

ESTRESSE ABIÓTICO EM PLANTAS TRANSFORMADAS E NÃO TRANSFORMADAS DE TOMATE 'MICRO-TOM COM DIFERENTES EXPRESSÃO DA sHSP22 MITOCONDRIAL: EFEITO DE CICLOS DE ALTA TEMPERATURA

RAMM, Aline^{1,2}; HÜTHER, Cristina Moll¹; ROMBALDI, Cesar Valmor³; FARIAS, Márcio Espinosa⁴; BACARIN, Marcos Antonio^{1,5}

¹Laboratório de Metabolismo Vegetal, UFPel, Instituto de Biologia, Depto Botânica, Campus Universitário S/N. Capão do Leão, RS. CEP: 96160-000. ³UFPel, FAEM, Depto. de Ciência e Tecnologia Agroindustrial; ²Bolsista de Apoio Técnico – CNPq; ⁴Bolsista Fapergs; ⁵Professor orientador (bacarin@ufpel.edu.br)

1 INTRODUÇÃO

Dentre os estresses abióticos, o estresse térmico induz várias alterações metabólicas, podendo levar ao encurtamento no ciclo de vida das plantas por inúmeras perturbações em processos metabólicos. Entre os processos fisiológicos, a fotossíntese é o mais sensível ao estresse térmico, ocorrendo a sua inibição quando as plantas são submetidas a temperaturas acima da temperatura ótima de crescimento (ALLAKHVERDIEV et al, 2008). Considerando a maquinaria fotossintética, o fotossistema II (FSII) tem sido relatado como o ponto de principal efeito das altas temperaturas (BERRY e BJÖRKMAN, 1980), contudo há relatos que outros componentes podem ser afetados pelas altas temperaturas, tais como a inativação dos centros de reação do FSII (BUKHOV, et al. 1990) e a transferência de elétrons entre Q_A e Q_B (DUCRUET e LEMOINE, 1985).

Objetivou-se no presente trabalho, identificar através de análises fotossintéticas (fluorescência das clorofilas e trocas gasosas) o efeito de diferentes ciclos de altas temperaturas (37°C) em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivar Micro-Tom com diferentes níveis de expressão da MT-sHSP22 (*mitochondrial small heat shock proteins*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de tomate cv. Micro-Tom não transformadas (selvagem) e transformadas com cDNA da sHSP22 mitocondrial (MT-sHSP22, alta e baixa expressão), foram cultivadas em vaso de polietileno de 0,5 kg de capacidade, contendo como substrato areia lavada. As plântulas foram mantidas em câmara de crescimento com condições controlada (temperatura de 21±2°C, fotoperíodo de 12h, densidade de fluxo de fótons em torno de 200 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e periodicamente irrigadas com solução nutritiva de (Hoagland e Arnon, 1950).

Quando apresentavam 59 dias, as plantas foram submetidas a estresse térmico por período de 24h a 37°C, em câmaras de crescimento (B.O.D, fotoperíodo de 12h e densidade de fluxo de fótons em torno de 50 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa) e, posteriormente transferidas para as condições iniciais por 24h (primeira recuperação), após este período foram novamente submetidas a novo ciclo de estresse e recuperação. As determinações da fluorescência transiente OJIP e trocas gasosas foram realizadas antes e imediatamente após cada ciclo de estresses/recuperação. A emissão da fluorescência das clorofilas foi determinada pelo uso do fluorômetro portátil Handy-PEA e a partir das intensidades de fluorescência foram calculados os parâmetros do

Teste JIP. Para as análises de fotossíntese líquida, utilizou-se um analisador portátil a infra-vermelho de CO₂ (modelo LI-6400XT LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado sendo comparados os três genótipos e os ciclos de estresse/recuperação. Utilizaram-se cinco repetições por tratamento,

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas de tomate 'Micro-Tom' submetidas a temperatura de 37°C, apresentaram alterações em parâmetros de fluorescência das clorofilas. Os parâmetros de fluxos específicos (fluxos por centro de reação do FSII) de absorção (ABS/RC), de captura (TR₀/RC) e de transporte de elétrons (ET₀/RC) (Fig 1) aumentaram em relação ao controle após os dois ciclos de estresse e retornaram para valores próximos ao controle nos três genótipos nas repetições. Porém, (RE₀/RC) aumentou apenas para o genótipo selvagem e com elevada expressão da MT-sHSP22. Entretanto o fluxo de dissipação (DI₀/RC) foi o parâmetro que mais elevou-se em respostas aos estresses em todos os genótipos, sendo que apenas após o primeiro período de recuperação foi observado retorno a valores similares ao controle, diferentemente após o segundo ciclo de recuperação tal parâmetro ainda se manteve elevado.

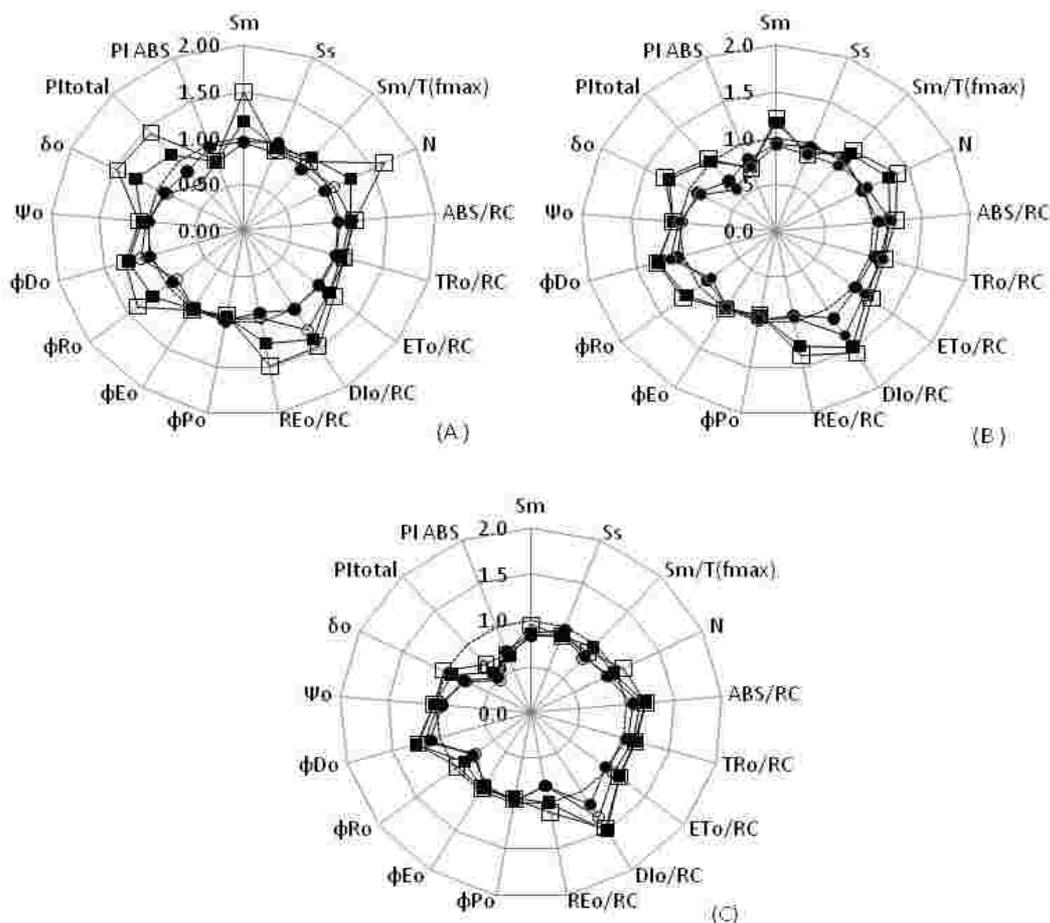


Figura 1: Parâmetros do Teste JIP, em relação ao respectivo controle, obtidos a partir da fluorescência transiente OJIP das clorofilas de plantas de tomate 'Micro-Tom'. (A) genótipo selvagem, (B) genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22, (C) genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22. (---) controle, (-|-) primeiro ciclo de estresse, (-●-) primeira recuperação, (-□-) segundo ciclo de estresse e (-○-) segunda recuperação.

O índice de performance (PI_{ABS}) apresentou decréscimo ao longo do tratamento em todos os genótipos, não sendo evidenciado retorno próximo ao controle, após a recuperação (Figura 1). Já o índice de performance total (PI_{total}) apresentou maior redução no genótipo com baixa expressão de sHSP22, bem como não apresentou recuperação. O mesmo não foi verificado para o genótipo selvagem e com elevada expressão de sHSP22, onde pode-se perceber acréscimo ao longo dos ciclos de temperatura, comportamento marcante para o genótipo selvagem. A recuperação de ambos os genótipos apresentou-se próximo aos níveis de controle.

Os valores de PI_{total} das plantas dos genótipos com elevada expressão da MT-sHSP22 e o selvagem, corroboraram com o que Yusuf et al. (2010), aborda, sobre este parâmetro, que quando mostra “ganho” (aumento em relação ao controle), significa que houve uma tensão positiva sobre o sistema, o que demonstra claramente que as modificações estruturais induzidas nessas plantas, permitiu à maquinaria fotossintética dessas plantas um melhor desempenho sob o tratamento com estresse térmico.

A taxa assimilatória líquida (A) (Figura 2) aumentou em relação ao controle após os dois ciclos de estresse por alta temperatura para as plantas do genótipo selvagem e com elevada expressão da MT-sHSP22, sendo para este último o aumento mais marcante, principalmente após o segundo ciclo de estresse a 37°C. Entretanto, para as plantas do genótipo com baixa expressão da MT-sHSP22 foi observado redução na taxa assimilatória líquida após o primeiro ciclo de estresse, contudo após o primeiro dia de recuperação os valores da taxa assimilatória líquida aumentaram, mas sempre abaixo dos observados para as plantas do genótipo com elevada expressão da MT-sHSP22.

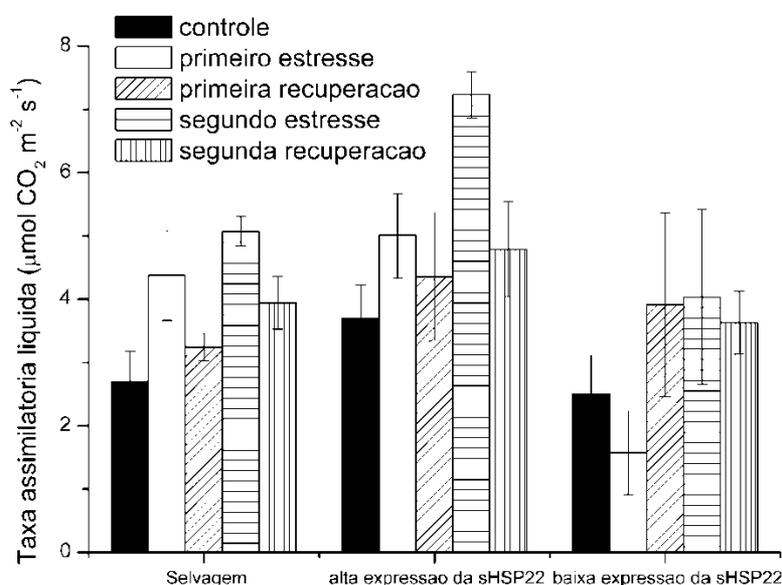


Figura 2: Taxa assimilatória líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de plantas de tomate Micro-Tom submetidas a períodos de 24 h a 37°C e subsequente recuperação a 21°C. Barra indica erro padrão da média.

O genótipo com elevada expressão da proteína MT-sHSP22, apresentou características de aclimatação a condição submetida pelo estresse o que vem confirmar com Heckathorn et al. (1998) que as HSPs constituem um componente importante na aquisição de termo-tolerância e, além disso, a expressão dessas proteínas juntamente com a sua associação com a mitocôndria, proporcionam

proteção à fosforilação oxidativa quando essas organelas são submetidas a elevadas temperaturas.

4 CONCLUSÃO

Para o estresse por alta temperatura observou-se que a sobreexpressão das sHSP22 mitocondrial resultou em menores efeitos danosos sobre a atividade fotossintética, evidenciando um grau de tolerância atribuído a estas proteínas.

5 REFERÊNCIAS

- ALLAKHVERDIEV S.I.; KRESLAVSKI V.D.; KLIMOV V.V.; LOS D.A.; CARPENTIER R.; MOHANTY, P. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis, **Photosynth**, v. 98, p. 541–550, 2008
- BUKHOV, N.G.; SABAT, S.C.; MOHANTY, P. Analysis of chlorophyll a fluorescence changes in weak light in heat treated *Amaranthus* chloroplasts, **Photosynth**, v. 23, p. 81–87, 1990.
- BERRY, J.; BJÖRKMAN, O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. **Plant Physiol**, v. 31, p. 491–54, 1980.
- DUCRUET, M. H.; LERNOINE, Y. Increased heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in triazine – resistant bio types from different plant species. **Plant Cell Physio**, v. 26, p. 419-429, 1985.
- HOAGLAND, D.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station Circular**, 347p. 1950.
- HECKATHORN, S. A.; DOWNS, C. A.; SHARKEY, T. D.; COLEMAN, J. S. The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. **Plant Physiology**. v.116, p. 439-444, 1998.
- YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE, SARIN, N. B. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1428–1438, 2010.