidade (60-70%). As análises foram realizadas em plantas de 35 dias de idade (n=5) cuja irrigação foi suspensa por 5 dias e reidratadas no sexto dia. Como grupo controle, cinco plantas de cada genótipo permaneceram sob disponibilidade hídrica normal. A deficiência hídrica diminuiu o potencial hídrico e afetou as taxas de trocas gasosas de todos os genótipos analisados, com quedas nas taxas de fotossíntese e condutância estomática a partir do quarto dia de tratamento. Em geral, os parâmetros de fluorescência inicial e rendimento quântico potencial não foram afetados pela deficiência hídrica, enquanto MT apresentou queda significativa para o rendimento quântico efetivo, taxa de transporte de elétrons e aumento do *quenching* não-fotoquímico, fatos não registrados para os mutantes durante o período de tratamento. O mutante *hp1* possui maior concentração de clorofila a, clorofila b e carotenoides, este último com papel crucial na defesa contra o estresse oxidativo. Em condições de déficit hídrico, MT deteve maior conteúdo de MDA em relação aos mutantes e *aurea* possui maior atividade de catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase. Os dados permitem concluir que os mutantes apresentam maior tolerância à deficiência hídrica em relação a cultivar selvagem.

Palavras-chave: *aurea*, *high-pigment 1*, fluorescência da clorofila, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Biochemical and Physiological Responses of Photomorphogenic Tomato Mutants (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) Under Water-

Withholding - Phytochrome-dependent physiological processes are being unveiled by photomorphogenic mutant plants. In tomato (*Solanum lycopersicum* L.), the *aurea* mutant is phytochrome-deficient and the *high-pigment 1* mutant (*hp1*) has exaggerated light responses. Phytochromes are related to many abiotic and biotic stress responses due to its role in the regulation of specific genes transcription, acting upon biochemical and molecular mechanisms of cell signaling. Here, we examined the effects of water-withholding over water potential, leaf gas exchanges, chlorophyll fluorescence parameters and chloroplast pigments content in photomorphogenic tomato mutants *aurea* and *hp1*, as well its wild-type cultivar Micro-Tom (MT). The plants were grown in a greenhouse under controlled conditions of temperature (24-27°C) and humidity (60-70%). Analysis were made in 35-days-old plants (n=5) which irrigation was suspended for 5 days and then rehydrated in the sixth day. As control, five plants of each genotype remained well-watered. Water-withholding decreased the water potential and affected leaf gas exchange rates in all studied genotypes, decreasing rates of photosynthesis and stomatal conductance from the fourth treatment day on. Initial fluorescence and PSII potential quantum efficiency were not affected by the water-withholding treatment in general, but MT showed significant decrease in PSII operating efficiency and electron transport rate as well as an increase in non-photochemical quenching parameters, facts not registered for the mutants during the treatment period. *hp1* mutant has the highest content of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids, this last playing a central role in the oxidative stress defense. Under water-withholding conditions, MT presented the highest MDA concentration and *aurea* displayed high activities of catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase when compared to the other genotypes. The present data allows the conclusion that the mutants have higher tolerance to drought stress than the wild Micro-Tom genotype.

Keywords: *aurea*, *high-pigment 1*, chlorophyll fluorescence, antioxidant enzymes.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspectos fenotípicos dos mutantes fotomorfológicos de tomateiro *aurea* (A e B) e *high-pigment 1* (C e D).....9
- Figura 2.** Potencial hídrico (em MPa) das folhas dos genótipos selvagem (MT), *aurea* (*au*) e *high-pigment 1* (*hp1*) de microtomateiros em condições de disponibilidade normal de água (controle) e sob deficiência hídrica por 5 dias (estresse). n=4.....28
- Figura 3.** Taxas de fotossíntese (*A*, em $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (*A*), condutância estomática (*gs*, em $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (*B*) e transpiração (*E*, em $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (*C*) das folhas dos genótipos selvagem (MT), *aurea* (*au*) e *high-pigment 1* (*hp1*) de microtomateiros em condições de disponibilidade normal de água (ctrl) e sob deficiência hídrica por 5 dias (str) ao longo dos dias de experimento (1-6). n=5..30
- Figura 4.** Fluorescência inicial (*F_o*) (*A*), rendimento quântico potencial (*F_v/F_m*) (*B*) e rendimento quântico efetivo (*F_q'/F_m'*) (*C*) dos genótipos selvagem (MT), *aurea* (*au*) e *high-pigment 1* (*hp1*) de microtomateiros em condições de disponibilidade normal de água (ctrl) e sob deficiência hídrica por 5 dias (str) ao longo dos dias de experimento (1-6). n=5.....32
- Figura 5.** Taxa de transporte de elétrons (ETR) (*A*) e *Quenching* não-fotoquímico (NPQ) (*B*) dos genótipos selvagem (MT), *aurea* (*au*) e *high-pigment 1* (*hp1*) de microtomateiros em condições de disponibilidade normal de água (ctrl) e sob deficiência hídrica por 5 dias (str) ao longo dos dias de experimento (1-6). n=5..33
- Figura 6.** Conteúdo de pigmentos cloroplásticos clorofila a (*A*), clorofila B (*B*), razão clorofila a: clorofila b (*C*) e carotenoides (*D*) dos genótipos selvagem (MT), *aurea* (*au*) e *high-pigment 1* (*hp1*) de microtomateiros em condições de disponibilidade normal de água (ctrl) e sob deficiência hídrica por 5 dias (str) ao longo dos dias de experimento (1-6). n=5.....34
- Figura 7.** Conteúdo de malondialdeído (MDA) (*A*) e atividade enzimática da catalase (CAT) (*B*), ascorbato peroxidase (APX) (*C*), superóxido dismutase (SOD) (*D*), fenilalanina amônia liase (PAL) (*E*) e peroxidase não-específica (POX) (*F*) dos genótipos selvagem (MT), *aurea* (*au*) e *high-pigment 1* (*hp1*) de

microtomateiros em condições de disponibilidade normal de água (controle) e sob deficiência hídrica por 5 dias (estresse). n=4.....	36
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A.....	fotossíntese (em $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
APX.....	ascorbato peroxidase
<i>au</i>	<i>aurea</i>
CAT.....	catalase
CTE.....	cadeia transportadora de elétrons
<i>E</i>	transpiração (em $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
EROs.....	espécies reativas de oxigênio
ETR.....	taxa aparente de transporte de elétrons
Fm.....	fluorescência máxima (em condições de escuro)
Fo.....	fluorescência inicial (em condições de escuro)
Fq'/Fm'.....	rendimento quântico efetivo do fotossistema II
FSII.....	fotossistema II
Fv/Fm.....	rendimento quântico potencial do fotossistema II
<i>gs</i>	condutância estomática (em $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
<i>hp1</i>	<i>high-pigment 1</i>
MDA.....	malondialdeído
MT.....	Micro-Tom
NPQ.....	<i>quenching</i> não-fotoquímico
PAL.....	fenilalanina amônia liase
POX.....	peroxidase não-específica
RuBisCO.....	enzima ribulose bifosfato carboxilase oxigenase
SOD.....	superóxido dismutase

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	vii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	3
REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
RESULTADOS.....	29
DISCUSSÃO.....	39
CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

INTRODUÇÃO

Fitocromos são pigmentos proteicos presentes nos vegetais capazes de absorver a luz na faixa do vermelho e vermelho-distante, entre 660 e 730 nm (Hughes 2010). Estes fotorreceptores estão relacionados com diversos processos, como a germinação de sementes, fototropismo, ritmos circadianos e floração, sendo portanto intermediários bioquímicos entre a percepção da luz e o desenvolvimento da planta (Castillon *et al.* 2007).

Além de sua importância nos processos de fotomorfogênese, descobertas recentes também têm associado o fitocromo a respostas desencadeadas por estresse abiótico como a seca, devido ao seu papel na regulação da transcrição de genes específicos e atividade enzimática, influenciando mecanismos bioquímicos e moleculares de sinalização celular (Schopfer 1977; Carvalho *et al.* 2011b).

Em um âmbito global, a seca aliada às altas temperaturas e incidência de radiação luminosa, agem como os principais fatores que restringem a sobrevivência das plantas e a produtividade das culturas vegetais (Boyer 1982). Devido ao crescente cenário de escassez de água e mudanças climáticas, o conhecimento do estresse por deficiência hídrica e uso da água em relação ao crescimento das plantas é de fundamental importância para melhorar e incrementar as práticas de manejo e cultivo na agricultura e para formular hipóteses sobre o destino das vegetações nativas em decorrência das mudanças climáticas (Chaves *et al.* 2003). As plantas, enquanto seres sésseis, desenvolveram mecanismos específicos de aclimatação e adaptação para sobreviverem a condições temporárias e duradouras de deficiência hídrica. A análise destes mecanismos contribui, portanto, para o conhecimento de tolerância e resistência ao estresse ambiental (Harb *et al.* 2010).

A relação do fitocromo com as respostas das plantas aos estresses abióticos como a seca pode ser estudada através de plantas que apresentam mutações específicas em relação à biossíntese ou à transdução do sinal desencadeada por este fotorreceptor. A pesquisa dos mutantes, denominados fotomorfogênicos, pode auxiliar a determinar se uma resposta ou processo fisiológico em estudo é mediada por fitocromo. Em tomateiros (*Solanum*

lycopersicum L.), o mutante *aurea* é deficiente no *pool* total de fitocromos (Terry & Kendrick 1996; Muramoto *et al.* 2005) e o mutante *high-pigment 1* (*hp1*) apresenta hipersensibilidade às respostas mediadas por luz (Kendrick *et al.* 1997; Liu *et al.* 2004).

O estudo das respostas de uma planta à seca pode ser feito pela análise de muitas variáveis, dentre elas, taxas de trocas gasosas, conteúdo de pigmentos cloroplastídicos, parâmetros de fluorescência e atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, que juntos constituem uma importante abordagem para a avaliação da integridade da planta.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar a influência do fitocromo sobre respostas fisiológicas de plantas submetidas à deficiência hídrica através do uso de microtomateiros mutantes fotomorfogenéticos.

Objetivo específico

Avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas de tomateiros da cultivar Micro-Tom (selvagem) e de seus mutantes fotomorfogenéticos *aurea* e *hp1*, quando cultivados em condições de deficiência hídrica, quanto ao potencial hídrico, taxas de fotossíntese, condutância estomática e transpiração, parâmetros de fluorescência da clorofila, conteúdos de pigmentos cloroplastídicos e malondialdeído e atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo antioxidativo.

REFERENCIAL TEÓRICO

Fitocromos e estresse por deficiência hídrica

A luz, além de um recurso de energia para a fotossíntese, também fornece informações importantes para as plantas a respeito do ambiente em que elas se encontram. A qualidade, quantidade e direção da luz incidente são traduzidos através dos fotorreceptores (Franklin *et al.* 2005). Estes receptores convertem os sinais luminosos do ambiente em sinais bioquímicos que, por meio de diversas rotas metabólicas, resultarão em mudanças moleculares e fisiológicas capazes de modular o crescimento e desenvolvimento vegetal, em um processo denominado fotomorfogênese.

O fitocromo foi o primeiro dos fotorreceptores a ser identificado através de pesquisas envolvendo o efeito da luz vermelha e vermelho-distante sobre a germinação de sementes de alface. Nestes estudos iniciais, o fitocromo foi identificado e caracterizado como sendo uma cromoproteína fotorreversível: sua forma F_v absorve a luz em comprimentos de onda na região do vermelho (λ entre 650 e 670 nm) e se converte na forma ativa F_{vD} , que, por sua vez, é capaz de absorver a luz na região do vermelho-distante (λ entre 705 e 730 nm) e retornar à sua forma inicial F_v (Borthwick *et al.* 1952; Borthwicks *et al.* 1954; Borthwick 1957; Butler *et al.* 1959; Borthwick & Hendricks 1960). No entanto, sem maiores efeitos fisiológicos, ambos os isômeros dos fitocromos também absorvem radiação na faixa do azul/violeta, de 320-400nm e também há um pico de absorção pelo isômero F_v na faixa do ultravioleta a 280 nm (Briggs & Olney, 2001; Chen *et al.* 2004).

O fitocromo é formado pela dimerização de duas subunidades idênticas. Cada um dos monômeros é composto por uma molécula de pigmento denominada cromóforo, responsável pela absorção de luz, e uma cadeia polipeptídica chamada apoproteína. Nas plantas superiores, o cromóforo do fitocromo é um tetrapirrol linear denominado fitocromobilina, sintetizado nos plastídeos. Ao ser exportada do plastídeo para o citosol, a fitocromobilina se liga à apoproteína de forma autocatalítica por meio de uma ligação tioéster a um resíduo de cisteína, formando a holoproteína (Li & Lagarias 1992; Rockwell *et al.* 2006; Kevei *et al.* 2007).

As apoproteínas PHY são codificadas por uma pequena família de genes nas angiospermas. Por exemplo, *Arabidopsis* contem cinco genes PHY (*PHYA* a *PHYE*), a mesma quantidade em tomateiro (*PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* e *PHYF*), enquanto o arroz possui apenas três (*PHYA* a *PHYC*) (Sharrock & Quail 1989; Clack *et al.* 1994; Hauser *et al.* 1995; Bae & Choi 2008). Devido a isso, os diferentes fitocromos apresentam propriedades moleculares distintas e podem apresentar funções semelhantes ou diferentes nas plantas (Bae & Choi 2008).

No citosol, o fitocromo é dimerizado em seu estado inativo F_v. A absorção de luz vermelha pelo cromóforo faz com que este sofra uma isomerização da forma *cis* para a *trans*, através da rotação de um dos seus anéis, ocasionando uma alteração conformacional na holoproteína para seu estado fisiologicamente ativo F_{vd}. Esta mudança faz com que sequências de localização nuclear sejam expostas, movendo o *pool* de fitocromo para o núcleo, onde ele é capaz de regular a expressão gênica (Quail 2002; Nagatani 2004; Chen *et al.* 2005; Kevei *et al.* 2007; Fankhauser & Chen 2008). Assim sendo, o fitocromo atua como um interruptor ativado por luz vermelha para realizar alterações na transcrição de genes, a depender do balanço entre suas formas ativa e inativa.

Através da modulação da expressão gênica, o fitocromo está diretamente relacionado com importantes respostas fisiológicas durante o ciclo de vegetal, como a germinação, desestiolamento e floração, além de movimentos em direção à luz e evitação de sombra (Smith 1995; Fankhauser & Chory 1997). Além de suas funções na fotomorfogênese, descobertas recentes têm associado o fitocromo à uma gama de respostas a estresses abióticos e bióticos, como a seca, extremos de temperatura, metais pesados e herbivoria (Carvalho *et al.* 2011b).

Os fitocromos estão relacionados a várias respostas morfológicas e fisiológicas que afetam a aquisição, transporte e perda de água, além do ganho de carbono. A superexpressão de *phyB* aumentou a condutância estomática, fotossíntese e transpiração em plantas de batata em condições de campo (Boccalandro *et al.* 2003), além de estar relacionado com a regulação positiva de genes do desenvolvimento de estômatos, afetando a abertura (Wang *et al.* 2010) e a densidade e índice estomáticos (Boccalandro *et al.* 2009) em *Arabidopsis*. *phyA* é um fator chave na promoção do diâmetro dos vasos xilemáticos de tomateiros,

tendo importância no aumento da condutância da água até às folhas em plantas sujeitas a condições de alta transpiração (Auge *et al.* 2012), função semelhante à desempenhada pelo phyB em pepineiros adultos (Casal *et al.* 1994).

Os fitocromos também estão diretamente relacionados com a concentração de ácido abscísico (ABA) e sua sinalização em diversas espécies (Kraepiel *et al.* 1994; Sawada *et al.* 2008; Boggs *et al.* 2010; González *et al.* 2012). Em plantas expostas a condições de seca, as concentrações de ABA aumentam e induzem o fechamento dos estômatos e a promoção de vários genes relacionados ao estresse, que podem aumentar a tolerância ao déficit hídrico (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 2007).

A cultivar Micro-Tom e tomateiros mutantes fotomorfo genéticos

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), além de sua reconhecida importância econômica, possui diversas características que o tornam um proeminente modelo de planta para estudos genéticos e fisiológicos por ser uma espécie autogâmica diploide com um genoma relativamente compacto distribuído em 12 cromossomos, rica coleção de germoplasma conhecida e protocolos de transformação altamente eficientes. O tomateiro ainda é apontado como um modelo vegetal alternativo à *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh por possuir características como um fruto carnoso climatérico, folhas compostas, tricomas glandulares, capacidade de associar a fungos micorrízicos e padrão morfo genético semelhante à maioria das angiospermas, com órgãos bem visíveis como caules e pecíolos (Sun *et al.* 2006; Mueller *et al.* 2009; Campos *et al.* 2010).

Inicialmente produzida para finalidades ornamentais pelo cruzamento de duas cultivares anãs, a cultivar de tomateiro Micro-Tom (MT) apresenta características vantajosas para o seu cultivo e estudo como modelo biológico. Os microtomateiros possuem baixa estatura (cerca de 15 cm de altura), rápido ciclo de vida (entre 70 e 90 dias) e podem ser cultivados em vasos com capacidade para 150 mL de substrato, otimizando o espaço disponível nas estufas e laboratórios. Todas estas características fizeram com o que a cv. Micro-Tom fosse utilizada como cultivar preferencial para uma série de pesquisas

bioquímicas, genéticas, anatômicas e fisiológicas em tomateiros (Scott & Harbaugh 1989; Meissner *et al.* 1997; Emmanuel & Levy 2002; Carvalho *et al.* 2011c).

Uma das maneiras mais diretas para determinar a função de um gene é através da análise das mudanças ocorridas no organismo quando um gene em particular sofre mutação. O isolamento de mutantes que exibem alterações fenotípicas específicas pode oferecer uma poderosa ferramenta em potencial para elucidar os passos de uma cadeia de transdução de sinais, como é o caso das respostas de fotomorfogênese (Koornneef & Kendrick 1986; Emmanuel & Levy 2002).

Mutações utilizadas para decifrar as sequências da transdução de sinais podem ser divididas em duas categorias: mutações para o receptor ou para a resposta a determinado sinal. Mutações para o receptor afeta a abundância ou a integridade funcional deste, constituindo a categoria mais utilizada para examinar os mecanismos de ação primários da cadeia. Assim, espera-se que todas as características fenotípicas reguladas por este receptor sejam anormais, enquanto os mutantes para a resposta exibiriam um espectro mais limitado de alterações (Koornneef & Kendrick 1986).

Os estudos de fotomorfogênese podem ser feitos utilizando, portanto, mutantes para a síntese dos fotorreceptores (como o fitocromo) ou mutantes para a via de transdução de sinais que se seguem imediatamente após a percepção da luz. Sendo assim, a análise destes mutantes auxiliaria na atribuição de papéis fisiológicos a componentes específicos da cadeia das respostas fotomorfogênicas (Van Tuinen *et al.* 1997).

A gama de mutações encontradas em tomateiro é outra característica vantajosa do seu uso como planta modelo. Através de uma série de cruzamentos e retrocruzamentos, pesquisadores brasileiros conseguiram introgradir uma série de mutações fotomorfogênicas na cultivar Micro-Tom, provendo uma coleção disponível para estudos de fisiologia e genética vegetal (Carvalho *et al.* 2011c).

O mutante *aurea* é deficiente na síntese do cromóforo do fitocromo devido a uma mutação no gene que codifica a enzima fitocromobilina sintase. O cromóforo é sintetizado no plastídeo a partir de um grupo heme em duas etapas: na primeira, o anel macrocíclico do heme é clivado pela enzima heme oxigenase, dando

origem a um tetrapirrol linear chamado biliverdina IX α . A redução deste composto pela enzima fitocromobilina sintase dá origem à 3(Z)-fitocromobilina que por ação de uma isomerase gera a 3(E)-fitocromobilina, composto que é exportado para o citosol onde se combina de maneira autocatalítica com a apoproteína do fitocromo para formar a holoproteína. Como todos as formas de fitocromo utilizam o mesmo cromóforo, o mutante *aurea* é deficiente no *pool* geral de fitocromos (Terry *et al.* 1993, 1995; Terry & Kendrick 1996; Terry 1997; Muramoto *et al.* 2005).

A característica fenotípica mais evidente do mutante *aurea* são suas folhas amareladas, especialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento, decorrente do seu reduzido conteúdo de clorofilas (Figura 1a-b). A via de biossíntese das clorofilas deriva do ácido aminolevulínico (ALA), que também dá origem ao heme utilizado na síntese do cromóforo. Uma vez que o mutante *aurea* sintetiza o cromóforo em baixa quantidade, o seu precursor heme se acumula, atuando como um inibidor na síntese de ALA e por consequência, diminuindo também a biossíntese de clorofilas (Terry & Kendrick 1999).

A mutação *aurea* é considerada vazada, pois as suas respostas dependentes de fitocromo são normalizadas próximas ao estágio de floração, indicando que eles podem sintetizar alguma quantidade de fitocromo funcional no estágio adulto. Apesar disso, o seu fenótipo de folhas amareladas se mantém durante todo o ciclo de vida, possivelmente devido a alterações no desenvolvimento dos plastídeos e na redução da expressão dos genes *CAB* (*chlorophyll a/b-binding protein*) (dependente de fitocromo), que codificam proteínas responsáveis pela estabilização dos pigmentos cloroplastídicos nos fotossistemas (Sharrock *et al.* 1988; Ken-Dror & Horwitz 1990; López-Juez 1990; Van Tuinen *et al.* 1996; Terry *et al.* 2001).

O mutante *high-pigment 1* (*hp1*) possui uma mutação no gene homólogo à *DDB1* (UV-DAMAGED DNA-BINDING PROTEIN 1) de *Arabidopsis*, que codifica uma proteína que interage diretamente com DET1 (DE-ETIOLATED 1), um repressor da transdução de sinais luminosos. Assim sendo, as respostas fotomorfológicas são amplificadas neste mutante (Lieberman *et al.* 2004; Liu *et al.* 2004).

Os resultados da mutação em tomateiros são perceptíveis ainda no estágio de plântula através do hipocótilo não-alongado e rosado, devido ao acúmulo de antocianinas. As folhas e frutos apresentam coloração verde-escura, devido aos altos níveis de clorofila (Figura 1c-d). Reporta-se ainda grande quantidade de carotenoides e vitamina C nos frutos (Thompson 1962; Kerr 1965; Jarret *et al.* 1984; Peters *et al.* 1989, 1992; Kerckhoffs *et al.* 1997; Cookson *et al.* 2003).

A mutação *hp1* é pleiotrópica para diferentes respostas fotomorfogénicas. A fotoindução de várias enzimas como a fenilalanina amônia-liase, chave na síntese de compostos antioxidantes, nitrato redutase e nitrito redutase, importantes no metabolismo do nitrogênio, além da amilase são amplificadas neste mutante. Os genes CAB e RBCs, que codifica este último para uma subunidade da enzima RuBisCO, também são superexpressos (Goud *et al.* 1991; Goud & Sharma 1994; Peters *et al.* 1998).

O aumento no conteúdo de clorofila e carotenoides no mutante *hp1* é explicado, em parte, pelo aumento no tamanho e densidade de seus plastídeos, principalmente no parênquima paliçádico, fornecendo assim um maior compartimento para a síntese e armazenamento destes pigmentos (Cookson *et al.* 2003; Liu *et al.* 2004; Melo *et al.* 2011).

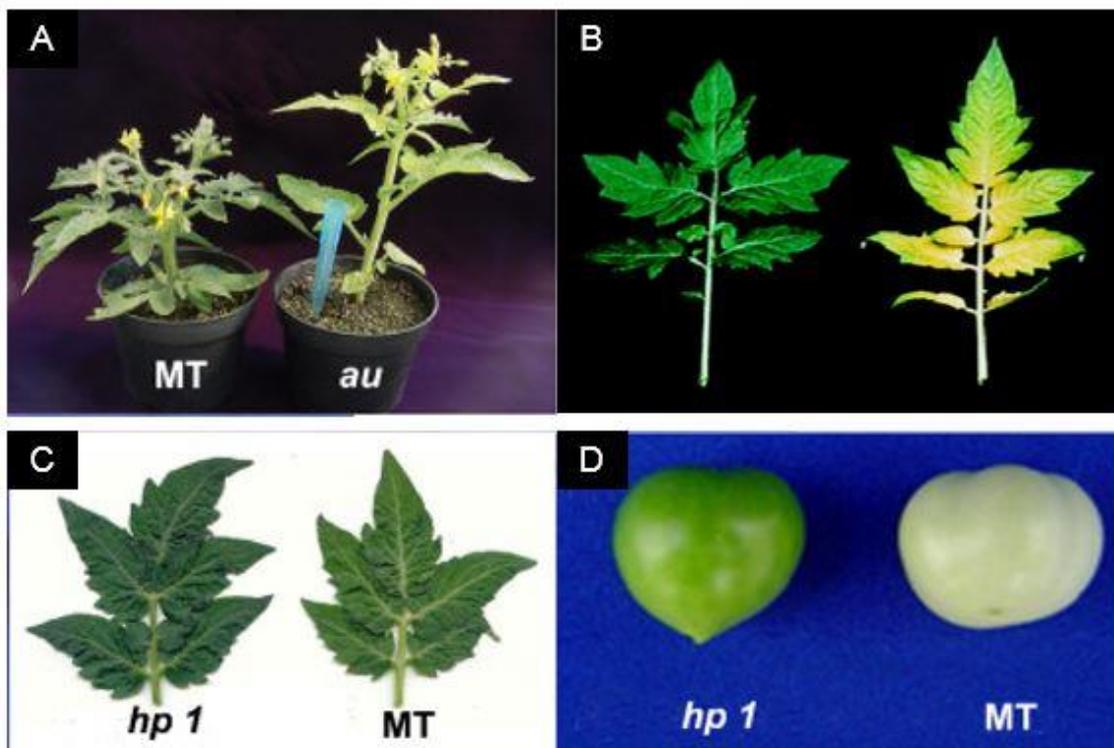


Figura 1 – Aspectos fenotípicos dos mutantes fotomorfogenéticos de tomateiro *aurea* (A e B) e *high-pigment 1* (C e D). (A) Comparação da cultivar selvagem (MT) e do mutante *aurea* (*au*) em estágio de floração. (B) O fenótipo de folhas amareladas é evidente em *aurea* (à direita) em comparação às folhas da cultivar selvagem. (C) Folhas do mutante *hp1* e da cultivar selvagem (MT). (D) Frutos do mutante *hp1* e da cultivar selvagem (MT). Créditos das imagens: Carvalho *et al.* (2011) (A, C e D) e Terry & Kendrick (1999) (B).

Espécies reativas de oxigênio (EROs)

O oxigênio, que surgiu na atmosfera terrestre principalmente como produto da fotossíntese, é uma faca de dois gumes para organismos aeróbicos: apesar de permitir uma eficiente produção de energia por meio da combustão enzimática de compostos orgânicos, ao mesmo tempo gera danos às células devido à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que reagem com diversas classes de biomoléculas (Bartosz 1997).

A necessidade por oxigênio talvez possa obscurecer o fato de que ele é um gás tóxico e mutagênico, além de ser um radical livre. Um radical livre é qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons não-pareados, ou seja, ocupa um orbital molecular ou atômico sozinho (Halliwell & Gutteridge 2006). A molécula de O₂ possui dois elétrons não-pareados com o mesmo número quântico de spin, fazendo com que ele aceite um elétron de cada vez, gerando as EROs, intermediários quimicamente reativos e biologicamente tóxicos (Cadenas 1989; Gill & Tuteja 2010).

Nos vegetais, os cloroplastos e as mitocôndrias são os principais produtores de EROs quando suas cadeias transportadoras de elétrons se encontram super-reduzidas. Assim sendo, o oxigênio age comoceptor de elétrons e não é reduzido completamente à água, gerando intermediários altamente reativos (Bartosz 1997; Moller 2001; Foyer & Noctor 2003; Asada 2006). O peroxissomo também é responsável pela produção de EROs devido à ação das enzimas do processo de fotorrespiração (Del Rio *et al.* 2006).

A oxidação incompleta do oxigênio pode dar origem a EROs como o superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (HO^{\bullet}). A excitação do oxigênio leva à uma mudança na distribuição eletrônica nos orbitais moleculares, resultando no oxigênio singleto (1O_2), uma outra ERO. Por serem altamente reativas, causam danos a proteínas, lipídios, carboidratos e DNA que podem culminar na morte celular (Bartosz 1997; Gill & Tuteja 2010).

Durante milhões de anos de evolução, organismos aeróbicos apenas sobreviveram à ameaça imposta pelo oxigênio através da elaboração de mecanismos antioxidantes capazes de minimizar as ações nocivas das EROs (Halliwell 2006) e até mesmo utilizando-os como meio de defesa e mensageiros celulares (Babior 1991; Khan & Wilson 1995; Foyer & Noctor 2005). Entre os sistemas antioxidantes enzimáticos, podemos citar as superóxido dismutases (SODs), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), fenilalanina amônia liase (PAL) e peroxidases não-específicas (POX) (Apel & Hirt 2004; Mittler *et al.* 2004).

Em toda célula aeróbica, existe um equilíbrio dinâmico entre as reações que geram EROs e os antioxidantes. Uma mudança neste equilíbrio a favor das reações oxidativas acarreta o estado conhecido como estresse oxidativo (Arora *et al.* 2002; Oztetik 2011). O equilíbrio entre a produção e a dissipação de EROs pode ser perturbado por vários fatores de estresse abióticos e bióticos como luz, salinidade, radiação UV, seca, metais pesados, extremos de temperatura, deficiência nutricional, poluição do ar, herbicidas e ataques de patógenos (Gill & Tuteja 2010).

A produção de espécies reativas de oxigênio, como o superóxido, peróxido de hidrogênio, hidroxil e oxigênio singleto é uma consequência inevitável do metabolismo aeróbico. Tipicamente, se verifica maior dano às células vegetais sob condições de estresse quando os níveis de EROs são mais elevados. Ao mesmo tempo, os produtos oxidados também podem ser importantes como moléculas sinalizadoras secundárias e nesses casos, o dano e a sinalização celular são dois lados da mesma moeda.

Os danos causados pela ação das EROs podem ser quantificados pela ocorrência de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica pode ser descrita, de forma geral, como o processo no qual oxidantes como as EROs atacam lipídios

que contêm ligações duplas entre átomos de carbono, especialmente ácidos graxos poliinsaturados. A peroxidação envolve a retirada de um íon hidrogênio e a inserção de um átomo de oxigênio nesta ligação dupla, resultando em radicais peróxil ou hidroperóxidos. Um destes produtos é o malondialdeído (MDA), gerado pela decomposição do ácido araquidônico e de ácidos graxos maiores (Ayala *et al.* 2014). A presença de MDA é considerada como um indicador da ocorrência de danos decorrentes do estresse oxidativo em plantas (Arcoverde *et al.* 2011; Monteiro *et al.* 2012; Murshed *et al.* 2013).

Superóxido ($O_2^{\bullet -}$)

O principal sítio de produção do radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) é o acceptor primário de elétrons do fotossistema I, ancorado na membrana dos tilacóides do cloroplasto.

A produção de EROs é uma consequência inevitável da respiração aeróbica. Quando as oxidases terminais (citocromo c oxidase e oxidase alternativa) reagem com O_2 , quatro elétrons são transferidos para esta molécula e H_2O é liberada. Porém, ocasionalmente O_2 pode reagir com outros componentes da cadeia transportadora de elétrons. Quando apenas um elétron é transferido para o oxigênio, o resultado é o radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), uma ERO moderadamente reativa com aproximadamente 2-4 μs de meia-vida (Gill & Tuteja 2010).

A geração de $O_2^{\bullet -}$ pode levar à formação de outras EROs mais reativas como o hidroxil, OH^{\bullet} , e oxigênio singleto, 1O_2 , que podem causar peroxidação de membranas lipídicas e desestabilização da célula. O radical $O_2^{\bullet -}$ também pode sofrer protonação e dar origem a um agente oxidante mais forte, o peridroxil, HO_2^{\bullet} , em membranas de superfícies carregadas negativamente, que podem atacar diretamente ácidos graxos poli-insaturados (Bielski *et al.* 1983).

Oxigênio singleto (1O_2)

O oxigênio singleto, 1O_2 , é o primeiro estado eletrônico excitado do oxigênio e não é uma ERO comum pois não ocorre devido à transferência de elétrons para o O_2 . A dissipação insuficiente de energia durante a fotossíntese pode levar à formação de um estado da clorofila denominado tríplete, que reage com o ozônio,

resultando em $^1\text{O}_2$. O oxigênio singleto é um subproduto natural da fotossíntese, formado em sua maioria no fotossistema II mesmo em condições de pouca luminosidade (Buchert & Forreiter 2010).

Vários estresses abióticos como a salinidade e a seca, que levam ao fechamento dos estômatos e diminuem a concentração de CO_2 no cloroplasto favorecem a formação de $^1\text{O}_2$. O oxigênio singleto é um agente oxidante que age sobre uma ampla gama de moléculas biológicas, reagindo com proteínas, pigmentos, ácidos nucleicos e lipídios e uma das EROs responsáveis pelo processo de perda de atividade do fotossistema II e da ATP-sintase, que pode acarretar na morte celular (Krieger-Liszkay *et al.* 2008; Buchert & Forreiter 2010).

Alguns estudos têm demonstrado que o oxigênio singleto não atua primariamente como uma toxina mas sim como sinal que ativa diversas rotas bioquímicas de resposta a estresses (Op den Camp *et al.* 2003; Kim & Apel 2013). A oxidação do β -caroteno pelo $^1\text{O}_2$ nos centros de reação do fotossistema II produzem derivados, como o β -ciclocitral ou β -ionono, que podem ter diversos efeitos biológicos, incluindo toxicidade, proteção contra herbívoros e sinalização de estresse, regulação a expressão de genes envolvidos na tolerância ao próprio oxigênio singleto (Havaux 2013). Algumas plantas, por meio de cromóforos de fenalenonas em fitoalexinas, são capazes de sintetizar $^1\text{O}_2$ em resposta a ataques de patógenos, contribuindo para a defesa da planta (Flors & Nonell 2006).

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

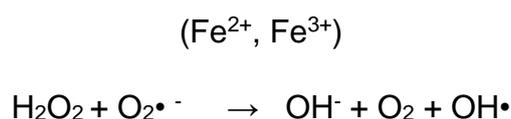
A redução univalente do $\text{O}_2^{\bullet-}$ produz o peróxido de hidrogênio. H_2O_2 é moderadamente reativo, possui uma meia-vida relativamente mais longa (1 ms) e bastante estável quando comparado às demais EROs (em torno de 2-4 μs). O principal efeito do peróxido de hidrogênio é inativar proteínas através da oxidação do grupo tiol em cisteínas e atuando sobre grupos compostos por ferro e enxofre (Bhattacharjee 2005; Mhamdi *et al.* 2012).

H_2O_2 possui dois papéis nos vegetais: em baixas concentrações, pode atuar como uma molécula sinalizadora envolvida na ativação de processos de aclimação e tolerância a diversos estresses abióticos e bióticos e em altas concentrações, pode levar à morte celular programada. Por ser uma molécula

de vida relativamente longa e de alta permeabilidade através de membranas, o peróxido de hidrogênio pode ser considerado um mensageiro secundário para sinais gerados através das EROs (Quan *et al.* 2008). H₂O₂ atua também como regulador-chave em uma ampla gama de processos fisiológicos como senescência, fotorrespiração e fotossíntese, movimento estomático, ciclo celular, crescimento e desenvolvimento (Gill & Tuteja 2010).

Radical hidroxil (OH•)

O radical hidroxil (OH•) é uma das EROs conhecidas mais reativas. Na presença de metais como ferro, OH• pode ser produzido a partir de O₂•⁻ e H₂O₂ em pH neutro e em temperatura ambiente através da reação de Fenton catalisada por ferro:



O radical hidroxil é responsável por mediar grande parte da toxicidade do oxigênio in vivo. OH• potencialmente pode reagir com todas as moléculas biológicas incluindo DNA, proteínas, lipídios e demais constituintes celulares. Devido à ausência de qualquer mecanismo enzimático capaz de eliminar esta ERO altamente reativa, um excesso na produção de OH• inevitavelmente culmina na morte celular (Gill & Tuteja 2010; Schmitt *et al.* 2014).

Mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante nos vegetais

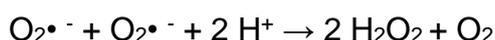
Superóxido dismutases (SODs) EC 1.15.1.1

As superóxido dismutases estão entre as metaloenzimas antioxidantes intracelulares mais eficientes presentes em todos os organismos aeróbicos e em todos os compartimentos subcelulares suscetíveis ao estresse oxidativo mediado por EROs.

Baseado no co-fator metálico utilizado por esta enzima, SODs são classificadas em três grupos: ferro-SODs (Fe SODs) localizadas no cloroplasto, manganês-

SODs (Mn SODs) presentes nas mitocôndrias e peroxissomos e cobre-zinco SODs (Cu-Zn SODs) encontradas no cloroplasto, citosol e provavelmente também no espaço extracelular (Alscher *et al.* 2002). A razão evolutiva para o surgimento de SODs com diferentes co-fatores metálicos é provavelmente relacionada com a disponibilidade destes compostos na biosfera em relação à quantidade de oxigênio na atmosfera em diferentes eras geológicas (Bannister *et al.* 1991).

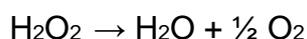
O processo de catálise das SODs é feito pela atração de moléculas negativamente carregadas de $O_2^{\bullet -}$ a um sítio ativo formado por aminoácidos positivamente carregados. O metal presente neste sítio ativo doa um elétron diretamente para o $O_2^{\bullet -}$, reduzindo-a a H_2O_2 pela reação com um próton e uma outra molécula de superóxido é oxidada a O_2 (Bowler *et al.* 1994; Gill & Tuteja 2010):



A dismutação espontânea do superóxido também acontece, porém a superóxido dismutase catalisa esta reação, fazendo com que ocorra em uma taxa até 10000 vezes mais rápida do que em sua ausência (Gill & Tuteja 2010).

Catalase (CAT) EC 1.11.1.6

As catalases são enzimas tetraméricas que possuem um grupo heme prostético que realiza a dismutação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em H_2O e O_2 através da seguinte reação:



A massa molecular de um monômero de catalase é de aproximadamente 55 kDa. Entre os atributos desta enzima, estão sua baixa afinidade por H_2O_2 e sensibilidade do inibidor 3-amino-1,2,4-triazol. A sua baixa afinidade por peróxido de hidrogênio significa que a atividade da catalase aumenta linearmente em relação a um aumento da concentração de H_2O_2 , mesmo em valores considerados supra-fisiológicos (Mhamdi *et al.* 2012).

H_2O_2 pode ser produzido através da dismutação do superóxido catalisado por SODs ou por meio de algumas oxidases, como a glicolato oxidase e acil-CoA oxidase do metabolismo oxidativo de lipídios. Nos peroxissomos, o ciclo

fotorrespiratório C₂ faz com que o glicolato seja oxidado a glioxilato através da glicolato oxidase, que utiliza o O₂ como aceptor de elétrons para produzir H₂O₂ (Corpas *et al.* 2001).

Como o peróxido de hidrogênio é uma molécula que também atua na sinalização celular, regulações da expressão de catalase por diferentes maneiras podem ser importantes para induzir ou manter a disponibilidade de H₂O₂ necessária para algumas respostas ambientais ou processos de desenvolvimento. Alguns estudos demonstram que durante a senescência foliar, um processo que envolve sinalização oxidativa em algumas etapas, ocorrem modificações na expressão da catalase (Navabpour *et al.* 2003; Zimmermann *et al.* 2006). A repressão da expressão de catalase também é importante durante a resposta a patógenos, uma vez que o reconhecimento por parte da planta de certos organismos invasores envolve o aumento de EROs como o peróxido de hidrogênio (Rojas *et al.* 2012).

Ascorbato peroxidase (APX) EC 1.11.1.11

A ascorbato peroxidase é uma heme-peroxidase encontrada amplamente no reino vegetal. O principal sistema detoxificante do peróxido de hidrogênio nos cloroplastos é o ciclo do ascorbato-glutationa, no qual a APX é um enzima-chave. A APX utiliza ascorbato como doador de elétrons para reduzir H₂O₂ a água segundo a reação:



As diferentes formas de peroxidases são classificadas de acordo com a sua localização subcelular. Isoformas solúveis são encontradas no citosol (cAPX), mitocôndria (mitAPX) e estroma do cloroplasto (cAPX), enquanto isoformas que são ancoradas em membranas são encontradas em microcorpos como os peroxissomos e glioxissomos (mAPX) e tilacóides dos cloroplastos (tAPX) (Caverzan *et al.* 2012).

Em resposta a estresse ambientais, como seca, salinidade, extremos de temperatura e ataque por patógenos, a expressão de genes APX, bem como a atividade da enzima pode ser aumentada (Yoshimura *et al.* 2000; Shigeoka *et al.* 2002; Caverzan *et al.* 2012). Estudos em plantas transgênicas de tomate e

tabaco que superexpressam ascorbato peroxidase verificaram que o aumento da atividade desta enzima correspondeu a uma maior tolerância a estresses abióticos (Yan *et al.* 2003; Wang *et al.* 2005; Wang *et al.* 2006).

Fenilalanina amônia liase (PAL) (EC 4.3.1.5)

A fenilalanina amônia liase catalisa a desaminação não-oxidativa da L-fenilalanina para formar ácido transcinâmico e um íon amônio livre. A conversão do aminoácido fenilalanina em ácido transcinâmico é o passo de entrada para a canalização de carbono do metabolismo primário para o metabolismo secundário dos fenilpropanoides nas plantas (Koukol & Comm 1961).

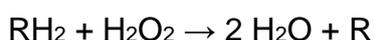
Normalmente, a PAL é encontrada como uma proteína homo-tetramérica e hidrofóbica, com pH ótimo de ação variando entre 8,2 e 9,0 (Hyun *et al.* 2011).

A importância desta enzima no metabolismo vegetal é demonstrada pela grande diversidade e quantidade de produtos fenilpropanoides encontrados nas plantas. Esses compostos estão envolvidos em funções essenciais como suporte mecânico na forma de ligninas, proteção contra estresses abióticos e bióticos na forma de antioxidantes, pigmentação na forma de antocianinas e sinalização dos fatores de nodulação (Camm & Towers 1973, MacDonald & D’Cunha 2007).

Uma alta atividade da PAL está relacionada com um aumento na síntese de compostos antioxidantes, que podem prover maior capacidade de tolerância a estresses abióticos, como a seca, devido à sua propriedade em combater os efeitos deletérios do estresse oxidativo. Uma relação positiva entre os efeitos da seca e maior atividade da PAL foi encontrada em folhas de milho (Hura *et al.* 2008) e frutos de pimenta (Phimchan *et al.* 2014), porém ocorreu uma relação negativa para folhas de chá preto (Jeyaramraja *et al.* 2003). Casos assim reforçam o fato de que as reações das plantas ao estresse hídrico diferem significativamente em vários níveis a depender da intensidade e duração do estresse, bem como a espécie vegetal e seu estágio de desenvolvimento (Chaves *et al.* 2003).

Peroxidase não-específica (POX) (EC 1.11.1.7)

A ação da peroxidase não-específica é definida pela seguinte reação:



A POX é composta por uma cadeia simples de peptídeos, contem um grupo heme (protoporfirina IX) e, nas plantas, 25% de seu peso são carboidratos que a protegem de ações proteolíticas e auxiliam na estabilização da conformação da proteína (Siegel 1993).

As peroxidases são enzimas onipresentes e diferentes isoformas são expressas durante todo o ciclo de vida da planta, desde a germinação à senescência. Elas estão relacionadas a processos como a oxidação da auxina, metabolismo da lignina e são capazes de induzir o afrouxamento da parede celular e crescimento por alongamento através de ações metabólicas associadas ao balanço entre a ação de EROs e as concentrações de H₂O₂ e ascorbato. Estres compostos podem regular a atividade da enzima bem como a expressão gênica da POX. As funções específicas de cada uma das isoformas de peroxidase ainda estão sob estudo e sabe-se que sofrem diversas modificações a depender de condições como temperatura, pH e disponibilidade de substratos (Passardi *et al.* 2004).

A expressão das peroxidases é considerada um indicativo de estresse, uma vez que são uma das primeiras enzimas a aumentar consideravelmente a sua concentração em situações estressantes (Siegel 1993).

A influência da luz e do fitocromo sobre o estresse oxidativo

Por serem os únicos pigmentos proteicos dotados de fotorreversibilidade entre as faixas do vermelho e vermelho-escuro, podemos associar respostas fisiológicas, como a atividade de uma determinada enzima, ao controle pelos fitocromos se as mesmas apresentarem este padrão. Ou seja, uma indução enzimática pelo fitocromo descreve qualquer aumento na quantidade de enzimas em uma célula que pode ser ativada por pulsos de luz vermelha (efeito que é revertido por luz vermelho-distante) ou por iluminação contínua em luz vermelho-distante. Já uma repressão enzimática pelo fitocromo ocorre quando tratamentos com luz nesta faixa do espectro reprime um aumento na concentração de enzimas que ocorre em condições sem luminosidade (Schopfer 1977). Através deste princípio, foi possível associar diversos eventos fisiológicos como sendo controlados pelo fitocromo (Schopfer 1977; Casal *et al.* 1998), dentre eles a

expressão e atividade de certas enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em plantas, como a ascorbato peroxidase, catalase e superóxido dismutase.

Em cotilédones de plântulas jovens de mostarda (*Sinapis alba* L.), Thomsen *et al.* (1992) encontrou uma relação positiva na participação do fitocromo na regulação dos níveis de ascorbato peroxidase (APX) em experimentos aplicando luz vermelha e vermelho-distante. Neste caso, a percepção da luz em níveis potencialmente prejudiciais é feita pelo fitocromo e o consequente aumento nos níveis de APX pode ser considerado uma resposta normal da fotomorfogênese. Porém, o dano às estruturas celulares por meio do excesso de energia da luz, é percebido pela célula através do surgimento de EROs, que passarão a funcionar como um sinalizador secundário no vegetal, contribuindo para um maior aumento na concentração de enzimas antioxidantes como a APX. Sendo assim, em mostarda, existe uma estratégia em duas etapas: uma antecipação ao fotodano em potencial, sinalizado pelos fitocromos, e a resposta efetiva aos danos, sinalizado pelas EROs.

Em *Arabidopsis*, Mullineaux *et al.* (2000) descreve que a expressão dos genes *APX1* e *APX3*, isoformas não-plastidiais de APX, é maior nos tecidos verdes e os níveis de transcritos aumentam bruscamente durante o estágio de desestiolamento das plântulas. A expressão de *APX1* e *APX3* é induzida por um pulso de 5 minutos de luz vermelha e, embora não seja revertida por iluminação por luz vermelho-distante, isto indica que é uma resposta do fitocromo a baixas fluências, ou seja, após alcançar determinado limiar de luminosidade, a resposta desencadeada não está sujeita à fotorreversibilidade.

Os níveis de catalase também estão relacionados com o fitocromo. Em estudo realizado por Drumm & Schopfer (1974), foi demonstrado em plântulas de mostarda que a concentração de CAT é maior quando a planta é exposta a luz vermelho-distante contínua (uma resposta de baixa fluência) ou a pulsos curtos de luz vermelha, efeito que é revertido por pulsos de luz vermelho-distante, característico de respostas fisiológicas mediadas por fitocromo.

A catalase é codificada por uma pequena família de três genes *CAT* em *Arabidopsis*. A presença dos transcritos de *CAT2* e *CAT3* é regulada por meio de um ritmo circadiano, ciclos endógenos de determinada resposta fisiológica de

duração aproximada de 24h que ocorrem independentemente das condições ambientais. Estudos feitos por Zhong *et al.* (1994; 1997) indicaram que o fitocromo tem papel essencial nesse processo, uma vez que em mutantes deficientes em fitocromos funcionais, a amplitude da concentração de catalase durante as oscilações circadianas foi significativamente menor do que na espécie selvagem, indicando regulação positiva desta enzima na presença do fitocromo.

Os efeitos da luz branca sobre a abundância de transcritos de mRNA de superóxido dismutase em folhas verdes e plântulas estioladas revelam que a isoforma FeSOD é a mais afetada pelo estímulo luminoso. Em um estudo feito por Tsang *et al.* (1991) com o objetivo de determinar se este efeito da luz branca sobre a concentração de FeSOD mRNA era mediado por fitocromo, plantas de *Nicotiana plumbaginifolia* foram irradiadas com luz vermelha por 15 minutos. A hipótese se baseou sob o conceito de que em uma resposta clássica mediada por fitocromo, as respostas fisiológicas apresentadas apenas sob iluminação por luz vermelha seriam os mesmos do que sob luz branca. Como a concentração do transcrito não se alterou após o tratamento, em contraste com o resultado sob luz branca, os autores descartaram o fitocromo como componente regulador da concentração de FeSOD.

Yamazaki (2010) em um estudo sobre a qualidade da luz sobre a atividade de enzimas antioxidantes, verificou que a atividade enzimática de SOD e APX diminuía significativamente em arroz em condições de escuro ou sob iluminação por luz vermelho-distante por 6 dias. Yang *et al.* (2012) em um estudo de senescência de folhas de crisântemo verificou que a proporção de luz vermelha:vermelho-distante altera a atividade enzimática de SOD e CAT. Embora sejam estudos relacionados à qualidade da luz em regiões de absorção do fitocromo, ainda não podemos afirmar sua relação direta com a atividade de SOD.

O fitocromo também exerce controle sobre a síntese da fenilalanina amônia-liase. Em estudo com células em suspensão de salsinha, Wellmann & Schopfer (1975) encontraram um aumento de quatro vezes da atividade da PAL após a irradiação com luz vermelha em comparação com os níveis no escuro. Além disso, esses mesmos autores concluem que o fitocromo atua aumentando a taxa de síntese

de novo da PAL. A indução desta enzima pela luz e fitocromo também foi encontrada em cotilédones de mostarda por Mohr *et al.* (1979) e registrada em revisão por Jones (1984).

Em síntese, existem evidências de que a luz, por meio do fitocromo, esteja envolvida com a regulação da atividade de enzimas antioxidantes como a catalase, superóxido dismutase e fenilalanina amônia liase, embora maiores detalhes das rotas bioquímicas sejam necessários para elucidar sua influência a nível molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo dos microtomateiros e aplicação do déficit hídrico

O experimento foi realizado no Instituto Federal Goiano (IFGoiano) – Câmpus Rio Verde em casa de vegetação climatizada sob condições controladas de temperatura (24-27°C) e umidade (60-80%). As sementes de microtomateiros (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) do tipo selvagem (MT), utilizado como genótipo para controle experimental, e seus fitocromo-mutantes *aurea* (*au*) e *high-pigment 1* (*hp1*) foram gentilmente cedidas pelo profº Dr. Rogério Falleiros Carvalho (Universidade Estadual Paulista – Campus Jaboticabal).

Os microtomateiros foram semeados em bandejas de germinação contendo uma mistura de substrato comercial (Bioplant®, Nova Ponte-MG, Brasil) e vermiculita em proporção de 2:1 e regados diariamente ao final da tarde. Após a emergência da primeira folha não-cotiledonar, as mudas que apresentavam similaridade em porte e vigor foram transplantadas para vasos de 1L contendo substrato composto por solo latossolo distroférico e areia em proporção de 2:1, com pH e concentração de nutrientes corrigidos quimicamente para condições ideais da cultura do tomate.

Ao alcançarem 35 dias de idade após a semeadura, a irrigação foi suspensa em um grupo de 5 plantas de cada genótipo (MT, *au* e *hp1*), considerado doravante como grupo estresse, enquanto um outro grupo com a mesma quantidade de plantas foi mantido sob disponibilidade normal de água (próximo à capacidade de campo do substrato), considerado doravante como grupo controle. O tratamento sob déficit hídrico contínua durou 5 dias e as plantas foram reidratadas logo após a análise de fluorescência e coleta de material vegetal para análise de conteúdo de pigmentos, malondialdeído e atividade enzimática (conforme descritos a seguir).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância e separados em classes distintas utilizando-se o teste de Tukey a um nível de erro de 5%.

Avaliação do potencial hídrico

O potencial hídrico dos microtomateiros foi avaliado no período da antemanhã (entre 04h00min e 06h00min) do último dia do tratamento sob deficiência hídrica. Para a avaliação, a quarta folha do ápice para a base foi retirada de 4 plantas de cada genótipo e tratamento e submetida à pressão em uma bomba de Scholander.

Segundo Scholander *et al.* (1965), a coluna de água no xilema das folhas se encontra sob tensão e após o corte, esta se retrai para dentro dos capilares do pecíolo. Para se realizar a medição do potencial hídrico, a folha foi inserida em uma câmara e pressurizada com gás comprimido até que se verificou a exsudação da seiva pela superfície do corte no pecíolo. A pressão necessária para que ocorresse a exsudação, registrada em um manômetro (em Bar e convertido para MPa), correspondeu ao potencial hídrico do órgão no momento da análise.

Medição das trocas gasosas

Os dados relativos às trocas gasosas foram coletados diariamente durante os cinco dias de tratamento sob deficiência hídrica e um dia após a reidratação das plantas, com exceção do segundo dia devido a condições climáticas não propícias para análise. As avaliações ocorreram no período da manhã (entre 08h00min e 11h00min), na segunda folha completamente expandida do ápice para a base em 5 plantas de cada genótipo e tratamento, utilizando um analisador de gases infra-vermelho modelo LI-COR 6400XTR (Licor®, Nebraska, EUA) com temperatura do bloco de 24 °C e densidade de fluxo de fótons igual a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As variáveis analisadas foram as taxas de fotossíntese (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), de transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Avaliação da fluorescência da clorofila

A fluorescência da clorofila foi avaliada diariamente durante os cinco dias de tratamento sob deficiência hídrica e um dia após a reidratação das plantas. As avaliações ocorreram no período da manhã, na terceira folha completamente expandida do ápice para a base das mesmas 5 plantas de cada genótipo e tratamento selecionadas para análise de trocas gasosas, utilizando um fluorômetro portátil modulado, modelo MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany), equipado com uma pinça especial para suporte da folha modelo 2030-B. As análises foram feitas segundo a metodologia proposta por Bilger *et al.* (1995) e Rascher *et al.* (2000).

Inicialmente as folhas foram aclimatadas ao escuro por 30 minutos e após este período, os tecidos foliares foram expostos a um pulso de luz ($0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para determinação da fluorescência inicial (F_0). Seguiu-se a aplicação de um pulso de 0,8s de luz actínica saturante ($>6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para determinação da fluorescência máxima (F_m). Com estes dados, estimou-se o rendimento quântico potencial do fotossistema II, utilizando a equação $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$.

O rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Genty *et al.* 1989) foi determinado por meio da sobreposição de um pulso de saturação em folhas previamente adaptadas à luz ambiente, sendo calculado como $F_q'/F_m' = (F_m' - F)/F_m'$, onde F é o rendimento da fluorescência máxima durante o pulso de saturação. A razão F_q'/F_m' é utilizada para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), de acordo com Bilger *et al.* (1995), mediante o uso da equação $\text{ETR} = F_q'/F_m' \times \text{DFF} \times 0,5 \times 0,84$, onde DFF é a densidade de fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha; 0,5 é o valor correspondente à fração da energia de excitação distribuída para o FSII (Laisk & Loreto 1996); e 0,84 é o valor correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (Ehleringer 1981). O coeficiente de extinção não-fotoquímica de Stern-Volmer foi calculado como $\text{NPQ} = (F_m - F_m')/F_m'$ (Bilger & Björkman 1990).

Conteúdo de pigmentos cloroplastídicos

A concentração de pigmentos cloroplastídicos foi determinada por meio da extração com dimetilsulfóxido (DMSO) mediante ajustes da metodologia descrita por Kuki *et al.* (2005).

Após as análises de fluorescência no quinto dia sob deficiência hídrica, foram coletados, de 4 plantas de cada genótipo e tratamento, três discos foliares utilizando um furador de metal de 5 mm de diâmetro, evitando-se a nervura central. As coletas foram feitas na mesma folha utilizada para as análises de fluorescência. Os discos foram incubados em frascos de vidro âmbar protegidos da luz por papel alumínio contendo 5 mL de DMSO saturado com CaCO_3 por um período de 48 horas.

Após este período, as amostras foram levadas ao banho-maria à temperatura de 65 °C por 24 horas. Em seguida, foram realizadas as leituras de absorvância em espectrofotômetro UV-VIS, modelo Evolution 60S (Thermo Fisher Scientific, Madison – USA). As leituras foram feitas em 480, 649 e 665 nm e utilizando as equações descritas por Wellburn (1994) para as determinações do conteúdo de clorofila a, clorofila b e carotenoides, respectivamente.

Quantificação do conteúdo de malondialdeído

O malondialdeído (MDA) é um dos metabólitos resultantes da peroxidação lipídica em função da degradação de ácidos graxos por meio da ação de espécies reativas de oxigênio em tecidos vegetais sob estresse oxidativo. A sua quantificação é feita de forma indireta através da leitura da absorvância de seu complexo formado com o ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme metodologia proposta por Heath & Packer (1968) com algumas modificações.

Amostras foliares totalizando cerca de 200 mg de tecido vegetal foram coletadas individualmente de 4 plantas de cada genótipo e tratamento no último dia de experimento sob deficiência hídrica e armazenadas em envelopes de papel alumínio mantidos em nitrogênio líquido até o momento da análise. O material congelado foi triturado em almofariz de porcelana, homogeneizado em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 1% (m/v), filtrado em camada de gaze e

centrifugado a 15 000 g por 15 minutos a 4°C. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi retirada e adicionada em 1,5 mL do meio de reação composto por TCA 20% + TBA 0,5% (p/v) em tubos protegidos da luz envolvidos por papel alumínio. Os tubos foram incubados em estufa a 95°C por 30 minutos, sendo agitados a cada 5 minutos com auxílio de um vórtex. Após este período, a reação foi paralisada por meio da imersão dos tubos em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas novamente para retirada das bolhas e as absorbâncias foram lidas nos comprimentos de onda de 532 e 600 nm, em que 532 nm representam a máxima absorção do complexo MDA-TBA formado e 600 nm a absorção de turbidez não-específica que deve ser descontada.

A quantidade de malondialdeído foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Heath & Packer, 1968) e segundo a equação:

$$\text{MDA (nmol)} = [(\text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{600}) / 155] \times 2 \times 10^3$$

Os equivalentes-MDA foram obtidos dividindo a concentração em nmol pela massa fresca (MF) em gramas. Assim sendo, a concentração de MDA é expressa em nmol g⁻¹ MF.

Atividade de enzimas do metabolismo antioxidativo

A atividade das enzimas catalase (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.1), superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidase não-específica (POX, EC 1.11.1.7) e fenilalanina amônia-liase (PAL, EC 4.3.1.5) foram determinadas.

Amostras foliares totalizando cerca de 300 mg de tecido vegetal foram coletadas de 4 plantas de cada genótipo e tratamento no último dia de experimento sob deficiência hídrica e armazenadas em envelopes de papel alumínio mantidos em nitrogênio líquido até o momento da análise. O material vegetal foi triturado com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana até a obtenção de um pó fino e posteriormente homogeneizado em 2 mL do meio de extração composto por tampão fosfato de potássio pH 6,8 a 0,1 M, EDTA 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico 100 mM e polivinilpirrolidona 2% (m/v). O extrato resultante foi filtrado em camada de gaze e centrifugada a 15000 g por 15 minutos a 4°C.

Alíquotas do sobrenadante foram reservadas para as análises da atividade de cada uma das enzimas. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro Evolution 60 (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

A quantificação de proteínas totais nos extratos vegetais foi realizada segundo o método proposto por Bradford (1976), utilizando-se albumina bovina sérica (BSA) como padrão.

A atividade da catalase foi determinada por meio da sua capacidade em degradar o peróxido de hidrogênio, monitorada pelo decréscimo na absorbância em 240 nm a cada 10 segundos por 1 minuto. O protocolo utilizado foi modificado a partir dos métodos propostos por Havir & McHale (1987) e Azevedo *et al.* (1998). A reação foi iniciada pela adição de 25 μL do extrato vegetal ao meio de reação composto por 500 μL de tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM, 350 μL de água deionizada e 125 μL de peróxido de hidrogênio 125 mM. Os cálculos foram feitos considerando o coeficiente de extinção molar como $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os dados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

O ensaio para a ascorbato peroxidase foi feito através do monitoramento do decréscimo da absorbância na faixa de 290 nm, à medida que a enzima catalisava a oxidação do ascorbato. O protocolo para APX foi modificado a partir dos métodos utilizados por Nakano & Asada (1981). A reação foi iniciada com a adição de 50 μL da amostra do extrato vegetal ao meio de reação composto por 500 μL de tampão fosfato de potássio pH 6,0 100 mM, 280 μL de água deionizada, 160 μL de ascorbato 5 mM e 10 μL de peróxido de hidrogênio 125 mM. As leituras de absorbância foram realizadas a cada 10 segundos durante 1 minuto. A atividade da APX foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano & Asada 1981) e expressa em μmol de ascorbato $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

O azul de nitrotetrazólio (NBT) é utilizado como acceptor de superóxidos gerados de forma enzimática ou fotoquímica. O princípio do ensaio da atividade da superóxido dismutase é baseado na sua capacidade de inibir a redução do NBT. O protocolo utilizado foi modificado a partir dos métodos propostos por Giannopolitis & Ries (1977). Em um tubo, 50 μL do extrato vegetal foi adicionado ao meio de reação contendo 1000 μL de tampão fosfato de potássio pH 7,8 100

mM, 333 μL de metionina 78 mM, 200 μL de NBT 0,75 mM, 200 μL de EDTA 1 mM, 150 μL de água deionizada e 67 μL de riboflavina 0,06 mM. A reação se inicia expondo os tubos à luz fluorescente em uma câmara por 10 minutos e é paralisada ao desligar a luz. A avaliação da quantidade de NBT fotorreduzido é feito pela leitura em espectrofotômetro na faixa de 560 nm. A atividade da SOD é expressa em U SOD $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, em que 1 U SOD representa a quantidade de enzima capaz de inibir 50% da fotorredução do NBT.

A atividade da POX foi determinada através da formação de purpurogalina por meio da oxidação do pirogalol catalisada pela peroxidase, que reduz o peróxido de hidrogênio à água. A purpurogalina tem o pico de absorção em 420 nm, sendo portanto a faixa de leitura utilizada na análise. O protocolo utilizado foi baseado nas metodologias propostas por Chance & Maehley (1955) e Kar & Mishra (1976) com algumas modificações. A reação se iniciou adicionando 15 μL do extrato vegetal a um meio composto por 885 μL de água deionizada, 520 μL de tampão fosfato de potássio pH 6,8 100 mM, 330 μL de peróxido de hidrogênio 125 mM e 250 μL de pirogalol 100 mM. As leituras de absorbância foram realizadas a cada 10 segundos durante 1 minuto. A atividade da POX foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance & Maehley 1955) e expressa em μmol de purpurogalina $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da PAL é avaliada por meio de sua capacidade de desaminação da fenilalanina em ácido transcinâmico, verificada pelo aumento na absorbância na faixa de 290 nm. Em um microtubo, 100 μL do extrato foram adicionados a 900 μL do meio de reação composto por tampão borato pH 8,8 40 mM e fenilalanina 20 mM, sendo posteriormente incubados em banho-maria a 30°C por 1 hora. Um segundo conjunto de microtubos contendo amostra e meio de reação não incubado foi utilizado como branco. A reação foi paralisada pela adição de 50 μL de ácido clorídrico 6N e os microtubos foram centrifugados a $9000 g$ por 10 minutos a 25°C . A atividade da PAL foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o ácido transcinâmico (Zucker 1965) e expressa em μmol de ácido transcinâmico $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

RESULTADOS

Potencial hídrico

O tratamento de deficiência hídrica diminuiu o potencial hídrico das folhas de todos os genótipos de microtomateiros em relação ao grupo controle (Figura 2). Este resultado valida as comparações entre os grupos controle e estresse estabelecidos no presente trabalho, indicando um efeito real na planta da restrição hídrica do solo.

Entre os genótipos não foi registrada diferença em relação ao potencial hídrico, tanto para o grupo controle quanto para o grupo estresse, indicando que as mutações não influenciaram este parâmetro.

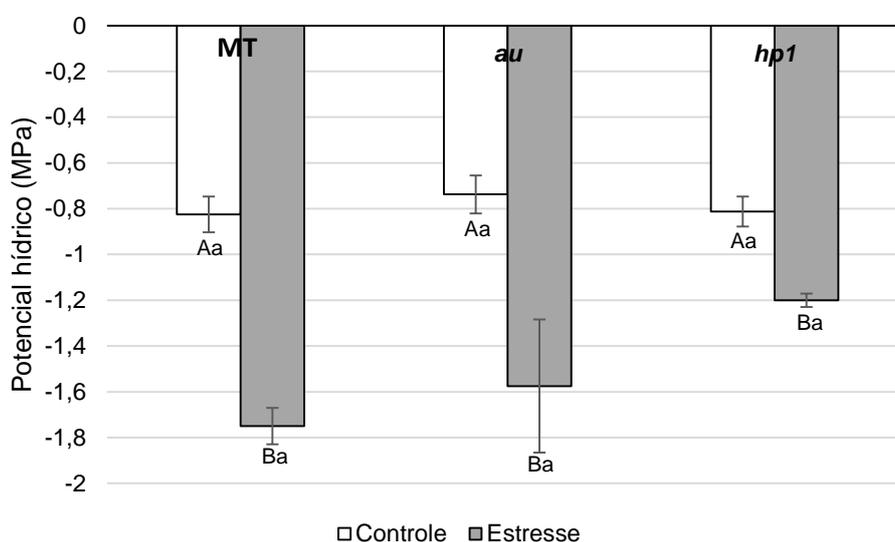


Figura 2 – Potencial hídrico (MPa) das folhas dos genótipos selvagem (MT), *aurea* (au) e *high-pigment 1* (hp1) de microtomateiros em condições de disponibilidade normal de água (controle) e sob deficiência hídrica por 5 dias (estresse). n=4. As barras indicam média seguida de erro padrão. Letras diferentes indicam diferença pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre controle e estresse do mesmo genótipo. Letras minúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de um mesmo tratamento.

Trocas gasosas

A deficiência hídrica acarretou diminuição nas taxas de fotossíntese (Figura 3a) e condutância estomática (Figura 3b) em todos os genótipos a partir do 4º dia de experimento, com exceção do mutante *aurea*, cujas diferenças em relação a estes parâmetros ocorreram somente no 5º dia. As taxas de transpiração (Figura 3c) também apresentaram o mesmo padrão, com quedas acentuadas a partir do 4º dia para todos os genótipos analisados.

Entre os genótipos não houve diferença em relação aos parâmetros de trocas gasosas, tanto para o grupo controle quanto para o grupo estresse. A única ressalva foi para o mutante *hp1*, que, sob efeito da deficiência hídrica, apresentou taxas de transpiração maiores que o genótipo controle no 4º dia, coincidentes com os maiores valores para a condutância estomática no mesmo período.

Com a reidratação ao final do quinto dia de experimento, houve um aumento nas taxas dos parâmetros de trocas gasosas do grupo estresse, embora ainda abaixo do grupo controle. Observações posteriores ao experimento, em dados não apresentados, mostraram que as plantas se recuperaram o seu porte e vigor normais 48 horas após o restabelecimento das condições hídricas normais.

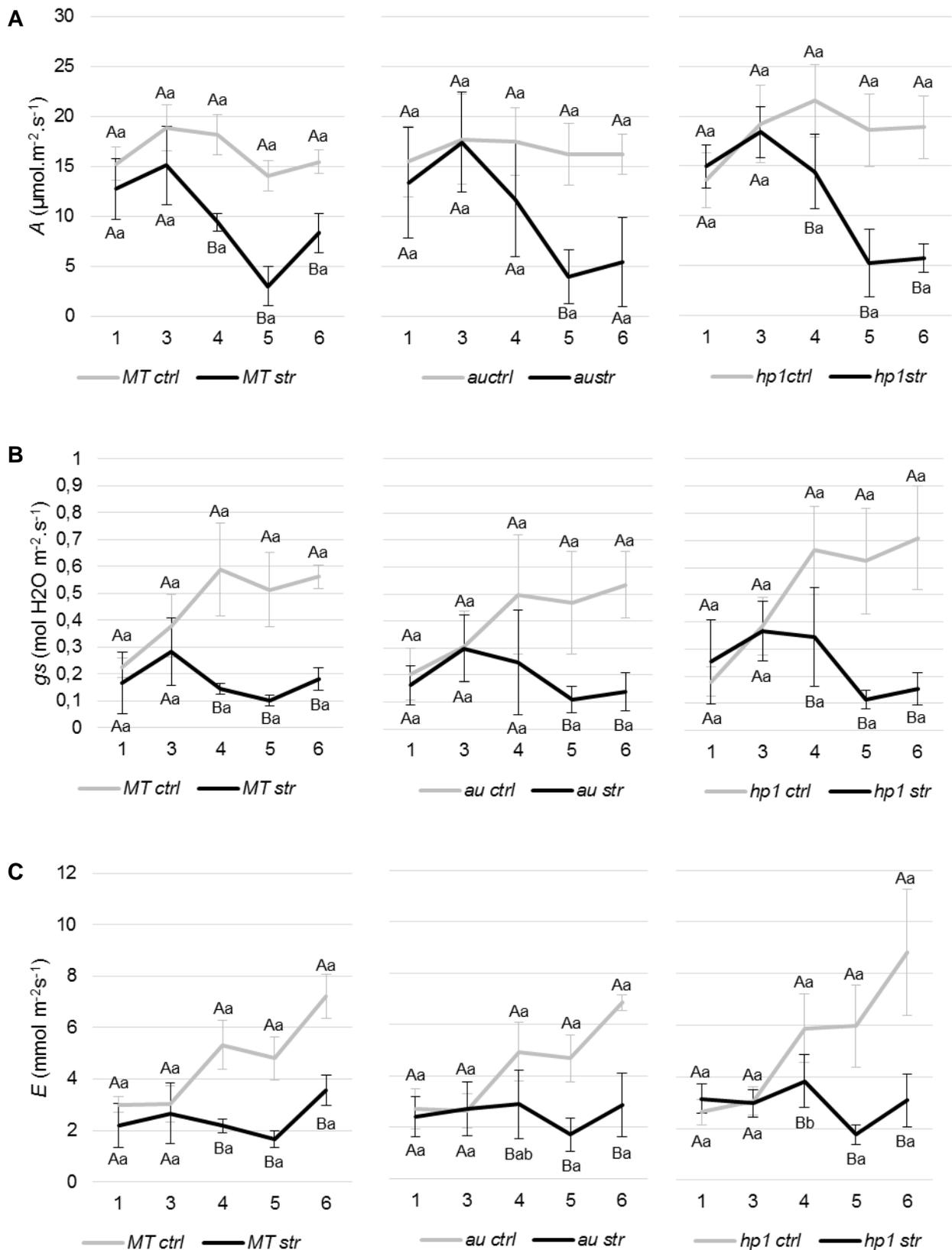


Figura 3 – Taxas de fotossíntese (A , em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A), condutância estomática (g_s , em $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (B) e transpiração (E , em $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (C) das folhas dos genótipos selvagem (MT), *aurea* (*au*) e *high-pigment 1* (*hp1*) de

microtomateiros em condições de disponibilidade normal de água (ctrl) e sob deficiência hídrica por 5 dias (str) ao longo dos dias de experimento (1-6). n=5. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam diferença pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre controle e estresse do mesmo genótipo no mesmo dia de experimento. Letras minúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de um mesmo grupo e dia de experimento.

Avaliação da fluorescência da clorofila

Durante todo o período experimental em condições normais de disponibilidade hídrica, verificou-se que o mutante *aurea* apresenta menor fluorescência inicial (F_0) em relação aos outros genótipos (Figura 4a).

O efeito da deficiência hídrica foi diferente para os genótipos ao longo do experimento. Enquanto a fluorescência inicial (F_0) (Figura 4a) e a razão F_v/F_m (Figura 4b) não foram afetadas sob déficit hídrico em nenhum dos genótipos, o genótipo selvagem MT respondeu com uma queda significativa na rendimento quântico efetivo do fotossistema II (F_q'/F_m') (Figura 4c) e na taxa de transporte de elétrons (ETR) (Figura 5a). Em relação ao *quenching* não-fotoquímico (NPQ), o genótipo selvagem foi o primeiro a aumentar a dissipação de energia desta forma diferindo dos demais logo no terceiro dia de experimento (Figura 5b). Os microtomateiros mutantes mantiveram, portanto, a cadeia transportadora de elétrons em funcionamento adequado durante o período de déficit hídrico e o rendimento quântico efetivo do fotossistema II foi comparável ao grupo controle.

A reidratação das plantas do grupo estresse no último dia de experimento reestabeleceu os parâmetros de fluorescência aos mesmos valores encontrados no grupo controle.

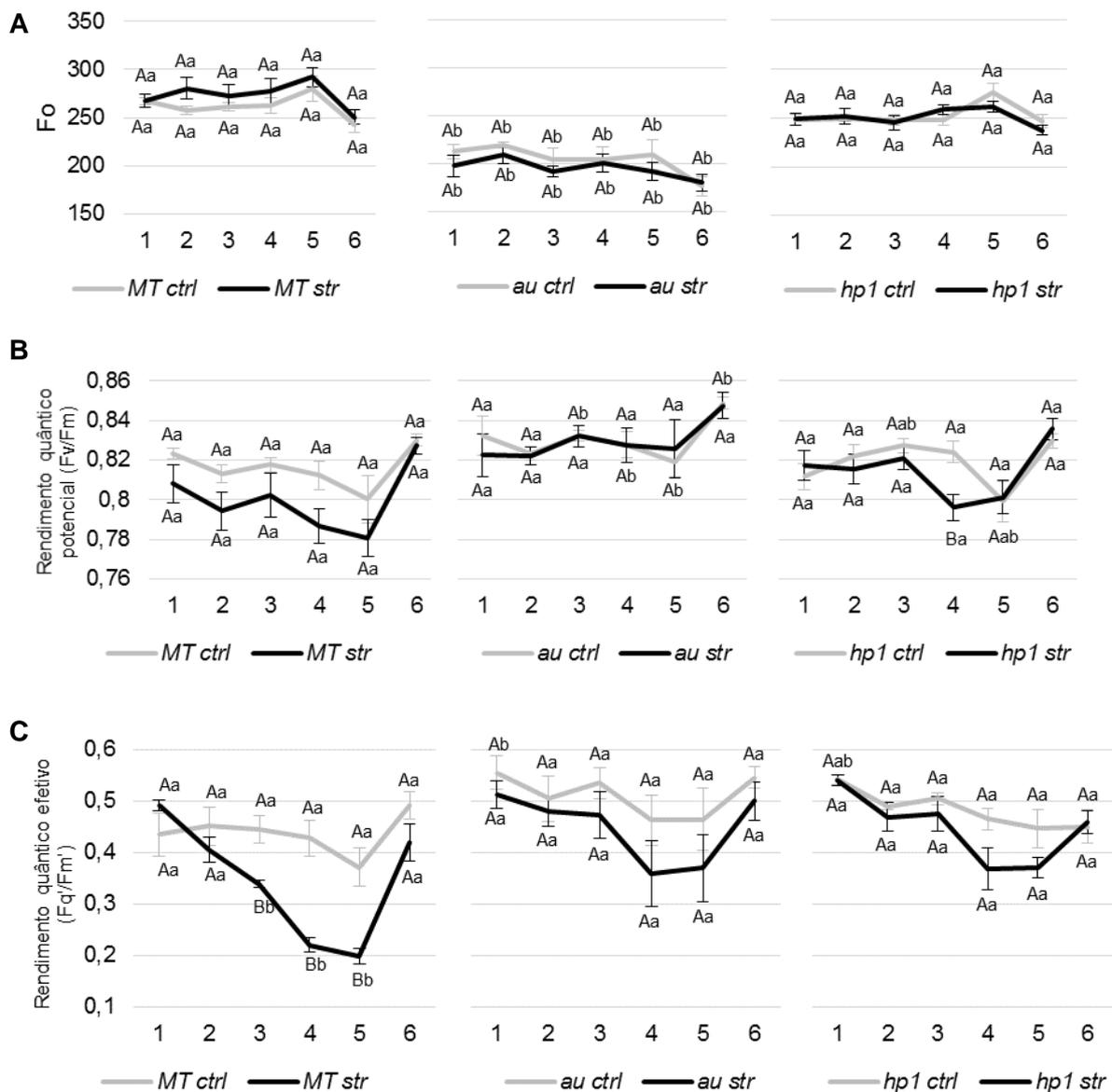


Figura 4 – Fluorescência inicial (F_o) (A), rendimento quântico potencial (F_v/F_m) (B) e rendimento quântico efetivo (F_q'/F_m') (C) dos genótipos selvagem (MT), *aurea* (*au*) e *high-pigment 1* (*hp1*) de microtomateiros em condições de disponibilidade normal de água (*ctrl*) e sob deficiência hídrica por 5 dias (*str*) ao longo dos dias de experimento (1-6). $n=5$. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam diferença pelo teste de Tukey ($P<0,05$), quando acima da barra, fazem referência ao grupo controle e quando abaixo, fazem referência ao grupo estresse. Letras maiúsculas indicam comparação entre controle e estresse do mesmo genótipo no mesmo dia de experimento. Letras minúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de um mesmo grupo e dia de experimento.

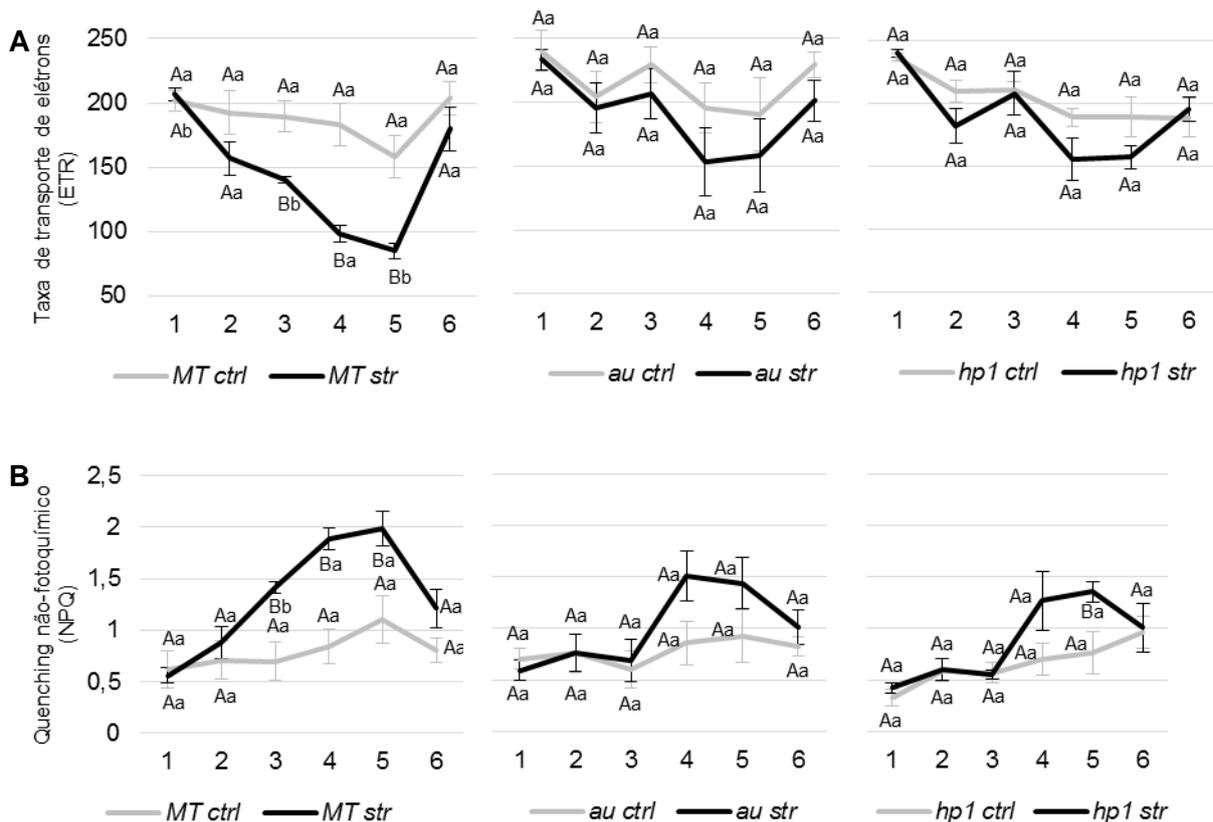


Figura 5 – Taxa de transporte de elétrons (ETR) (A) e *quenching* não-fotoquímico (NPQ) (B) dos genótipos selvagem (MT), *aurea* (*au*) e *high-pigment 1* (*hp1*) de microtomateiros em condições de disponibilidade normal de água (*ctrl*) e sob deficiência hídrica por 5 dias (*str*) ao longo dos dias de experimento (1-6). n=5. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam diferença pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), quando acima da barra, fazem referência ao grupo controle e quando abaixo, fazem referência ao grupo estresse. Letras maiúsculas indicam comparação entre controle e estresse do mesmo genótipo no mesmo dia de experimento. Letras minúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de um mesmo grupo e dia de experimento.

Pigmentos cloroplastídicos

O mutante *hp1* deteve a maior concentração de clorofila a, clorofila b e carotenoides em relação aos outros genótipos. Embora tenha apresentado os menores valores de clorofila a e b, a proporção de clorofila a:b foi maior para o mutante *aurea* (Figura 6).

A aplicação do tratamento de deficiência hídrica não alterou os conteúdos de clorofilas e carotenoides em nenhum dos genótipos analisados.

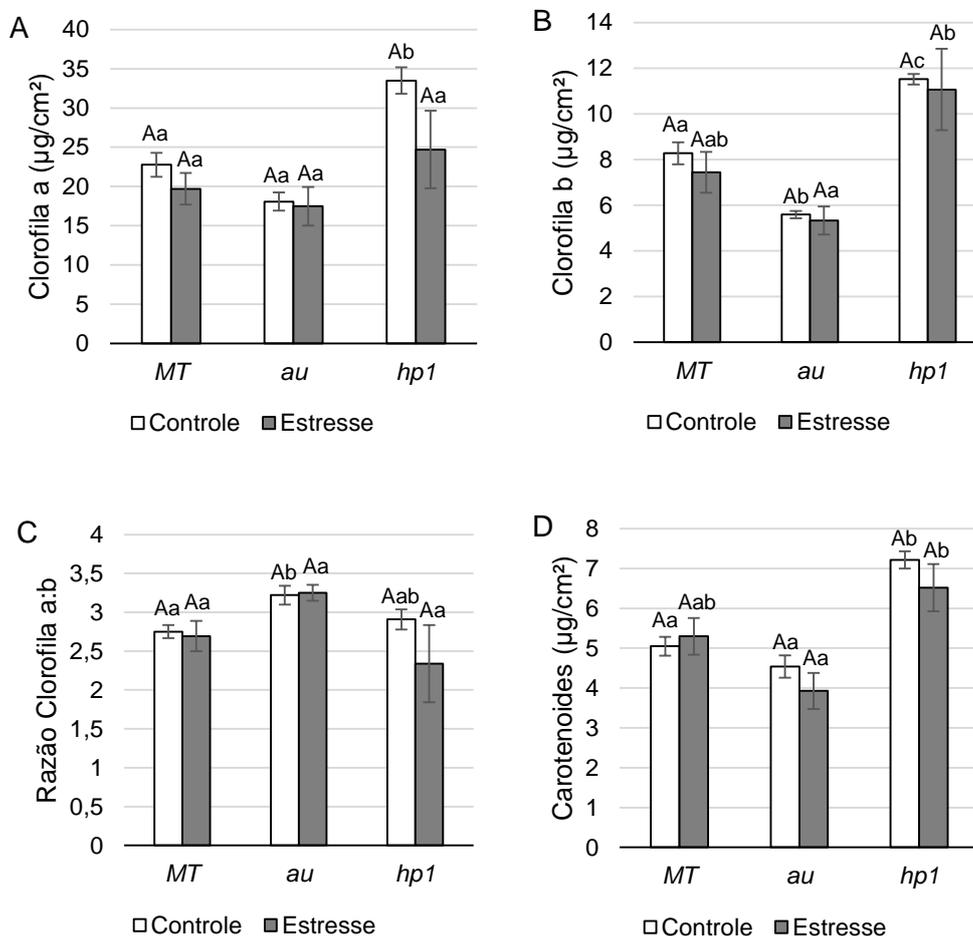


Figura 6 – Conteúdo de pigmentos cloroplastídicos clorofila a (A), clorofila B (B), razão clorofila a: clorofila b (C) e carotenoides (D) dos genótipos selvagem (MT), *aurea* (au) e *high-pigment 1* (hp1) de microtomateiros em condições de disponibilidade normal de água (ctrl) e sob deficiência hídrica por 5 dias (str) ao longo dos dias de experimento (1-6). n=4. As barras indicam média seguida de erro padrão. Letras diferentes indicam diferença pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre controle e estresse do mesmo genótipo. Letras minúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de um mesmo grupo.

Conteúdo de malondialdeído e atividade enzimática

O tratamento de estresse hídrico não afetou os genótipos em relação ao conteúdo de malondialdeído nos tecidos foliares, com exceção de uma menor quantidade registrada para o mutante *hp1* nestas condições. Em condições normais de disponibilidade hídrica, o mutante *aurea* deteve menor quantidade de MDA em comparação aos outros genótipos, enquanto em condições de estresse hídrico, o genótipo selvagem MT apresentou a maior quantidade de malondialdeído (Figura 7a).

Em condições normais de disponibilidade hídrica, os genótipos apresentaram atividade enzimática semelhante para CAT, APX e SOD, enquanto o genótipo selvagem deteve maior atividade para PAL e POX em relação aos mutantes (Figura 7b-e).

Em condições de estresse hídrico, o mutante *aurea* apresentou maior atividade de CAT e APX em relação aos demais genótipos, enquanto as atividades de SOD, PAL e POX foram semelhantes entre eles sob esse tratamento. O mutante *hp1* manteve a atividade das enzimas analisadas em taxas semelhantes às registradas em situação controle (Figura 7b-e).

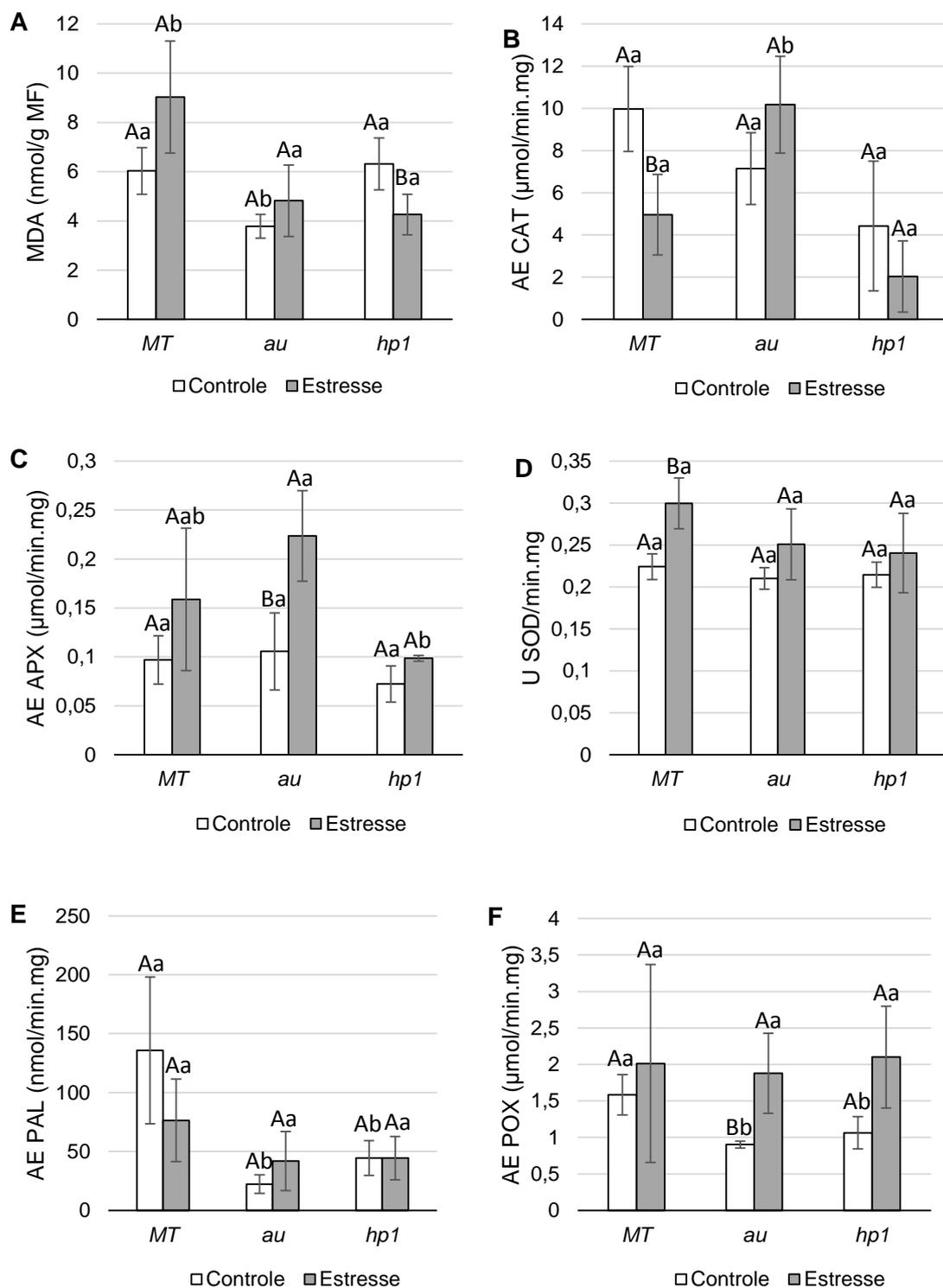


Figura 7 - Conteúdo de malondialdeído (MDA) (A) e atividade enzimática da catalase (CAT) (B), ascorbato peroxidase (APX) (C), superóxido dismutase (SOD) (D), fenilalanina amônia liase (PAL) (E) e peroxidase não-específica (POX) (F) dos genótipos selvagem (MT), *aurea* (au) e *high-pigment 1* (hp1) de microtomateiros em condições de disponibilidade normal de água (controle) e

sob deficiência hídrica por 5 dias (estresse). n=4. As barras indicam média seguida de desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre controle e estresse do mesmo genótipo. Letras minúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de uma mesma condição de disponibilidade de água (controle ou estresse).

DISCUSSÃO

A diminuição do potencial hídrico, associada às reduções nas taxas de trocas gasosas e também às alterações em alguns parâmetros da fluorescência em microtomateiros submetidos à condição de déficit hídrico, observados neste trabalho, evidenciam que este tratamento foi efetivo no desencadeamento de uma condição estressante. Alterações destes parâmetros têm sido utilizadas para estudos de diferentes espécies submetidas a condições indutoras de estresses semelhantes (Miyashita *et al.* 2005; Rahbarian *et al.* 2011; Benesová *et al.* 2012) inclusive mutantes fotomorfológicos (Biehler *et al.* 1997; Boggs *et al.* 2010; Carvalho *et al.* 2011a; Liu *et al.* 2012).

Em condições de déficit hídrico, os microtomateiros reagiram com diminuição das taxas de condutância estomática e transpiração a partir do quarto dia de tratamento (Figuras 3b e 3c). Espera-se que, como consequência dessa resposta, a difusão de CO₂ para as células do mesófilo tenha se tornado restrita, limitando a atividade da RuBisCO e, conseqüentemente, promovendo queda nas taxas de fotossíntese, como observado na Figura 3a. Respostas similares às encontradas neste trabalho quanto à redução nas trocas gasosas em função da deficiência hídrica foram observadas para diferentes espécies (Flexas *et al.* 2002; Lawlor & Tezara 2009; Carvalho *et al.* 2011a; González *et al.* 2012).

Embora as taxas fotossintéticas tenham sido estatisticamente iguais para os três genótipos no grupo controle, sob deficiência hídrica o mutante *aurea* apresentou queda na fotossíntese somente no quinto dia, enquanto os demais genótipos já apresentavam uma diminuição significativa no quarto dia (Figura 3a). Essa resposta fotossintética é particularmente chamativa por *aurea* ser o genótipo que possui baixo conteúdo de clorofilas e carotenoides (Figura 6). A semelhança das taxas de fotossíntese entre o mutante *aurea* e o genótipo selvagem, apesar da sua deficiência de pigmentos fotossintéticos comparativamente aos demais genótipos, está em consonância com os dados observados por Becker *et al.* (1992) e também por Melo *et al.* (2009) quanto à similaridade da fotossíntese potencial entre *aurea* e MT. Nesse sentido, sugere-se que outros fatores possam sobrepujar a deficiência de pigmentos fotossintéticos do mutante *aurea* quanto à fotossíntese, como uma maior alocação de nitrogênio e proteínas neste mutante em relação aos demais genótipos (López-Juez *et al.* 1990; Melo *et al.*

2009), o que poderia, por sua vez, contribuir com um aumento na concentração de proteínas importantes para a carboxilação ou para outras etapas do processo fotossintético.

Não se observou efeito significativo do maior conteúdo de pigmentos fotossintéticos presentes no mutante *hp1* (Figura 6) sobre as taxas de fotossíntese (Figura 3a), tanto para o grupo controle quanto para o grupo estresse. No entanto, para Melo *et al.* (2009), este maior conteúdo de pigmentos fotossintéticos se refletiu em maior fotossíntese potencial para este mutante em relação aos demais genótipos em condição normal de disponibilidade de água.

Parâmetros da fluorescência da clorofila proveem dados importantes para estimar de uma forma não-invasiva a eficiência quântica e o rendimento do fotossistema II, relacionando-os à assimilação de carbono (Genty *et al.* 1989). Estes parâmetros podem ser utilizados como indicadores para avaliar o desbalanço energético ou metabólico da fotossíntese entre cultivares e genótipos sob deficiência hídrica (Li *et al.* 2006; Rahbarian *et al.* 2011; Mishra *et al.* 2012).

A fluorescência inicial (F_o) é obtida quando os centros de reação do FSII estão “abertos” (quando todos os aceptores primários estão oxidados) e representa a emissão de luz pelas moléculas de clorofila “a” excitadas presentes no fotossistema. O mutante *aurea* deteve menor quantidade de clorofila “a” (Figura 6), embora estatisticamente similares a MT, e também os menores valores de F_o (Figura 4a). No entanto, *hp1*, mesmo possuindo maior concentração de clorofila “a” em relação aos demais genótipos (Figura 6) não sofreu alteração na F_o em relação a cultivar MT (Figura 4a). O déficit hídrico não alterou as concentrações deste pigmento e, por consequência, os valores de fluorescência inicial também não se alteraram nestas condições.

A razão F_v/F_m fornece uma estimativa da eficiência quântica máxima potencial da fotoquímica do FSII (Butler 1978). F_v/F_m tem sido utilizado amplamente para detectar perturbações induzidas por estresses no aparato fotossintético, uma vez que fotodanos aos centros de reações podem diminuir os valores para este parâmetro (Baker & Rosenqvist 2004). A indução da deficiência hídrica não impactou a eficiência fotoquímica do FSII de nenhum dos genótipos de

microtomateiros analisados (Figura 4b). Como os parâmetros F_o e F_v/F_m dependem primariamente do conteúdo de clorofila a, não houve variação em função do déficit hídrico. Outras espécies como batata (Jefferies 1994), café (Lima *et al.* 2002), trigo (Lu & Zhang 1999) e uva (Wang *et al.* 2012) também não apresentaram variação nos valores de F_v/F_m em função da seca. No entanto no quarto e quinto dias de deficiência hídrica a relação F_v/F_m de *aurea* foi superior àquelas observadas na cultivar MT e no mutante *hp1* (Figura 4b).

O microtomateiro selvagem MT respondeu às condições de deficiência hídrica com uma inibição da atividade efetiva do fotossistema II (Figura 4c) e da cadeia transportadora de elétrons (Figura 5a) e aumento da dissipação não-fotoquímica da energia (Figura 5b). A partir desses resultados, é possível inferir que as limitações estomáticas impostas sobre a fotossíntese diminuiu o consumo de ATP e NADPH, resultando na atenuação da taxa de transporte de elétrons e, conseqüentemente, de F_q'/F_m' (Baker & Rosenqvist 2004). A deficiência de CO_2 , além da inibição de RuBisCO, diminuem a taxa de oxidação de NADPH no ciclo de Calvin e conseqüentemente, o aceptor primário dos elétrons durante a fotossíntese, $NADP^+$ não se encontra suficientemente disponível. As condições de estresse hídrico aliadas à contínua exposição à iluminação podem resultar em uma super-redução da cadeia transportadora de elétrons e danos ao aparato fotossintético (Aro *et al.* 1993; Reddy *et al.* 2004; Schöttler & Tóth 2014).

As plantas utilizam vários mecanismos para evitar fotodanos, como a evitação da luz pelo movimento das folhas e cloroplastos, a emissão do excesso de energia como calor, verificado pelo aumento do *quenching* não-fotoquímico (Figura 5b), diminuição da atividade do fotossistema II (Figura 4c) e a utilização de outros aceptores de elétrons além do $NADP^+$ (Takahashi & Badger 2011).

Em relação aos parâmetros F_q'/F_m' , ETR e NPQ, os mutantes *aurea* e *high-pigment 1* não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo de plantas mantidas sob condições normais de disponibilidade hídrica (Figuras 4c e 5a-b), indicando que outros mecanismos para a dissipação da energia estão agindo e de forma eficiente. Biehler *et al.* (1997), em um estudo com tomateiros mutantes em condições de estresse hídrico, indicam que o mutante *aurea* foi capaz de manter a cadeia transportadora de elétrons em funcionamento apesar da queda nas taxas de fotossíntese devido à sua maior capacidade em manter

os aceptores de elétrons livres, com menor potencial para acumular seus equivalentes reduzidos.

A coloração relativamente mais amarelada das folhas do mutante *aurea* faz com que menos radiação luminosa seja absorvida pelos fotossistemas e, sendo proporcionalmente menos excitados, são capazes de manter o funcionamento adequado da cadeia transportadora de elétrons mesmo em condições limitantes de CO₂ em função da deficiência hídrica (Figura 5a) (Biehler *et al.* 1997). Estes autores indicaram ainda que, em comparação às folhas do genótipo selvagem, 35% da radiação incidente sobre as folhas do mutante *aurea* é refletida. Becker *et al.* (1992) afirmam que a menor quantidade de clorofila b (Figura 6b) associada ao FSII diminui a sua capacidade de captar luz, prevenindo a superexcitação dos pigmentos, embora o seu rendimento quântico se mantenha inalterado.

Em estudo com tomateiros submetidos ao estresse por deficiência hídrica, Haupt-Herting & Fock (2000) indicaram que, para evitar danos ao aparato fotossintético, as plantas responderam com um aumento substancial da emissão de energia na forma de calor e inibição da atividade da fotossistema II, em concordância com os dados apresentados no presente trabalho para o genótipo selvagem (Figuras 4c e 5b). Além disso, aqueles autores verificaram que o oxigênio era utilizado como aceptor alternativo de elétrons, em uma tentativa de manter a CTE em funcionamento, da mesma forma como verificado por Biehler *et al.* (1997) para o genótipo selvagem através de um aumento nas taxas de redução do O₂. A recepção de elétrons e a consequente oxidação incompleta do oxigênio pode dar origem a espécies reativas de oxigênio (EROs) afetando diretamente o processo fotossintético (Bartosz 1997; Gill & Tuteja 2010).

O genótipo selvagem em situação de estresse hídrico deteve uma maior concentração de MDA (Figura 7a) em relação aos genótipos mutantes, indicando maior peroxidação de lipídeos e consequentemente, maiores danos às membranas devido à ação de EROs. Em função disso, MT obteve baixo rendimento quântico efetivo (Figura 4c) e menor taxa de transporte de elétrons (Figura 5a) nestas condições. A menor quantidade de malondialdeído registrada para *aurea* e *hp1* (Figura 7a) indica que os mutantes possuem maior potencial para se protegerem dos danos ocasionados pelo estresse oxidativo oriundo da situação de déficit hídrico.

A cultivar selvagem MT, em condições controle, apresentou maiores atividades para as enzimas PAL, essencial para a síntese de diversos fenilpropanoides de propriedades antioxidantes (Jones 1984) e POX, responsável também por degradar o peróxido de hidrogênio (Siegel 1993). Porém, em situação de deficiência hídrica, as atividades destas enzimas são semelhantes entre todos os genótipos (Figura 7e-f).

O mutante *aurea* manteve a CTE em funcionamento e o fotossistema II em operação apesar das limitações fotossintéticas impostas pela deficiência hídrica (Figuras 4c e 5a) possivelmente por aumentar a atividade de enzimas antioxidantes nestas condições, como a catalase, a peroxidase e a ascorbato peroxidase (em relação aos demais genótipos) (Figura 7b-c,e). O menor impacto da ação das espécies reativas de oxigênio sobre o metabolismo fotossintético deste mutante também pode ser verificado pela menor quantidade de malondialdeído, um produto direto da peroxidação lipídica, registrada em relação a cultivar selvagem (Figura 7a), fato apresentado também por Monteiro *et al.* (2012). Biehler *et al.* (1997) demonstraram que a taxa de redução de O₂ não aumentou para este mutante em situações de estresse hídrico. Embora possua clorofila a em menor quantidade, o conteúdo de carotenoides de *aurea* é semelhante à MT (Figura 6), o que poderia proporcionar maior capacidade de dissipar o excesso de energia decorrente da excitação das clorofilas (Cardoso 1997), acarretando menos dano aos fotossistemas.

De forma semelhante a *aurea*, o mutante *hp1* não diminuiu suas taxas de transporte de elétrons ou teve o seu rendimento fotoquímico afetado pela deficiência hídrica (Figuras 4c e 5a), porém este fato não se deve ao aumento da atividade das enzimas analisadas e ainda assim, registra baixa concentração de produtos oriundos da peroxidação lipídica (Figura 7). Monteiro *et al.* (2012) constataram que, em condições normais, o mutante *hp1* possui menor atividade de enzimas antioxidantes em comparação à MT, porém salienta que em situações de estresse, as respostas desse mutante em relação à concentração de antioxidantes também podem ser exageradas devido à sua natureza de hiperssensibilidade às respostas dependentes de fitocromos, fato não corroborado para a situação de deficiência hídrica analisada no presente estudo.

O mutante *hp1* possui maiores concentrações de carotenoides em relação ao genótipo selvagem (Figura 6d), podendo diminuir assim a formação de EROs devido à excitação da clorofila e auxiliando na dissipação da energia de forma não-fotoquímica (Eberhard *et al.*, 2008). Um aumento na taxa de *quenching* não-fotoquímico deste mutante foi verificado no último dia do experimento sob deficiência hídrica (Figura 5b). Assim sendo, para o mutante *high-pigment 1*, os carotenoides devem constituir uma importante ferramenta na manutenção do funcionamento normal dos fotossistemas mesmo em condições de estresse por deficiência hídrica.

É possível também que genótipos que apresentem maior quantidade de antioxidantes e produtos derivados do metabolismo de fenilpropanoides, como o mutante *hp1*, sejam menos suscetíveis aos efeitos do estresse hídrico, não alterando sensivelmente a atividade de enzimas como a PAL por já possuir um arsenal químico de defesa disponível contra o estresse oxidativo. Em estudo feito com frutos de pimenta, Phimchan *et al.* (2014) relata que as cultivares com maior concentração de capsaicinoides (produto derivado do metabolismo de fenilpropanoides) foram menos sensíveis ao estresse hídrico em comparação às cultivares menos pungentes, de menor concentração de capsaicinoides. Os autores relatam ainda que a atividade da PAL em frutos mais pungentes não foi alterada em consequência do estresse hídrico.

Existem evidências de que a luz, por meio do fitocromo, esteja envolvido com a regulação da atividade de enzimas antioxidantes (Drumm & Schopfer 1974; Zhong *et al.* 1994, 1997; Mullineaux *et al.* 2000) e na biossíntese de compostos antioxidantes como os carotenoides (Pizarro & Stange 2009; Toledo-Ortiz *et al.*, 2010). Assim sendo, a maior tolerância dos mutantes aos efeitos da deficiência hídrica pode ser atribuída à maior atividade de enzimas antioxidantes como a catalase e a ascorbato peroxidase por parte do mutante *aurea* e por uma maior quantidade de compostos antioxidantes não-enzimáticos por parte do mutante *hp1* nestas condições, embora estudos complementares sejam necessários para corroborar tais hipóteses.

CONCLUSÃO

A cultivar selvagem Micro-Tom e seus genótipos mutantes fotomorfológicos *aurea* e *high-pigment 1* apresentaram respostas fisiológicas e bioquímicas diferentes durante o tratamento por deficiência hídrica.

Houve diminuição do potencial hídrico de todos os genótipos analisados, validando a comparação dos resultados entre os grupos denominados controle (sob regime de disponibilidade hídrica normal) e estresse (sob déficit hídrico).

As taxas de fotossíntese, condutância estomática e transpiração diminuíram durante o período de experimento para todos os genótipos do grupo estresse. Os parâmetros de fluorescência F_o e F_v/F_m não foram afetados pela deficiência hídrica. Entre os genótipos do grupo estresse, a cultivar selvagem MT apresentou queda nos parâmetros F_q'/F_m' , ETR e NPQ, enquanto, de forma geral, os mutantes *aurea* e *high-pigment 1* apresentaram valores semelhantes aos encontrados ao grupo controle.

O mutante *hp1* apresenta os maiores valores de clorofila a, clorofila b e carotenoides, enquanto o mutante *aurea* apresenta a maior proporção entre clorofila a e b. O tratamento de deficiência hídrica aplicado não alterou o conteúdo de pigmentos cloroplastídicos em nenhum dos genótipos.

A maior quantidade de produtos oriundos de peroxidação lipídica, como o malondialdeído, presente no genótipo selvagem MT em condições de deficiência hídrica indica maior vulnerabilidade aos efeitos do estresse oxidativo em relação aos mutantes. Nestas situações, o mutante *aurea* responde com um aumento na atividade de enzimas antioxidantes como a catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase enquanto o mutante *high-pigment 1* provavelmente depende de defesas não-antioxidantes como os carotenoides.

Os microtomateiros fotomorfológicos mutantes *aurea* e *high-pigment 1* possuem maior tolerância à deficiência hídrica em relação ao genótipo selvagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSCHER RG, ERTURK N & HEATH LS. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.

APEL K & HIRT H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.

ARCOVERDE GB, RODRIGUES BM, POMPELLI MF & SANTOS MG. 2011. Water relations and some aspects of leaf metabolism of *Jatropha curcas* young plants under two water deficit levels and recovery. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 23 (2): 123-130.

ARO EM, VIRGIN I & ANDERSSON B. 1993. Photoinhibition of photosystem II: inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* 1143 (2): 113-134.

ARORA A, SAIRAM RK & SRIVASTAVA GC. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82 (10): 1227-1238.

ASADA K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141: 391-396.

AUGE GA, RUGNONE ML, CORTÉS LE, GONZÁLEZ CV, ZARLAVSKY G, BOCCALANDRO HE & SÁNCHEZ RA. 2012. Phytochrome A increases tolerance to high evaporative demand. *Physiologia Plantarum* 146: 228-235.

AYALA A, MUÑOZ MF & ARGUELLES S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2014, Article ID 360438, 31 p.

AZEVEDO RA, ALAS RM, SMITH RJ & LEA PJ. 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104: 280-292.

BABIOR BM. 1991. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 64: 959-966.

BAE G & CHOI G. 2008. Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting factors. *Annual Review of Plant Biology* 59: 281-311.

BAKER NR & ROSENQVIST E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55: 1607-1621.

BANNISTER WH, BANNISTER JV, BARRA D, BOND J & BOSSA F. 1991. Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free Radical Research Communications* 12-13: 349-361.

BARTOSZ G. 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 19 (1): 47-64.

BECKER TW, FOYER C & CABOCHE M. 1992. Light-regulated expression of the nitrate-reductase and nitrite-reductase genes in tomato and in the phytochrome-deficient aurea mutant of tomato. *Planta* 188: 39-47.

BENESOVÁ M, HOLÁ D, FISCHER L, JEDELSKÝ PL, HNILICKA F, WILHELMOVÁ N, ROTHOVÁ O, KOCOVÁ M, PROCHÁZKOVÁ D, HONNEROVÁ J, FRIDRICHOVÁ L & HNILICKOVÁ H. 2012. The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? *PLoS ONE* 7 (6): e38017. doi:10.1371/journal.pone.0038017.

BHATTACHARJEE S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plant. *Current Science* 89: 1113-1121.

BIEHLER K, HAUPT S, BECKMANN J, FOCK H & BECKER TW. 1997. Simultaneous CO₂- and ¹⁶O₂/¹⁸O₂-gas exchange and fluorescence measurements indicate differences in light energy dissipation between the wild type and the phytochrome-deficient aurea mutant of tomato during water stress. *Journal of Experimental Botany* 48: 1439-1449.

BIELSKI BH, ARUDI RL & SUTHERLAND WM. 1983. A study of the reactivity of HO₂/O₂- with unsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* 258: 4759-4761.

BILGER W & BJÖRKMAN O. 1990. Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25: 173-185.

BILGER W, SCHREIBER U & BOCK M. 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102: 425-432.

BOCCALANDRO HE, PLOCHUK EL, YANOVSKY MJ, SÁNCHEZ RA, GATZ C & CASAL JJ. 2003. Increase phytochrome B alleviates density effects on tuber yield of field potato crops. *Plant Physiology* 133: 1539-1546.

BOCCALANDRO HE, RUGNONE ML, MORENO JE, PLOCHUK EL, SERNA L, YANOVSKY MJ & CASAL JJ. 2009. Phytochrome B enhances photosynthesis at the expense of water-use efficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 150: 1083-1092.

BOGGS JZ, LOEWY K, BIBEE K & HESCHEL MS. 2010. Phytochromes influence stomatal conductance plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* 60: 77-81.

BORTHWICK HA & HENDRICKS SB. 1960. Photoperiodism in plants: growth is controlled by light and the measurement of night length through reversible reactions of a pigment. *Science* 132: 1223-1228.

BORTHWICK HA, HENDRICKS SB, PARKER MW, TOOLE EH & TOOLE VK. 1952. A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 38: 662-666.

BORTHWICK HA, HENDRICKS SB, TOOLE EH & TOOLE VK. 1954. Action of light on lettuce seed germination. *Botanical Gazette* 115 (3): 205-225.

BORTHWICK HA. 1957. Light effects on tree growth and seed germination. *Ohio Journal of Science* 57 (6): 357-364.

BOWLER C, VAN CAMP W, VAN MONTAGU M. & INZÉ D. 1994. Superoxide dismutases in plants. *Critical Reviews in Plant Science* 13: 199-218.

BOYER JS. 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.

BRADFORD MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

BRIGGS W & OLNEY MA. 2001. Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date: five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin and one superchrome. *Plant Physiology* 125: 85-88.

BUCHERT F & FORREITER C. 2010. Singlet oxygen inhibits ATPase and proton translocation activity of the thylakoid ATP synthase CF1Co. *FEBS Letters* 584: 147-152.

BUTLER WL, NORRIS KH, SIEGELMAN HW & HENDRICKS SB. 1959. Detection, assay and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 45: 703-708.

BUTLER WL. 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 29: 345-378.

CADENAS E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry* 58: 79-110.

CAMM EL & TOWERS GHN. 1973. Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry* 12: 961-973.

CAMPOS ML, CARVALHO RF, BENEDITO VA & PERES LEP. 2010. Small and remarkable: the Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. *Plant Signaling & Behavior* 5: 50-54.

CARDOSO SL. 1997. Fotofísica de carotenóides e o papel antioxidante de β -caroteno. *Química Nova* 20 (5): 535-540.

CARVALHO RF, AIDAR ST, AZEVEDO RA, DODD IC & PERES LEP. 2011a. Enhanced transpiration rate in the high pigment 1 tomato mutant and its physiological significance. *Plant Biology* 13: 546-550.

CARVALHO RF, CAMPOS ML & AZEVEDO RA. 2011b. The role of phytochrome in stress tolerance. *Journal of Integrative Plant Biology* 53 (12): 920-929.

CARVALHO RF, CAMPOS ML, PINO LE, CRESTANA SL, ZSÖGÖN A, LIMA JE, BENEDITO VA & PERES LEP. 2011c. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant developmental research. *Plant Methods* 7:18.

CASAL JJ, BALLARÉ CL, TOURN M & SÁNCHEZ RA. 1994. Anatomy, growth and survival of a long-hypocotyl mutant of *Cucumis sativus* deficient in phytochrome B. *Annals of Botany* 73: 569-575.

CASAL JJ, SÁNCHEZ RA & BOTTO JF. 1998. Modes of action of phytochromes. *Journal of Experimental Botany* 49: 127-138.

CASTILLON A, SHEN H & HUQ E. 2007. Phytochrome interacting factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends in Plant Science* 12 (11): 514-521.

CAVERZAN A, PASSAIA G, ROSA SB, RIBEIRO CW, LAZZAROTTO F & MARGIS-PINHEIRO M. 2012. Plant response to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology* 35 (4): 1011-1019.

CHANCE B & MAEHLEY AC. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.

CHAVES MM, MAROCO JP & PEREIRA JS. 2003. Understanding plant responses to drought: from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.

CHEN M, CHORY J & FANKHAUSER C. 2004. Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics* 38: 87-117.

CHEN M, TAO Y, LIM J, SHAW A & CHORY J. 2005. Regulation of phytochrome B nuclear localization through light-dependent unmasking of nuclear-localization signals. *Current Biology* 15: 637-642.

CLACK T, MATHEWS S & SHARROCK RA. 1994. The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Molecular Biology* 25: 413-427.

- COOKSON PJ, KIANO JW, SHIPTON CA, FRASER PD, ROMER S, SCHUCH W, BRAMLEY PM & PYKE KA. 2003. Increases in cell elongation, plastid compartment size and phytoene synthase activity underlie the phenotype of the high-pigment 1 mutant of tomato. *Planta* 217: 896-903.
- CORPAS FJ, BARROSO JB & DEL RÍO LA. 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* 6 (4): 145-150.
- DEL RIO LA, SANDALIO LM, CORPAS FJ, PALMA JM & BARROSO JB. 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes: Production, scavenging and role in cell signalling. *Plant Physiology* 141: 330-335.
- DRUMM H & SCHOPFER P. 1974. Effect of phytochrome on development of catalase activity and isoenzyme pattern in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Planta* 120: 13-30.
- EBERHARD S, FINAZZI G & WOLLMAN F. 2008. The dynamics of photosynthesis. *Annual Review of Genetics* 42: 463-515.
- EHLERINGER J. 1981. Leaf absorptances of Mohave and Sonoran desert plants. *Oecologia* 49: 366-370.
- EMMANUEL E & LEVY AA. 2002. Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 112-117.
- FANKHAUSER C & CHEN M. 2008. Transposing phytochrome into the nucleus. *Trends in Plant Science* 13 (11): 596-601.
- FANKHAUSER C & CHORY J. 1997. Light control of plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13: 203-229.
- FLEXAS J, BOTA J, ESCALONA JM, SAMPOL B & MEDRANO H. 2002. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology* 29: 461-471.
- FLORS C & NONELL S. 2006. Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxic phenalones phytoalexins. *Accounts of Chemical Research* 39: 293-300.

- FOYER CH & NOCTOR G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355-364.
- FOYER CH & NOCTOR G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment* 28: 1056-1071.
- FRANKLIN KA, LARNER VS & WHITELAM GC. 2005. The signal transducing photoreceptors of plants. *International Journal of Developmental Biology* 49: 653-664.
- GENTY B, BRIANTAIS J & BAKER NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92.
- GIANNOPOLITIS CN & RIES SK. 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- GILL SS & TUTEJA N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- GONZÁLEZ CV, IBARRA SE, PICCOLI PN, BOTTO JF & BOCCALANDRO HE. 2012. Phytochrome B increases drought tolerance by enhancing ABA sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* 35: 1958-1968.
- GOUD KV & SHARMA R. 1994. Retention of photoinduction of cytosolic enzymes in aurea mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiology* 105: 643-650.
- GOUD KV, SHARMA R, KENDRICK RE & FURUYA M. 1991. Photoregulation of phenylalanine ammonia lyase is not correlated with anthocyanin induction of photomorphogenetic mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Physiology* 32: 1251-1258.
- HALLIWELL B. & GUTTERIDGE JMC. 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Clarendon Press, Oxford.

- HALLIWELL B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox Biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.
- HARB A, KRISHNAN A, AMBAVARAM MMR & PEREIRA A. 2010. Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology* 154: 1254-1271.
- HAUPT-HERTING S & FOCK HP. 2000. Exchange of oxygen and its role in energy dissipation during drought stress in tomato plants. *Physiologia Plantarum* 110: 489-495.
- HAUSER BA, CORDONNIER-PRATT MM, DANIEL-VEDELE F & PRATT LH. 1995. The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily. *Plant Molecular Biology* 29: 1143-1155.
- HAVAUX M. 2013. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*. doi: 10.1111/tpj.12386
- HAVIR EA & McHALE NA. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84: 450-455.
- HEATH RL & PACKER L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- HUGHES J. 2010. Phytochrome three-dimensional structures and functions. *Biochemical Society Transactions* 38: 710-716.
- HURA T, HURA K & GRZESIAK S. 2008. Contents of total phenolics and ferulic acid and PAL activity during water potential changes in leaves of maize single-cross hybrids of different drought tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194: 104-112.
- HYUN MW, YUN YH, KIM JY & KIM SH. 2011. Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. *Mycobiology* 39 (4): 257-265.

- JARRET RL, SAYAMA H & TIGCHELAAR EC. 1984. Pleiotropic effects associated with the chlorophyll intensifier mutations high pigment and dark green in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 109: 873-878.
- JEFFERIES RA. 1994. Drought and chlorophyll fluorescence in field-grown potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum* 90: 93-97.
- JEYARAMRAJA PR, PIUS PK, KUMAR RR & JAYAKUMAR D. 2003. Soil moisture stress-induced alterations in bioconstituents determining tea quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 1187-1191.
- JONES DH. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. *Phytochemistry* 23 (7): 1349-1359.
- KAR M & MISHRA D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57: 315-319.
- KENDRICK RE, KERCKHOFFS LHJ, VAN TUINEN A & KOORNNEEF M. 1997. Photomorphogenic mutants of tomato. *Plant, Cell and Environment* 20: 746-751.
- KEN-DROR S & HORWITZ BA. 1990. Altered phytochrome regulation of greening in an aurea mutant of tomato. *Plant Physiology* 92: 1004-1008.
- KERCKHOFFS LHJ, DE GROOT NAMA, VAN TUINEN A, SCHREUDER MEL, NAGATANI A, KOORNNEEF M & KENDRICK RE. 1997. Physiological characterization of exaggerated-photoresponse mutants of tomato. *Journal of Plant Physiology* 150: 578-587.
- KERR EA. 1965. Identification of high-pigment, hp, tomatoes in the seedling stage. *Canadian Journal of Plant Science* 45: 104-105.
- KEVEI E, SCHAFFER E & NAGY F. 2007. Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *Journal of Experimental Botany* 58 (12): 3113-3124.
- KHAN AU & WILSON T. 1995. Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chemistry & Biology* 2: 437-445.
- KIM C & APEL K. 2013. Singlet oxygen-mediated signaling in plants: moving from flu to wild type reveals an increasing complexity. *Photosynthesis Research* 116: 455-464.

- KOORNNEEF M & KENDRICK RE. 1986. A genetic approach to photomorphogenesis. In: KENDRICK RE & KRONENBURG GHM (Eds.) *Photomorphogenesis in plants*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. pp. 521-546.
- KOUKOL J & CONN EE. 1961. Metabolism of aromatic compounds in higher plants IV. Purification and properties of phenylalanine deaminase of *Horden vulgare*. *Journal of Biological Chemistry* 236: 2692-2698.
- KRAEPIEL Y, ROUSSELIN P, SOTTA B, KERHOAS L, EINHORN J, CABOCHE M & MIGINIAC E. 1994. Analysis of phytochrome- and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Journal* 6 (5): 665-672.
- KRIEGER-LISZKAY A, FUFUZAN C & TREBST A. 2008. Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research* 98: 551-564.
- KUKI KN, OLIVA MA, GOMES FP & COSTA AC. 2005. Avaliação da eficiência do dimetilsulfóxido na extração de pigmentos foliares de *Schinus terebenthifolius* e *Cocos nucifera*. In: *X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal e XII Congresso Latino-Americano de Fisiologia Vegetal, Recife. Anais*, SBFV.
- LAISK A & LORETO F. 1996. Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology* 110: 903-912.
- LAWLOR DW & TEZARA W. 2009. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany* 103 (4): 561-579.
- LI L & LAGARIAS JC. 1992. Phytochrome assembly: defining chromophore structural requirements for covalent attachment and photoreversibility. *Journal of Biological Chemistry* 267 (27): 19204-19210.
- LI RH, GUO PG, BAUM M, GRANDO S & CECCARELLI S. 2006. Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agricultural Sciences in China* 5 (10): 751-757.

LIEBERMAN M, SEGEV O, GILBOA N, LALAZAR A & LEVIN I. 2004. The tomato homolog of the gene encoding UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB1) underlined as the gene that causes the high-pigment-1 mutant phenotype. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1574-1581.

LIMA ALS, DA MATTA FM, PINHEIRO HA, TOTOLA MR & LOUREIRO ME. 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany* 47: 239-247.

LIU J, ZHANG F, ZHOU J, CHEN F, WANG B & XIE X. 2012. Phytochrome B control of total leaf area and stomatal density affects drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* 78: 289-300.

LIU Y, ROOF S, YE Z, BARRY C, VAN TUINEN A, VREBALOV J, BOWLER C & GIOVANNONI J. 2004. Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101 (26): 9897-9902.

LÓPEZ-JUEZ E, NAGATANI A, BUURMEIJER WF, PETERS JL, FURUYA M, KENDRICK RE & WESSELIUS JC. 1990. Response of light-grown wild-type and aurea-mutant tomato plants to end-of-day far-red light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 4: 391-405.

LU C & ZHANG J. 1999. Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany* 50: 1199-1206.

MACDONALD MJ & D'CUNHA GB. 2007. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology* 85: 273-282.

MEISSNER R, JACOBSON Y, MELAMED S, LEVYATUV S, SHALEV G, ASHRI A, ELKIND Y & LEVY A. 1997. A new model system for tomato genetics. *Plant Journal* 12: 1465-1472.

MELO HC, CASTRO EM, ALVES E & PERINA F. 2011. Anatomia foliar de microtomateiros fitocromo-mutantes e ultra-estrutura de cloroplastos. *Ciência e Agrotecnologia* 35 (1): 11-18.

- MELO HC, CASTRO EM, SOARES AM, OLIVEIRA C & RAMOS SJ. 2009. Características fisiológicas de microtomateiros fitocromo-mutantes. *Ciência e Agrotecnologia* 33 (5): 1213-1219.
- MHAMDI A, NOCTOR G & BAKER A. 2012. Plant catalases: peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 525: 181-194.
- MISHRA KB, IANNAcone R, PETROZZA A, MISHRA A, ARMENTANO N, LA VECCHIA G, TRTÍLEK M, CELLINI F & NEDBAL L. 2012. Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. *Plant Science* 182: 79-86.
- MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M & VAN BREUSEGEM F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.
- MIYASHITA K, TANAKAMARU S, MAITANI T & KIMURA K. 2005. Recovery responses of photosynthesis, transpiration and stomatal conductance in kidney bean following drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 53 (2): 205-214.
- MOHR H, DRUMM H, SCHMIDT R & STEINITZ B. 1979. The effect of light pretreatments on phytochrome-mediated induction of anthocyanin and of phenylalanine ammonia-lyase. *Planta* 146: 369-376.
- MOLLER IM. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 561-591.
- MONTEIRO CC, ROLÃO MB, FRANCO MR, PETERS LP, CIA MC, CAPALDI FR, CARVALHO RF, GRATÃO PL, ROSSI ML, MARTINELLI AP, PETERS LEP & AZEVEDO RA. 2012. Biochemical and histological characterization of tomato mutants. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 84 (2): 573-585.
- MUELLER LA, LANKHORST RK, TANKSLEY SD, GIOVANNONI JJ, WHITE R, VREBALOV J *et al.* 2009. A snapshot of the emerging tomato genome sequence. *Plant Genome* 2: 78-92.
- MULLINEAUX P, BALL L, ESCOBAR C, KARPINSKA B, CREISSEN G & KARPINSKI S. 2000. Are diverse signalling pathways integrated in the regulation

of *Arabidopsis* antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 355: 1531-1540.

MURAMOTO T, KAMI C, KATAOKA H, IWATA N, LINLEY PJ, MUKOUGAWA K, YOKOTA A & KOHCHI T. 2005. The tomato photomorphogenetic mutant aurea is deficient in phytochromobilin synthase for phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant Cell Physiology* 46 (4): 661-665.

MURSHED R, LOPEZ-LAURI F & SALLANON H. 2013. Effects of water stress on antioxidant systems and oxidative parameters in fruits of tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 19 (3): 363-378.

NAGATANI A. 2004. Light-regulated nuclear localization of phytochromes. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 708-711.

NAKANO Y & ASADA K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22 (5): 867-880.

NAVABPOUR S, MORRIS K, ALLEN R, HARRISON E, MACKERNESS SAH & BUCHANAN-WOLLASTON V. 2003. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 54: 2285-2292.

OP DEN CAMP RG, PRZYBYLA D, OCHSENBEIN C, LALOI C, KIM C, DANON A, WAGNER D, HIDEG E, GOBEL C, FEUSSNER I, NATER M & APEL K. 2003. Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 2320-2332.

OZTETIK E. 2011. An introduction to oxidative stress in plants and the role of non-enzymatic antioxidants. In: ANJUM NA, UMAR S & AHMAD A. (eds.). *Oxidative Stress in Plants: Causes, Consequences and Tolerance*. New Delhi: I. K. International Publishing House.

PASARDI F, PENEL C & DUNAND C. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* 9 (11): 1360-1385.

- PETERS JL, SCHREUDER MEL, VERDUIN SJW & KENDRICK RE. 1992. Physiological characterization of high-pigment of tomato. *Photochemistry & Photobiology* 56: 75-82.
- PETERS JL, SZÉLL M & KENDRICK RE. 1998. The expression of light-regulated genes in the high-pigment-1 mutant of tomato. *Plant Physiology* 117: 797-807.
- PETERS JL, VAN TUINEN A, ADAMSE P, KENDRICK RE & KOORNNEEF M. 1989. High pigment mutants of tomato exhibit high sensitivity of phytochrome action. *Journal of Plant Physiology* 134: 661-666.
- PHIMCHAN P, CHANTHAI S, BOSLAND PW & TECHAWONGSTIEN S. 2014. Enzymatic changes in phenylalanine ammonia-lyase, cinnamic-4-hydroxylase, capsaicin synthase and peroxidase activities in *Capsicum* under drought stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 7057-7062.
- PIZARRO L & STANGE C. 2009. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciência e Investigación Agrária* 36 (2): 143-162.
- QUAIL PH. 2002. Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Review Molecular and Cell Biology* 3: 85-93.
- QUAN LJ, ZHANG B, SHI WW & LI HY. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 2-18.
- RAHBARIAN R, KHAVARI-NEJAD R, GANJEALI A, BAGHERI A & NAJAFI F. 2011. Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 53 (1): 47-56.
- RASCHER U, LIEBIG M & LÜTTGE U. 2000. Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. *Plant, Cell and Environment* 23: 1397-1405.
- REDDY AR, CHAITANYA KV & VIVEKANANDAN M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161: 1189-1202.

ROCKWELL NC, SU YS & LAGARIAS JC. 2006. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 837-858.

ROJAS CM, SENTHIL-KUMAR M, WANG K, RYU CM, KAUNDAL A & MYSORE KS. 2012. Gycolate oxidase modulates reactive oxygen species-mediated signal transduction during nonhost resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 336-352.

SAWADA Y, AOKI M, NAKAMINAMI K, MITSUHASHI W, TATEMATSU K, KUSHIRO T, KOSHIBA T, KAMIYA Y, INOUE Y, NAMBARA E & TOYOMASU T. 2008. Phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiology* 146: 1386-1396.

SCHMITT FJ, RENGER G, FRIEDRICH T, KRESLAVSKI VD, ZHARMUKHAMEDOV SK, LOS DA, KUZNETSOV VV & ALLAKHVERDIEV SI. 2014. Reactive oxygen species: re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837: 835-848.

SCHOLANDER PF, HAMMEL HT, BRADSTREET ED & HEMMINGSTEN EA. 1965. Sap pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148: 339-346.

SCHOPFER P. 1977. Phytochrome control of enzymes. *Annual Review of Plant Physiology* 28: 223-252.

SCHÖTTLER MA & TÓTH SZ. 2014. Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: environmental acclimation and photosynthetic flux control. *Frontiers in Plant Science* 5: 188. doi: 10.3389/fpls.2014.00188

SCOTT J & HARBAUGH B. 1989. Micro-Tom: a miniature dwarf tomato. *Florida Agricultural Experiment Station Circular* 370: 1-6.

SHARROCK RA & QUAIL PH. 1989. Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes and Development* 3: 1745-1757.

- SHARROCK RA, PARKS BM, KOORNNEF M & QUAIL PH. 1988. Molecular analysis of the phytochrome deficiency in an aurea mutant of tomato. *Molecular and General Genetics* 213: 9-14.
- SHIGEOKA S, ISHIKAWA T, TAMOI M, MIYAGAWA Y, TAKEDA T, YABUTA Y & YOSHIMURA K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1305-1319.
- SHINOZAKI K & YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58 (2): 221-227.
- SIEGEL BZ. 1993. Plant peroxidases: an organismic perspective. *Plant Growth Regulation* 12: 303-312.
- SMITH H. 1995. Physiological and ecological function within the phytochrome family. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 289-315.
- SUN HJ, UCHII S, WATANABE S & EZURA H. 2006. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genetics. *Plant Cell Physiology* 47: 426-431.
- TAKAHASHI S & BADGER MR. 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science* 16 (1): 53-60.
- TERRY MJ & KENDRICK RE. 1996. The aurea and yellow-green-2 mutants of tomato are deficient in phytochrome chromophore synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 271 (35): 21681-21686.
- TERRY MJ & KENDRICK RE. 1999. Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient aurea and yellow-green-2 mutants of tomato. *Plant Physiology* 119: 143-152.
- TERRY MJ, McDOWELL MD & LAGARIAS JC. 1995. (3Z)- and (3E)-phytochromobilin are intermediates in the biosynthesis of the phytochrome chromophore. *Journal of Biological Chemistry* 270: 11111-11119.

- TERRY MJ, RYBERG M, RAITT CE & PAGE AM. 2001. Altered etioplast development in phytochrome chromophore-deficient mutants. *Planta* 214: 314-325.
- TERRY MJ, WAHLEITHNER JA & LAGARIAS JC. 1993. Biosynthesis of the plant photoreceptor phytochrome. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 306: 1-15.
- TERRY MJ. 1997. Phytochrome chromophore-deficient mutants. *Plant, Cell and Environment* 20: 740-745.
- THOMPSON AE. 1962. A comparison of fruit quality constituents of normal and high pigment tomatoes. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 78: 464-473.
- THOMSEN B, DRUMM-HERREL H & MOHR H. 1992. Control of the appearance of ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) in mustard seedling cotyledons by phytochrome and photooxidative treatments. *Planta* 186: 600-608.
- TOLEDO-ORTIZ G, HUQ E & RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN M. 2010. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (25): 11626-11631.
- TSANG EWT, BOWLER C, HÉROUART D, VAN CAMP W, VILLARROEL R, GENETELLO C, VAN MONTAGU M & INZÉ D. 1991. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* 3: 783-792.
- VAN TUINEN A, CORDONNIER-PRATT MM, PRATT LH, VERKERK R, ZABEL P & KOORNNEEF M. 1997. The mapping of phytochrome genes and photomorphogenic mutants of tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 115-122.
- VAN TUINEN A, HANHART CJ, KERCKHOFFS LHJ, NAGATANI A, BOYLAN MT, QUAIL PH, KENDRICK RE & KOORNNEEF H. 1996. Analysis of phytochrome-deficient yellow-green-2 and aurea mutants of tomato. *Plant Journal* 9 (2): 173-182.

- WANG FF, LIAN HL, KANG CY & YANG HQ. 2010. Phytochrome B is involved in mediating red light-induced stomatal opening in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* 3: 246-259.
- WANG M, WISNIEWSKI M, MEILAN R, CUI M, WEBB R & FUCHIGAMI L. 2005. Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress. *Journal of American Society of Horticultural Science* 130: 167-173.
- WANG Y, WISNIEWSKI M, MEILAN R, CUI M & FUCHIGAMI L. 2006. Transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) overexpressing cAPX exhibits enhanced tolerance to UV-B and heat stress. *Journal of Applied Horticulture* 8: 87-90.
- WANG ZX, CHEN L, AI J, QIN HY, LIU YX, XU PL, JIAO ZQ, ZHAO Y & ZHANG QT. 2012. Photosynthesis and activity of photosystem II in response to drought stress in Amur Grape (*Vitis amurensis* Rupr.). *Photosynthetica* 50 (2): 189-196.
- WELLBURN AR. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144 (3): 307-313.
- WELLMANN E & SCHOPFER P. 1975. Phytochrome-mediated de novo synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in cell suspension cultures of parsley. *Plant Physiology* 55: 822-827.
- YAMAZAKI J. 2010. Is light quality involved in the regulation of the photosynthetic apparatus in attached rice leaves? *Photosynthesis Research* 105: 63-71.
- YAN J, WANG J, TISSUE D, HOLADAY AS, ALLEN R & ZHANG H. 2003. Photosynthesis and seed production under water-deficit conditions in transgenic tobacco plants that overexpress an *Arabidopsis* ascorbate peroxidase gene. *Crop Science* 43: 1477-1483.
- YANG ZQ, LI YX, JIANG XD, ZHU J & ZHANG JB. 2012. Effects of different red to far-red radiation ratios on the senescence of greenhouse chrysanthemum leaves. *African Journal of Agricultural Research* 7 (12): 1919-1925.

YOSHIMURA K, YABUTA Y, ISHIKAWA T & SHIGEOKA S. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stress. *Plant Physiology* 123: 223-234.

ZHONG HH, RESNICK AS, STRAUME M & McCLUNG CR. 1997. Effects of synergistic signaling by phytochrome A and cryptochrome1 on circadian clock-regulated catalase expression. *Plant Cell* 9: 947-955.

ZHONG HH, RESNICK AS, STRAUME M & McCLUNG CR. 1997. Effects of synergistic signaling by phytochrome A and cryptochrome1 on circadian clock-regulated catalase expression. *Plant Cell* 9: 947-955.

ZHONG HH, YOUNG JC, PEASE EA, HANGARTER RP & McCLUNG CR. 1994. Interactions between light and the circadian clock in the regulation of CAT2 expression in Arabidopsis. *Plant Physiology* 104: 889-898.

ZHONG HH, YOUNG JC, PEASE EA, HANGARTER RP & McCLUNG CR. 1994. Interactions between light and the circadian clock in the regulation of CAT2 expression in Arabidopsis. *Plant Physiology* 104: 889-898.

ZIMMERMANN P, HEINLEIN C, ORENDI G & ZENTGRAF U. 2006. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant, Cell and Environment* 29: 1049-1060.

ZUCKER M. 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology* 40 (5): 779-784.