

AUXILIADORA OLIVEIRA MARTINS

**IMPACTOS ECOFISIOLÓGICOS E METABÓLICOS DA ALTERAÇÃO
NOS NÍVEIS DE GIBERELINA EM TOMATE**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013**

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

T

M386i
2013
Martins, Auxiliadora Oliveira, 1982-
Impactos ecofisiológicos e metabólicos da alteração nos
níveis de giberelina em tomate / Auxiliadora Oliveira Martins. –
Viçosa, MG, 2013.
xvi, 95 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Luiz Araújo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Tomate - Crescimento. 2. Giberelina. 3. Paclobutrazol.
4. Metabolismo. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 635.642

AUXILIADORA OLIVEIRA MARTINS

**IMPACTOS ECOFISIOLÓGICOS E METABÓLICOS DA ALTERAÇÃO
NOS NÍVEIS DE GIBERELINA EM TOMATE**

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

APROVADA: 30 de julho de 2013

Adriano Nunes Nesi
(Coorientador)

Dimas Mendes Ribeiro
(Coorientador)

Fábio Murilo DaMatta

Kelly S. Coutinho Detmann

Wagner L. Araújo
(Orientador)

À Nadir Gordiana Martins e Expedito Flaviano
Martins, meus queridos pais, dedico.

*“Antes de julgar a minha vida, ou o meu caráter,
calce os meus sapatos e percorra o caminho que eu percorri,
viva as minhas tristezas, as minhas dúvidas e as minhas alegrias.
Percorra os anos que eu percorri, tropece onde eu tropecei
e levante-se assim como eu fiz.
E então, só aí poderás julgar.”*

Anderson Silva

AGRADECIMENTOS

Meu maior agradecimento é dirigido a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades. “Pai, obrigada por tudo”!

Aos meus pais Nadir Gordiana Martins e Expedito Flaviano Martins por terem sido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores.

Aos meus irmãos que sempre depositaram em mim a confiança de realização de um sonho comum à todos e que para muitos tornou-se inatingível devido às circunstâncias vida.

Ao meus “pequeninos” que tornam meus dias cada vez melhores: Amores, a titia ama muito vocês.

Aos meus tios Sebastião e Leninha, pela confiança e apoio.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal que proporcionaram os meios para a realização do Curso de Mestrado.

A CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Professor Wagner L. Araújo pela inestimável orientação, oportunidade de aprendizado e crescimento, realização profissional, amizade, paciência, incentivo e pela confiança em mim depositada.

Ao Professor Adriano Nunes-Nesi e ao Doutor Dimas Mendes Ribeiro pela coorientação e direcionamento que contribuíram para o bom desenvolvimento do meu trabalho.

Aos Professores Raimundo Barros, Marcelo Ehlers Loureiro, Marcelo Rogalski e ao coordenador do programa, Fábio Murilo DaMatta, por disponibilizarem a estrutura de seus laboratórios para a realização dos experimentos.

Aos demais professores do curso, funcionários e colegas que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório: Alberto, Mariana, David, Jéssica, João Henrique, Caiafa, Jorge Condoria, Luís, Franklin, Laíse, Lidiane, Rebeca, Renato, Rinamara, Robson, Dálton Júnior, Izabel, Kallyne, Kelly, Paulo, Lílian, Leandro (Ibiá), Samuel, Danielle, Alyne (Bahia), Josélia e Renan pela amizade, pelo bom convívio e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

De forma muito especial agradeço às “minhas filhinhas” Franciele e Samira pelo grande comprometimento na realização de nossos trabalhos e principalmente pelos momentos de amizade e descontração. Vocês são maravilhosas!

À estrangeira mais querida de minha vida: Leidy, grande companheira nos dias intermináveis de estudos.

Às demais integrantes do inesquecível “quarteto fantástico” que tantas alegrias me proporcionaram durante os longos anos de graduação. Meninas, a amizade de vocês muito me fortalece.

Aos amigos que mesmo de longe sempre acreditaram que um dia chegaria até aqui.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	<i>viii</i>
Lista de tabelas.....	<i>x</i>
Lista de abreviaturas.....	<i>xi</i>
Resumo	<i>xiii</i>
Abstract.....	<i>xv</i>
1 Introdução Geral.....	1
1.1 Referências.....	4
2 Capítulo I: Alterações metabólicas e fisiológicas em plantas de tomate deficientes na biossíntese de giberelinas.....	6
2.1 Introdução	6
2.2 Material e Métodos.....	9
2.2.1 Material vegetal e condições de cultivos.....	9
2.2.2 Quantificação dos parâmetros de crescimento.....	10
2.2.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	11
2.2.4. Caracterização de células epidérmicas.....	13
2.2.5 Análises bioquímicas	13
2.2.6 Extração, derivatização e análise de metabólitos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	14
2.2.7 Procedimentos estatísticos.....	15
2.3 Resultados	15
2.3.1 Análises fisiológicas e parâmetros de crescimento.....	15
2.3.2 Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	18
2.3.3 Respostas da fotossíntese em função da intensidade luminosa e concentrações de CO ₂	20
2.3.4 Características de células epidérmicas.....	23
2.3.5 Pigmentos	24
2.3.6 Alterações metabólicas em respostas a variações endógenas nos níveis de GAs.....	25
2.4 Discussão.....	30
2.5 Referências.....	38

3	Capítulo II: Mudanças fisiológica, metabólica e anatômica em plantas de tomate com alterações nos níveis de giberelinas.....	46
3.1	Introdução.....	46
3.2	Material e Métodos.....	50
3.2.1	Material vegetal e condições de cultivo.....	51
3.2.2	Quantificação dos parâmetros de crescimento.....	51
3.2.3	Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....	52
3.2.4	Mensuração das propriedades ópticas.....	52
3.2.5	Anatomia foliar.....	53
3.2.5.1	Características morfo-anatômicas da folha.....	53
3.2.5.2	Características epidérmicas.....	53
3.2.6	Análises bioquímicas.....	54
3.2.7	Determinação de enzimas e metabólito envolvidos no metabolismo antioxidativo e danos celulares.....	55
3.2.7.1	Peroxidação de lipídeos.....	55
3.2.7.2	Ensaio enzimáticos.....	55
3.2.8	Determinação de enzimas envolvidas no metabolismo do carbono e respiratório.....	56
3.2.9	Determinação do conteúdo de nucleotídeos de piridina.....	56
3.2.10	Procedimentos estatísticos.....	56
3.3	Resultados.....	57
3.3.1	Análises fisiológicas.....	57
3.3.1.1	Crescimento é afetado em resposta às variações nos níveis de GAs	58
3.3.1.2	Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> são afetadas em resposta a variação nos níveis de GAs.....	61
3.3.1.3	Propriedades ópticas.....	65
3.3.1.4	Características morfo-anatômicas das folhas.....	67
3.3.1.5	Alterações metabólicas em resposta a variações nos níveis de GAs...	71
3.3.1.6	Determinação de pigmentos cloroplastídicos.....	74
3.3.1.7	Determinação de enzimas e metabólito envolvidos no metabolismo antioxidativo e danos celulares.....	75
3.3.1.8	Atividade enzimática: metabolismo do carbono e respiratório.....	78

3.3.1.9	Nucleotídeos de piridina.....	80
3.4	Discussão.....	81
3.5	Referências.....	89
3.6	Conclusões gerais e perspectivas.....	94

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

1	Imagens representativas de plantas utilizadas neste trabalho.....	16
2	Variação nos parâmetros de crescimento em resposta a redução endógena nos níveis de GAs.....	17
3	Variação nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência em resposta a redução endógena nos níveis de GA.....	20
4	Curvas de fotossíntese líquida (A_N) em resposta a alterações na radiação fotossinteticamente ativa (RFA).....	21
5	Curvas de resposta da fotossíntese líquida (A_N) a concentração subestomática (C_i), e cloroplastídica (C_c) de CO_2	22
6	Variação em células epidérmicas em resposta a redução endógena nos níveis de GA.....	24
7	Variação na concentração de clorofilas em resposta a redução endógena nos níveis de GA.....	25
8	Variação no conteúdo de metabólitos em resposta a redução endógena nos níveis de GA.....	26
9	Variação no conteúdo de aminoácidos em respostas a variações endógenas no conteúdo de GAs.....	28
10	Variação no conteúdo de ácidos orgânicos do TCA (A), assim como de ácido orgânicos e aminoácidos relacionados à fotorrespiração e sistema antioxidante (B) em respostas a variações endógenas no conteúdo de GAs.....	29
11	Variação no conteúdo de açúcares em respostas a variações endógenas no conteúdo de GAs.....	30

Capítulo II

1	Imagens representativas de plantas controles WT e <i>gib3</i> antes e após aplicação dos tratamentos.....	57
2	Variação nos parâmetros de crescimento em resposta a flutuação nos níveis de GA.....	60
3	Variação nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência em resposta a flutuação nos níveis de GA.....	64
4	Variação nas propriedades ópticas em resposta a flutuação nos níveis de GA.....	66
5	Variação nos parâmetros anatômicos da folha em resposta a flutuação nos níveis de GA.....	69
6	Variação nos parâmetros anatômicos da folha em resposta a flutuação nos níveis de GA.....	70
7	Variação nos níveis de metabólitos em resposta a flutuação nos níveis de GA.....	73
8	Variação nos conteúdos de pigmentos cloroplastídicos em resposta a flutuação nos níveis de GA.....	75
9	Variação no conteúdo de MDA e atividade da SOD e CAT em resposta a flutuação nos níveis de GA.....	77
10	Variação nos níveis de nucleotídeos de piridina em resposta a flutuação nos níveis de GA.....	81

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

- | | | |
|---|---|----|
| 1 | Parâmetros fotossintéticos derivados de curvas de luz..... | 21 |
| 2 | Parâmetros fotossintéticos derivados das curvas A_N/C_i e A_N/C_c | 23 |

Capítulo II

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | Varição na atividade das enzimas do metabolismo do carbono e/ou respiratório em resposta a flutuação nos níveis de GA..... | 79 |
|---|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

A_N = taxa de assimilação líquida de carbono

g_s = condutância estomática

g_m = condutância mesofílica

C_i = concentração interna de CO_2

C_c = concentração cloroplastídica de CO_2

C_i^* = ponto de compensação de CO_2 subestomático na ausência de respiração mitocondrial

C_a = concentração ambiente de CO_2

R_d = taxa de respiração no escuro

RFA = radiação fotossinteticamente ativa

I_c = irradiância de compensação

I_s = irradiância de saturação

J = taxa de transporte de elétrons

J_{max} = taxa máxima de transporte de elétrons

$V_{c,max}$ = taxa máxima de carboxilação

Γ^* = ponto de compensação de CO_2 cloroplastídico

rpm = rotação por minuto

ATP = adenosina trifosfato

U = unidade

NADPH = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido

NAD = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

TCR = taxa de crescimento relativo

F_0 = fluorescência mínima no escuro

F_m = fluorescência máxima no escuro

ETR = taxa de transporte de elétrons

MF = massa fresca

Chl *a* = clorofila *a*

Chl *b* = clorofila *b*

GA = giberelina

PBZ = paclobutrazol

DAT = dias após transplantio

A = absorptância

T = transmitância

R = reflectância

MDA = malonaldeído

CAT = catalase

SOD = superóxido dismutase

AFE = área foliar específica

AFT = área foliar total

DE = densidade estomática

EES = espessura da epiderme superior

E EI = espessura da epiderme inferior

EPL = espessura do parênquima lacunoso

EPP = espessura do parênquima paliçádico

ETF = espessura total da folha

AN = área da nervura

AFV = área do feixe vascular

RESUMO

MARTINS, Auxiliadora Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2013. **Impactos ecofisiológicos e metabólicos da alteração nos níveis de giberelina em tomate.** Orientador: Wagner L. Araújo. Coorientadores: Adriano Nunes Nesi e Dimas Mendes Ribeiro.

O presente trabalho foi conduzido com intuito de analisar os impactos causados pela variação endógena e/ou artificial (aplicação de GAs e paclobutrazol-PBZ) dos níveis de giberelinas sobre a fisiologia, metabolismo e anatomia de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Para tal, diferentes experimentos foram realizados utilizando-se plantas tipo selvagem (WT) e mutantes na biossíntese de giberelinas (*gib3*: moderadamente deficiente, *gib2*: medianamente deficiente e *gib1*: extremamente deficiente). No primeiro experimento foram utilizadas plantas WT e os mutantes *gib3*, *gib2* e *gib1* avaliando-se os efeitos da redução endógena dos níveis de GAs. Os resultados mostraram que a redução dos níveis de GAs afetou negativamente o crescimento dessas plantas e que este menor crescimento não estaria associado a menores taxas fotossintéticas. A elevada fotossíntese (A_N) nos mutantes apresentou-se associada com uma maior densidade e abertura estomática, assim como maiores condutâncias estomática (g_s) e mesofílica (g_m). Um desbalanço entre o metabolismo do carbono e crescimento parece ocorrer plantas com redução na concentração de GAs, visto que reduções nos teores da maioria dos metabólitos ocorreram concomitantemente com elevada A_N . Ademais, maior A_N foi acompanhada de uma elevada taxa respiratória e incrementos na concentração de proteínas, sugerindo um desvio de energia em forma de ATPs para outras rotas, já que uma maior produção de energia não se traduziu em acúmulo de biomassa. No segundo experimento foram utilizadas plantas WT e *gib3*, genótipo mais semelhante ao WT no primeiro experimento, submetidas à variações artificiais no conteúdo de GAs mediante a aplicação de GAs e/ou

PBZ. Os resultados obtidos permitiram a identificação de mudanças metabólicas e fisiológicas associadas tanto à variação endógena de GAs, assim como as ocasionadas pela variação artificial de GAs. Para ambos os genótipos, o crescimento foi bastante reduzido em presença de PBZ e apresentou incrementos quando da aplicação de GAs. Menores taxas de crescimento foram acompanhadas de maiores respiração no escuro (R_d) e A_N , a última influenciada por maiores densidade e abertura estomática, espessura foliar, assim como g_s e absorvância. A maioria dos metabólitos foi positivamente correlacionada com o conteúdo de GAs. Pouca ou nenhuma variação em parâmetros da fluorescência da clorofila a e sistema antioxidativo indicam ausência de estresses aparentes. Consideradas em conjunto, as informações obtidas com o presente estudo oferecem uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos, moleculares e metabólicos associados à deficiência de GAs em plantas; contudo, estudos metabólicos e moleculares mais detalhados ainda serão necessários para uma melhor compreensão dos efeitos da redução dos níveis de GAs sobre o metabolismo dessas plantas.

ABSTRACT

MARTINS, Auxiliadora Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Ecophysiological and metabolic impacts due to changes in gibberellin levels in tomato.** Adviser: Wagner L. Araújo. Co-advisers: Adriano Nunes Nesi and Dimas Mendes Ribeiro.

This study was carried out to analyze the physiological, metabolic and anatomic impacts promoted by both the endogenous and/or artificial variation of gibberellins (GAs) on tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). To this end, different experiments were performed using wild-type (WT) and mutant plants in the biosynthesis of gibberellins (*gib3*, moderately deficient; *gib2*, mildly deficient and *gib1*, extremely deficient). In the first experiment I used WT and the mutant plants *gib3*, *gib2* and *gib1* and evaluated the effects of endogenous reduction of GA levels. It was observed that the reduced levels of GAs negatively affected the growth and that this slower growth is not associated with lower photosynthetic rates. The higher net photosynthesis (A_N) found in the mutants were associated with both increased stomatal density and higher stomatal (g_s) and mesophyll (g_m) conductances. One clear imbalance between carbon metabolism and growth seems to occur in plants with reduced GAs levels, given that reductions in the levels of the majority of the metabolites occurred concomitantly to higher A_N . Moreover, higher A_N was accompanied by elevated respiratory rate and increments in protein concentration, suggesting a shift of energy in the form of ATPs to other routes, since more energy production was not associated with higher biomass accumulation. In the second experiment I used plants WT and *gib3*, the genotype most similar to WT in the first experiment, and subjected those plants to artificial variations in the content of GAs by applying GAs and/or paclobutrazol (PBZ), a GA biosynthesis inhibitor. The results obtained allowed the identification of both metabolic and physiological changes associated with both

endogenous GAs variation, as well as the artificial variation caused by varying the GAs regime. In both genotypes growth was strongly reduced in presence of PBZ whereas it was incremented when applying GAs. Lower growth rates were accompanied by higher dark respiration (R_d) and higher A_N , the former being influenced by larger stomatal density and stomatal opening, leaf thickness, as well as g_s and absorptance. The levels of the majority of metabolites evaluated were positively associated with GAs content. Little or no variation in chlorophyll fluorescence a and antioxidative system parameters indicated no apparent stress. Taken as a whole, the information obtained within this study provide a better understanding of the physiological, molecular and metabolic disorders associated with GA deficiency in plants; however, future metabolic and molecular studies are still required to allow us a better understanding of the effects of reduced GA levels on the metabolism of these plants.

1 Introdução Geral

Os hormônios funcionam coordenando tanto o crescimento quanto o desenvolvimento vegetal, em nível supracelular (Plackett et al., 2011). Assim, os fitohormônios, produtos naturais de baixo peso molecular, atuam em concentrações micromolares (ou mesmo menores) regulando, essencialmente, todo processo fisiológico e de desenvolvimento durante o ciclo de vida vegetal (Chiwocha et al., 2003). Incluem-se dentre esses compostos estruturalmente diversos, as auxinas, citocininas, ácido abscísico, giberelinas (GAs), etileno, poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico e brassinosteróides, dos quais são considerados reguladores do crescimento as auxinas, brassinosteróides, citocininas e as GAs, ao passo que ácido abscísico, etileno e ácido jasmônico são mais comumente associados a respostas a estresses (Wolters & Jürgens, 2009).

As GAs fazem parte de uma grande família de fitohormônios classificadas como diterpenóides tetracíclicos, que atuam durante todo o ciclo de vida das plantas superiores (Hedden & Kamiya, 1997). As GAs atuam como hormônios promotores do crescimento, desempenhando um papel crucial em processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Yamaguchi & Kamiya, 2000). Dentre esses processos, incluem-se a germinação das sementes, alongamento do colmo, expansão foliar, desenvolvimento de tricomas, florescimento e desenvolvimento dos frutos (Olszewski et al., 2002; Sakamoto et al., 2004; Zhu et al., 2006; Gao et al., 2011). Além disso, as GAs intermedeiam estímulos ambientais, modificando os fluxos através da própria via biossintética (Hedden & Kamiya, 1997). Assim, a regulação da biossíntese de GAs é fundamental para o desenvolvimento das plantas e sua adaptação ao meio ambiente. Por também intermediar certos sinais ambientais (*e.g.*, a qualidade da luz e

fotoperíodo) e desencadear respostas fisiológicas (*e.g.*, extensão de caule e floração) nas plantas (Hedden & Phillips, 2000), a regulação da biossíntese de GAs é extremamente complexa (Hedden & Proebsting, 1999).

O metabolismo das GAs é afetado pelo tipo de tecido, estágio de desenvolvimento, luz e pela própria GAs. Este último parece envolver mecanismos homeostáticos, fazendo parte de um amplo processo que inclui, ainda, a ação de outros hormônios (Hedden & Phillips, 2000). Embora mais de uma centena de diferentes GAs já tenham sido identificadas em plantas (ver <http://www.plant-hormones.info/gibberellins.htm>) (Hedden & Thomas, 2012), apenas poucas, as chamadas GAs bioativas, agem como reguladores endógenos de crescimento sugerindo, portanto, um elevado grau de especificidade (Cowling et al., 1998). Cumpre ressaltar também que a grande maioria das GAs identificadas são precursores das formas ativas ou encontram-se na forma inativa (Yamaguchi & Kamiya, 2000). A constatação de que apenas algumas dessas moléculas têm atividade biológica é baseada principalmente em trabalhos utilizando mutantes deficientes em GAs (Hedden & Phillips, 2000). Verifica-se, também, que o conteúdo de GAs bioativas atua de modo a promover a sua própria homeostase por meio de uma regulação via retroinibição negativa atuando sobre as enzimas *GA3ox* e *GA20ox*, responsáveis pelas etapas finais da ativação das GAs, e também por retroinibição positiva sobre a *GA2ox*, a qual realiza a inativação dessas GAs (Hedden & Kamiya, 1997; Hedden & Proebsting, 1999).

O isolamento da maioria dos genes que participam da biossíntese, catabolismo e sinalização têm contribuído de forma significativa tanto para a compreensão do metabolismo das GAs como dos mecanismos regulatórios associados ao conteúdo de GA. Ressalte-se, também, que tais estudos corroboram com a aparente complexidade química da família das GAs (Hedden & Phillips, 2000). Em adição, devido à maior

dificuldade de se identificar e analisar mutantes com alterações nas vias de transdução de sinais das GAs, a grande maioria das pesquisas se concentram em mutantes que apresentam alterações na via biossintética de GAs (Swain & Olszewski, 1996).

O efeito das GAs no crescimento e desenvolvimento vegetal envolve variações na taxa de divisão e expansão celular (Nelissen et al., 2012), além de mudanças anatômicas, morfológicas e fisiológicas (Biemelt et al., 2004). Assim, embora, o mecanismo de ação das GAs no desenvolvimento das plantas já esteja bem esclarecido, o efeito das GAs sobre o metabolismo primário e secundário ainda é pouco estudado. Neste contexto, verifica-se que apesar de muitos genes, incluindo vários relacionados ao metabolismo primário e secundário, serem diretamente regulados pela ação das GAs (Yamaguchi, 2008), apenas em alguns casos essa regulação e seus impactos sobre o metabolismo primário foi devidamente investigada (Ribeiro et al., 2012). Assim vários avanços significativos no que diz respeito ao entendimento das interações entre as GAs, crescimento e desenvolvimento das plantas foram alcançados. Todavia, inúmeras indagações sobre os mecanismos envolvidos na associação entre os níveis endógenos desse hormônio, metabolismo e desenvolvimento ainda não foram completamente elucidadas. Diante do exposto, o estudo detalhado de plantas com diferentes níveis de GAs, fornece uma excelente ferramenta para o entendimento do papel das GAs nos aspectos ecofisiológicos, metabólicos e moleculares em plantas.

Assim, o principal objetivo do presente trabalho foi investigar como e em que extensão a alteração nos níveis de GAs e seus impactos no crescimento interagem com as principais rotas metabólicas para ajustar os diferentes requerimentos celulares e metabólicos em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Para tanto este trabalho foi dividido em dois capítulos independentes cujos objetivos foram: (i) investigar os efeitos metabólicos e fisiológicos ocasionados pela alteração endógena nos níveis de

GAs utilizando-se plantas de tomate do tipo selvagem (*Solanum lycopersicum* L. cv Moneymaker), e mutantes deficientes na biossíntese de GAs, e (ii) analisar o impacto da manipulação artificial nos níveis de GAs sobre o metabolismo primário de plantas de tomate cultivado em solo suplementado com paclobutrazol (PBZ). Para tanto, características fisiológicas, metabólicas e anatômicas foram analisadas. Tomadas em conjunto, as informações obtidas com o presente trabalho fornecem uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos, moleculares e metabólicos associados à deficiência de GAs.

1.1) Referências

- Biemelt S, Tschiersch H, Sonnewald U** (2004) Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol* **135**: 254-265
- Chiwocha SDS, Abrams SR, Ambrose SJ, Cutler AJ, Loewen M, Ross ARS, Kermode AR** (2003) A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *Plant J* **35**: 405-417
- Cowling RJ, Kamiya Y, Seto H, Harberd NP** (1998) Gibberellin dose-response regulation of GA4 gene transcript levels in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **117**: 1195-1203
- Gao X, Xiao S, Yao Q, Wang Y, Fu X** (2011) An updated GA signaling 'relief of repression' regulatory model. *Mol Plant* **4**: 601-606
- Hedden P, Kamiya Y** (1997) GIBBERELLIN BIOSYNTHESIS: enzymes, genes and their regulation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 431-460
- Hedden P, Phillips AL** (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* **5**: 523-530
- Hedden P, Proebsting WM** (1999) Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* **119**: 365-370

- Hedden P, Thomas SG** (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J* **444**: 11-25
- Nelissen H, Rymen B, Jikumaru Y, Demuyne K, Van Lijsebettens M, Kamiya Y, Inzé D, Beemster GTS** (2012) A local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Curr Biol* **22**: 1183-1187
- Olszewski N, Sun T, Gubler F** (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* **14 Suppl**: S61-80
- Plackett ARG, Thomas SG, Wilson ZA, Hedden P** (2011) Gibberellin control of stamen development: a fertile field. *Trends Plant Sci* **16**: 568-578
- Ribeiro DM, Araújo WL, Fernie AR, Schippers JHM, Mueller-Roeber B** (2012) Action of gibberellins on growth and metabolism of *Arabidopsis* plants associated with high concentration of carbon dioxide. *Plant Physiol* **160**: 1781-1794
- Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal GK, Takeda S, Abe K, Miyao A, Hirochika H, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M** (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol* **134**: 1642-1653
- Swain SM, Olszewski NE** (1996) Genetic analysis of gibberellin signal transduction. *Plant Physiol* **112**: 11-17
- Wolters H, Jürgens G** (2009) Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat Rev Genet* **10**: 305-317
- Yamaguchi S** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 225-251
- Yamaguchi S, Kamiya Y** (2000) Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol* **41**: 251-257
- Zhu Y, Nomura T, Xu Y, Zhang Y, Peng Y, Mao B, Hanada A, Zhou H, Wang R, Li P, Zhu X, Mander LN, Kamiya Y, Yamaguchi S, He Z** (2006) ELONGATED UPPERMOST INTERNODE encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* **18**: 442-456

2 Capítulo I

Alterações metabólicas e fisiológicas em plantas de tomate deficientes na biossíntese de giberelina

2.1) Introdução

A chamada 'Revolução Verde', destaque na década de 1960, foi resultado da combinação entre o aumento do rendimento de culturas alimentares em todo o mundo, através da incorporação de características anãs, com outras práticas agrícolas (Wang et al., 2013). As giberelinas (GAs), compostos reconhecidamente associados com o fenótipo anão (Hedden & Kamiya, 1997) e diretamente envolvidas em diversos aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo o alongamento dos entrenós foram importantes para os avanços durante a Revolução Verde. Cumpre mencionar que hastes de plantas de trigo e arroz não eram suficientemente fortes para suportar o peso dos grãos nas variedades de alto rendimento, promovendo, assim, a queda das plantas, processo conhecido como acamamento, e conseqüentemente, grandes perdas na produção (Hedden, 2003). Na tentativa de minimizar esses efeitos supracitados, o gene *Rht*, responsável pelo hábito de crescimento semi-anão do trigo, foi isolado e caracterizado, evidenciando seu envolvimento com a via de transdução de sinais das GAs (Peng et al., 1999). Já o gene recessivo *sd1*, responsável pelo semnanismo em arroz, foi identificado como interferente na biossíntese de GAs (Monna et al., 2002; Spielmeier et al., 2002), assim como o gene dominante *D11* superexpressando as enzimas da rota biossintética de GAs, a GA20ox1 e GA2ox8 (Wang et al., 2013). Tomadas em conjunto, essas informações indicam que esse hormônio é de fundamental

importância para o controle da estatura em plantas (Hedden, 2003). Em adição, mutantes deficientes em GAs têm sido amplamente descritos em várias espécies vegetais (Wang & Li, 2008), todos apresentando fenótipo anão que pode ser revertido para o fenótipo selvagem pela aplicação exógena de GAs (Cowling et al., 1998), levando a consideráveis avanços no entendimento da via biossintética das GAs (Davière & Achard, 2013). Por outro lado, plantas mutantes não respondentes à aplicação de GAs tiveram um papel crucial no entendimento dos componentes da rota de sinalização desse hormônio (Harberd, 2009). Saliente-se que os mutantes não responsivos a GAs exibem respostas alteradas a GA e incluem mutantes com alterações tanto na percepção como na transdução de sinais. Dessa forma, embora os mutantes insensíveis a GAs apresentem um fenótipo anão semelhante ao de mutantes deficientes em GA, os mesmos não conseguem responder à aplicação de GA. Em contraste, mutantes com respostas constitutivas as GAs apresentam altura superior à de seus respectivos tipos selvagens, assim como folhas verdes mais claras e reduzida fertilidade, independentemente do conteúdo de GAs bioativas (Davière & Achard, 2013).

O estímulo ao crescimento vegetal promovido por GAs envolve mudanças tanto na divisão como na expansão celular (Richards et al., 2001). No entanto, apesar do seu efeito promotor de crescimento em plantas estar relativamente bem estabelecido, o envolvimento de GAs na regulação do metabolismo é ainda controverso. Dessa forma, embora uma variedade de mecanismos fisiológicos e genéticos vem sendo sugerido para explicar os efeitos gerais promovidos por GAs (Sánchez-Rodríguez et al., 2010), o seu papel na determinação do crescimento e regulação do metabolismo não é ainda completamente estabelecido. Nesse contexto, estudos diretos sobre o efeito integrado das GAs na expressão gênica, no metabolismo energético e no crescimento são relativamente escassos. Entretanto, dentre os raros estudos de caracterização dos genes

regulados pelas GAs foi demonstrado que as GAs modulam a atividade mitocondrial da piruvato desidrogenase cinase (PDK1) e que, subsequentemente, controlariam o crescimento em plantas de arroz (Jan et al., 2006). Isso levou Jan e colaboradores a sugerir que as GAs afetariam o metabolismo primário no ponto de entrada do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Com efeito, uma estreita associação entre o metabolismo mitocondrial, particularmente 2-oxoglutarato, a biossíntese de GAs e o controle da senescência em plantas de tomate foi recentemente observada (Araújo et al., 2012). Considerando que a deficiência em GA reduz as taxas de crescimento e que plantas com menores taxas de crescimento alocam uma pequena fração do carbono para o crescimento foliar e uma maior fração para a respiração radicular (Poorter et al., 1990; Van Der Werf et al., 1993; Atkin et al., 1996), a reduzida alocação de carbono para o crescimento foliar e aumento na alocação de carbono para a respiração em mutantes deficientes em GAs poderia explicar, ao menos parcialmente, o menor crescimento nessas plantas. Ressalte-se, todavia, que, apesar dos recentes avanços alcançados no estudo da respiração em plantas, pouco ainda é conhecido sobre a importância relativa dos componentes das rotas metabólicas envolvidas na respiração sob condições de manipulação dos níveis de fitohormônios. Alguns estudos, embora de maneira superficial, abordaram tal questão (Kato, 1956; Halevy, 1964; Szalai et al., 1975). Entretanto, pouco ou nada se conhece em relação ao metabolismo e ao funcionamento do TCA sob condições em que o balanço hormonal tenha sido alterado.

Embora diversos mutantes tenham sido gerados com intuito de elucidar a rota de síntese e catabolismo das GAs, o entendimento atual dos impactos da alteração nos níveis de GAs sob aspectos metabólicos e fisiológicos em plantas é ainda limitado. Plantas de tomate deficientes na expressão de três genes específicos da rota biossintética de GAs foram previamente isoladas e caracterizadas (Koornneef et al., 1990). Os

mutantes *gib3* e *gib1* tiveram reduções na atividade da enzima *ent*-caureno sintase isoformas B e A, respectivamente, enquanto *gib2* teve redução na atividade da GA₁₂ aldeído sintase (Bensen & Zeevaart, 1990). Esses mutantes deficientes na biossíntese de GAs (*gib3*, *gib2*, e *gib1*, Figura 1) fornecem uma valiosa ferramenta, permitindo abordar, em uma espécie de interesse agrônômico, as influências de alterações nos níveis de GAs no metabolismo de maneira geral, levando a uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos, moleculares e metabólicos associados à deficiência de GAs em plantas. Assim, o presente trabalho objetivou investigar os impactos metabólico e fisiológico da alteração endógena nos níveis de GAs utilizando-se plantas de tomate do tipo selvagem e mutantes naturais deficientes na biossíntese de GAs.

2.2) Material e métodos

O presente trabalho foi conduzido na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) e no Laboratório de Nutrição e Metabolismo Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (20° 45'S, 42° 15' W, 650 m de altitude), Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Foram utilizadas plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv Moneymaker) do tipo selvagem (WT) e mutantes deficientes na biossíntese de GAs (*gib3*, moderadamente deficiente em GAs, *gib2*, deficiência intermediária em GAs e *gib1*, extremamente deficiente em GAs) gentilmente cedidas pelo Dr. M. Koornneef (Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany).

2.2.1) Material vegetal e condições de cultivo

Sementes dos mutantes *gib3*, *gib2* e *gib1*, assim como do WT, foram germinadas em placas de Petri com duas camadas de papel filtro Whatman nº1 sendo embebidas em

solução de GA (Duchefa, Haarlem, The Netherlands; GA₃ 50μM). A germinação foi realizada em câmara de crescimento (Forma Scientific, Inc, Ohio, EUA), sob fotoperíodo de 12h/ 12 h (dia/noite), temperatura 25 °C/ 16 °C (dia/noite), umidade relativa 65 ± 5 % e intensidade de luz durante o período luminoso de 150 μmol m⁻² s⁻¹. Após sete dias, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo substrato comercial suplementado com 14g de NPK por vaso.

Após a transferência para vasos, as plantas foram mantidas em casa de vegetação sob condições semi-controladas, sendo irrigadas diariamente a fim de manter-se a umidade do substrato nos vasos próxima à capacidade de campo. As plantas foram mantidas nessas condições por cinco semanas até a determinação dos parâmetros de fluorescência e trocas gasosas além da coleta de material vegetal para as análises bioquímicas, *a posteriori*.

2.2.2) Quantificação dos parâmetros de crescimento

A altura, tomada do nível do solo até o nó apical superior, número total de folhas, ramos e entrenós das plantas, assim como o diâmetro do caule (tomado a um centímetro do solo) foram mensurados a cada dois dias. A massa seca foi determinada ao final do experimento, aos 42 dias após transplântio (DAT), em casa de vegetação. Para a determinação da massa seca de cada órgão, raízes, hastes e folhas foram levadas a uma estufa de circulação forçada e mantidas a 70 °C, por 72 h. De posse da massa seca desses órgãos foi determinada a alocação de matéria seca para os diversos constituintes da planta, além da razão raiz/parte aérea.

2.2.3) Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

A caracterização das trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foi feita em folhas completamente expandidas de plantas, após 40 DAT, em casa de vegetação utilizando-se um analisador de gases a infravermelho em sistema aberto, acoplado um fluorômetro (IRGA, Li-cor Inc. LI-6400XT, Lincoln, EUA). A taxa de assimilação líquida do carbono (A_N , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração interna de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), fluorescência mínima (F_0), fluorescência máxima emitida (F_m) e os demais parâmetros relacionados à fluorescência foram determinados sob concentração controlada de CO_2 ($400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), irradiância ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com 10% de luz azul) e temperatura e vapor de \u00e1gua ambiente. Par\u00e2metros relacionados \u00e0 fluoresc\u00eancia foram estimados conforme previamente descrito (DaMatta et al., 2002; Lima et al., 2002). A taxa de respira\u00e7\u00e3o no escuro (R_d) foi determinada nas mesmas folhas supracitadas, por meio do equipamento j\u00e1 mencionado, ap\u00f3s pelo menos 3 h de adapta\u00e7\u00e3o ao escuro.

Curvas de resposta de A_N \u00e0 radia\u00e7\u00e3o fotossinteticamente ativa (*RFA*) (A_N/RFA) foram obtidas, incrementando-se a *RFA* em 12 n\u00edveis (0, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 e 1500 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), mantendo-se a concentra\u00e7\u00e3o de CO_2 (C_a) no interior da c\u00e2mara em $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ possibilitando que as trocas gasosas e a fluoresc\u00eancia da clorofila *a* fossem medidas (Yim et al., 1997). As vari\u00e1veis derivadas das curvas A_N/RFA , tais como irradi\u00e2ncia de compensa\u00e7\u00e3o (I_c) e irradi\u00e2ncia de satura\u00e7\u00e3o (I_s), foram estimadas a partir de ajustes das curvas A_N/RFA pelo modelo hiperb\u00f3lico n\u00e3o-retangular (von Caemmerer, 2000).

As respostas de A_N \u00e0 concentra\u00e7\u00e3o interna de CO_2 (curvas A_N/C_i) foram obtidas a $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, um valor saturante (determinado a partir de curvas A_N/RFA), mas n\u00e3o fotoinibit\u00f3rio, variando-se a press\u00e3o parcial de CO_2 , na seguinte sequ\u00eancia: 40,

30, 20, 10, 5, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 Pa, exatamente como descrito (Long et al., 2003). A condutância mesofílica (g_m) foi estimada conforme descrito por (Harley et al., 1992), a partir de dados de A_N , C_i , R_d e taxa de transporte de elétrons (J) (estimada a partir dos dados de fluorescência, medidos simultaneamente com as trocas gasosas), como segue:

$$g_m = A / (C_i - (I^* * (J + 8(A + R_d)) / (J - 4(A + R_d))))$$

Embora o fator de especificidade da Rubisco não tenha sido ainda descrito para tomate, o ponto de compensação de CO_2 cloroplastídico (I^*) foi obtido como uma aproximação a partir do ponto de compensação de CO_2 subestomático na ausência de respiração mitocondrial (C_i^*), estimado como descrito anteriormente (Galmés et al., 2006). Assim, o valor adotado foi retirado tal como se encontra na literatura ($49 \mu\text{mol } CO_2 \text{ mol}^{-1}$), haja vista que I^* depende apenas da composição de aminoácidos das subunidades da Rubisco, não diferindo, portanto, entre linhas da mesma espécie (Bermúdez et al., 2012)

De posse das estimativas de g_m , as curvas A/C_i foram transformadas em curvas A/C_c (C_c = concentração de CO_2 nos sítios de carboxilação). Para tanto, C_c foi calculada usando a fórmula: $C_c = C_i - (A/g_m)$.

Os parâmetros provenientes das curvas A_N/C_i e A_N/C_c , tais como taxa máxima de carboxilação ($V_{c,max}$), taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}) e a taxa de uso das trioses fosfato (TPU), foram obtidos a partir do modelo desenvolvido previamente (Sharkey et al., 2007) e com controle da temperatura. Para tanto, excetuando-se o I^* , os parâmetros de cinética da Rubisco utilizados foram tomados da literatura (Bernacchi et al., 2001). Esse procedimento foi realizado por meio do pacote de programa Solver no Microsoft Excel[®].

2.2.4) Caracterização de células epidérmicas

Para análises de células epidérmicas foram realizadas impressões na superfície abaxial de folhas completamente expandidas, utilizando-se um molde odontológico (Berger & Altmann, 2000). As coletas foram realizadas aos 42 DAT no intervalo de 9 e 10 h da manhã. Sobre esse molde foi passado uma base incolor (Von Groll et al., 2002) possibilitando, a visualização da impressão das células. Em cada molde (repetição), três regiões distintas foram amostradas a fim de caracterizar, de forma mais homogênea possível, a região foliar amostrada. A visualização e registro das imagens foram feitos utilizando-se uma câmera digital (AxioCamMRc) acoplada ao microscópio (Zeiss modelo AX10). O número de células estomáticas assim como a área de abertura do poro estomático foi determinado utilizando-se o programa Axiovision 4.8.

2.2.5) Análises bioquímicas

Nas mesmas folhas utilizadas para as análises de trocas gasosas, amostras de material vegetal (~25 mg) foram coletadas, no intervalo entre 11:00 e 12:00 h aos 42 DAT, e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo armazenadas a -80°C, procedendo-se, *a posteriori*, às seguintes análises:

a) Extração e determinação de açúcares solúveis, aminoácidos totais, amido, pigmentos, proteínas, malato e fumarato

As amostras foram submetidas à extração etanólica, a quente, determinando-se, na fração solúvel em etanol, os teores de glicose, frutose e sacarose (Fernie et al., 2001); aminoácidos totais (Sienkiewicz-Porzucek et al., 2008) e malato e fumarato (Nunes-Nesi et al., 2007); na fração insolúvel, os teores de amido (Fernie et al., 2001) e o conteúdo de proteínas solúveis (Bradford, 1976) foram determinadas.

Os teores de clorofilas (*a* e *b*) foram determinados nos extratos etanólicos, em leitor de microplacas de ELISA, conforme previamente descrito (Porra et al., 1989). Os teores de clorofila totais (*a+b*) assim como a razão clorofila *a/b* foram calculados.

2.2.6) Extração, derivatização e análise de metabólitos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Para a determinação do perfil metabólico por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GCMS), amostras foliares foram extraídas em metanol, água e clorofórmio, conforme previamente descrito (Lisec et al., 2006). Essa análise permitiu a determinação de aproximadamente 60 diferentes compostos, representando as principais classes de compostos (aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e outros). Cerca de 100 mg de amostra foram divididas em tubos de 1,5 mL e extraídas em uma mistura pré-refrigerada de água, metanol e clorofórmio (1:2,5:1, *v/v/v*) e 60 µL de ribitol (0, 2 mg/mL). Amostras foram vigorosamente agitadas durante 10 s para completa mistura. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 min sob agitação de 1246 g, a 4 °C. Decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 16200 g, por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 750 µL de água ultrapura. As amostras foram vigorosamente agitadas novamente durante 10 s seguindo-se a uma nova centrifugação a 16200 g, por 15 min, a 4°C. A camada superior (fase polar) foi recolhida e alíquotas de 200 µL retiradas. As amostras foram secas a vácuo e armazenadas a -80 °C, até sua posterior utilização. Para a derivatização, adicionaram-se 40 µL de reagente de metoxiaminação a cada amostra procedendo-se a agitação a 16200 g, por 2 h, a 37 °C. Em seguida adicionaram-se 70 µL de N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) e padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) às amostras, procedendo-se à agitação a 1246 g, por 30 min, a 37 °C.

As amostras foram transferidas para frascos de vidro e analisadas por GC-MS. Os cromatogramas e os espectros de massa gerados foram avaliados utilizando o software TAGFINDER (Luedemann et al., 2008), e a identificação e anotação dos dados apresentados conforme recentes recomendações (Ferne et al., 2011).

2.2.7) Procedimentos estatísticos

O experimento foi instalado e analisado segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, considerando-se cada unidade experimental uma planta por vaso. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Newman-Keuls e *F*, a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG).

2.3) Resultados

2.3.1) Análises fisiológicas e parâmetros de crescimento

A partir da simples inspeção visual de plantas do genótipo WT comparadas aos mutantes *gib3*, *gib2* e *gib1*, que apresentam níveis endógenos de GAs reduzidos, identificou-se um padrão de crescimento bastante diferenciado e característico entre os genótipos testados (Figura 1). Assim, menores alturas foram observadas de acordo com a redução da concentração endógena de GAs nessas plantas, confirmando assim que GAs são capazes de influenciar o crescimento e desenvolvimento vegetal.



Figura 1: Imagens representativas de plantas utilizadas neste trabalho. Da esquerda para a direita, os genótipos apresentados são: WT (tipo selvagem) e mutantes: *gib3* (moderadamente deficiente em GAs), *gib2* (deficiência intermediária em GAs) e *gib1* (extremamente deficiente em GAs), cultivadas em condições normais. Esses mesmos fenótipos foram observados em pelo menos três experimentos distintos.

De maneira geral, plantas WT e *gib3* (moderadamente deficiente em GA), quando comparadas entre si, não apresentaram grandes variações em características morfológicas macroscópicas analisando órgãos vegetativos (Figura 2). De forma parecida, plantas *gib2* e *gib1* (mediana e extremamente deficiente em GAs, respectivamente) apresentaram um comportamento muito semelhante, não diferindo entre si em termos de altura (Figura 2A), diâmetro do caule (Figura 2B), número de entrenós (Figura 2D), número de ramos (Figura 2E), massa seca total (Figura 2F) e massa seca de raiz (Figura 2G); por outro lado, a razão raiz/parte aérea não diferiu em nenhum dos genótipos testados (Figura 2H). Assim, nota-se claramente que, *gib2* e *gib1* distinguem de *gib3* e WT no que respeita os parâmetros de crescimento. Registre-se

que a redução desses parâmetros acompanhou, em larga extensão, a redução na concentração endógena de GAs promovida pela mutação.

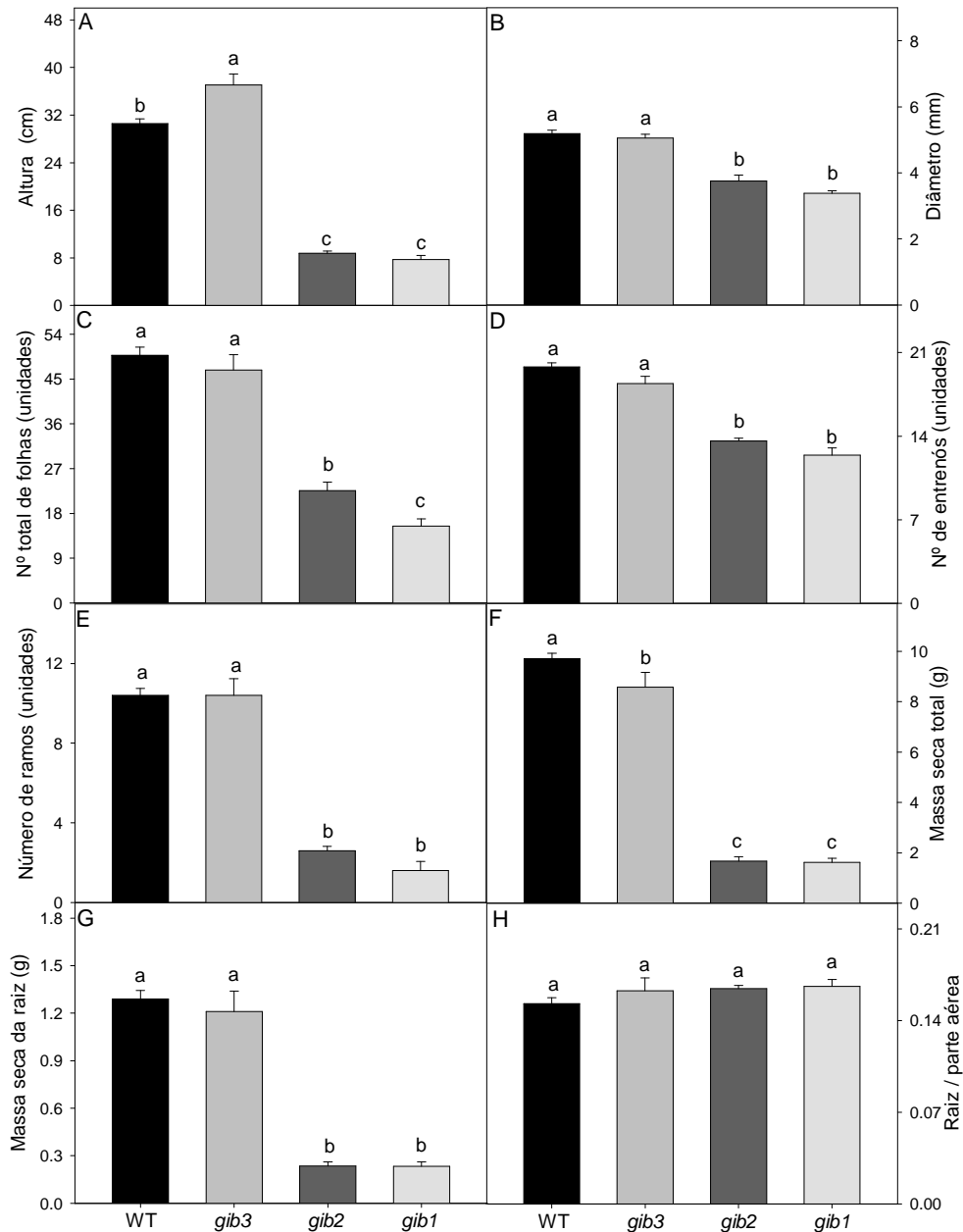


Figura 2: Variação nos parâmetros de crescimento em resposta a redução endógena nos níveis de GAs. Foram analisados: altura das plantas (A); diâmetro do caule (B); número total de folhas (C); número de entrenós (D); número de ramos (E); massa seca total (F); massa seca de raiz(G); razão raiz/parte aérea (H), respectivamente. Valores representam as médias \pm EP de pelos menos cinco plantas independentes com 42 DAT. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si ($P < 0,05$), segundo o teste *F* e Newman-Keuls. WT: tipo selvagem; GA: giberelina.

Assim como para a altura (Figura 2A), grandes reduções foram também observadas no que respeita o número de ramos (Figura 2E), massa seca total (Figura 2F) e na massa seca da raiz (Figura 2G) em plantas *gib2* e *gib1* quando comparadas a plantas WT, sendo que essa redução pode chegar a aproximadamente 75% (altura e número de ramos, Figuras 2A e 2E, respectivamente) e 80% (massa seca total e massa seca de raiz, Figuras 2F e 2G, respectivamente). Importante ressaltar que, apesar da grande variação encontrada entre os grupos formados nos parâmetros massas secas totais e de raízes, a razão raiz:parte aérea não foi sobremodo alterada (Figura 2H).

2.3.2) Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

Em função do impacto observado no crescimento dessas plantas em trabalhos anteriores, e sabendo-se que o balanço entre as taxas fotossintéticas e respiratórias influencia diretamente o crescimento e a produtividade vegetal, parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram avaliados. Observa-se que a variação endógena de GA promoveu alterações significativas na taxa de fotossíntese líquida por unidade de área foliar (A_N) em todos os genótipos (Figura 3A). De forma interessante, uma relação inversa entre níveis de GA e A_N foi observada, ou seja, à medida que a concentração endógena de GA se reduz (Koornneef et al., 1990), maiores A_N são observadas, aumento este que ultrapassa 100% comparando-se plantas WT e *gib1*. Observou-se também clara tendência de maiores valores de R_d em plantas com menores concentrações de GAs (Koornneef et al., 1990). Assim, em plantas *gib1* uma elevada taxa respiratória é observada (Figura 3B), diferindo das plantas WT e *gib2*, que não diferiram significativamente entre si. Em adição, plantas *gib3* apresentaram R_d maior que a observada em plantas WT, porém estatisticamente similar a plantas *gib1* e *gib2*. Ao se analisar g_s (Figura 4C), assim como a concentração interna de CO_2 (C_i) (Figura

4D), foi possível a formação de dois grupos distintos: *gib3* e WT versus *gib2* e *gib1*. Assim, plantas com menores concentrações endógenas de GAs (*gib2* e *gib1*, (Koornneef et al., 1990)) apresentaram maiores g_s , o que refletiu em maiores C_i , corroborando, parcialmente, os maiores valores de A_N encontrados nestas plantas (Figura 3A).

A razão F_v/F_m foi muito semelhante entre os genótipos (Figura 3E) com valores muito próximos aos considerados 'ideais' para folhas não estressadas ($\sim 0,83$) (Björkman & Demmig, 1987). As alterações observadas para a transpiração (E) (Figura 3F) foram semelhantes às encontradas em A_N , exceção feita apenas pela similaridade entre os genótipos *gib2* e *gib1*. Tanto a taxa de transporte de elétrons (ETR) (Figura 3G) como o rendimento quântico efetivo do PSII ($Y(II)$) (Figura 3H) apresentaram resultados semelhantes, observando-se que plantas WT apresentaram os menores valores, diferindo dos demais genótipos, ao passo que plantas *gib3* e *gib2* apresentaram valores intermediários, e o genótipo *gib1* o maior valor dentre os genótipos avaliados.

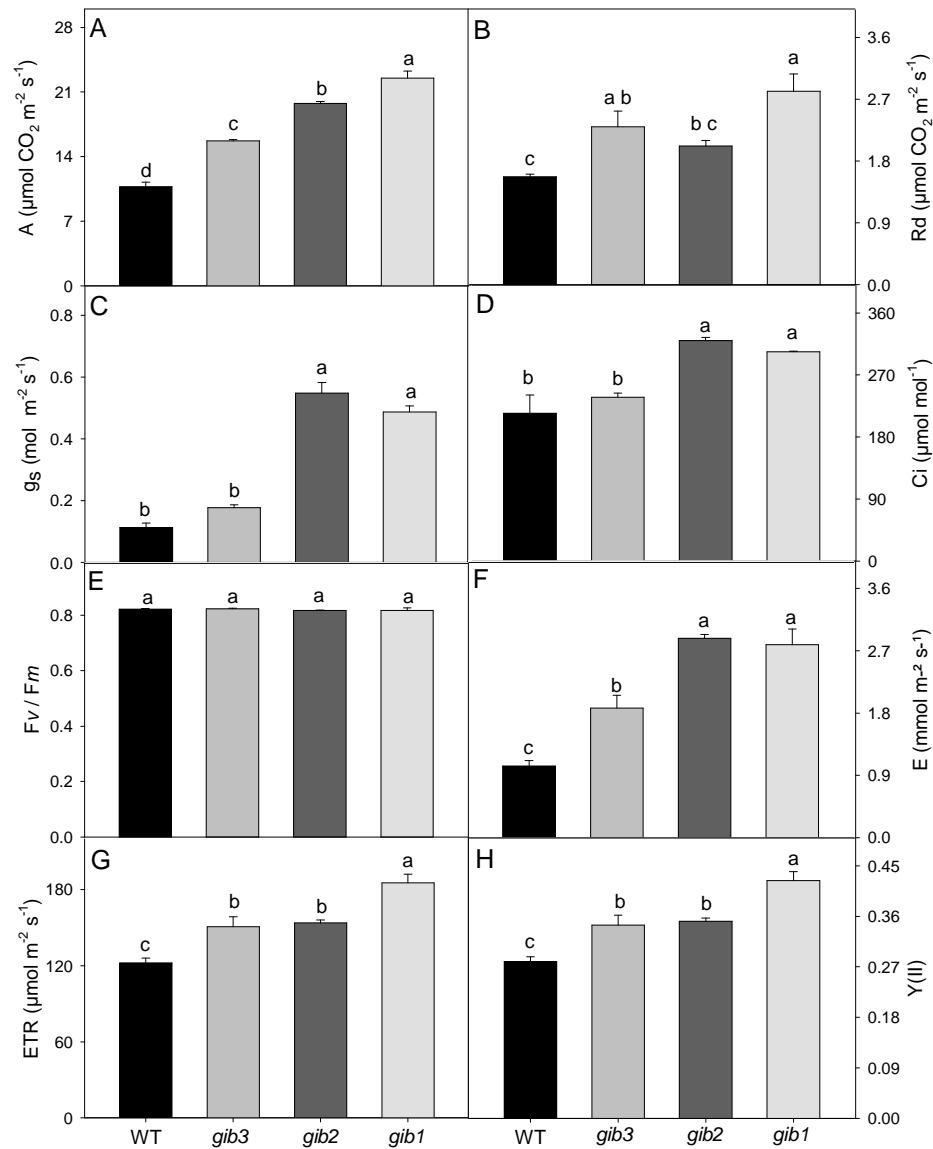


Figura 3: Variação nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência em resposta a redução endógena nos níveis de GA. Foram analisados: fotossíntese (A); respiração (B); condutância estomática (C); transpiração (D); F_v/F_m (E); concentração interna de CO_2 (F); ETR (G); Y(II) (H), respectivamente. Estatísticas e abreviaturas como descrito na Figura 2.

2.3.3) Respostas da fotossíntese em função da intensidade luminosa e concentrações de CO_2

Com o intuito de se caracterizar fotossinteticamente os genótipos em estudo investigaram-se a resposta da A_N à irradiância (curvas A_N/RFA) e à concentração interna de CO_2 (curvas A_N/C_i).

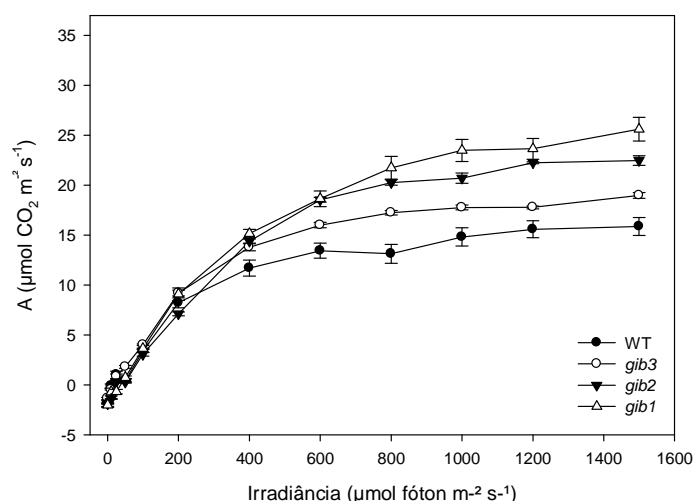


Figura 4: Curvas de fotossíntese líquida (A_N) em resposta a alterações na radiação fotossinteticamente ativa (RFA). WT e mutantes: *gib3* (moderadamente deficiente em GAs), *gib2* (deficiência intermediária em GAs) e *gib1* (extremamente deficiente em GAs). Valores representam as médias \pm EP (n=5).

Tanto a taxa de assimilação líquida de carbono saturada pela luz (A_{RFA}) quanto a irradiância de compensação (I_c) foram significativamente maiores em plantas *gib2* e *gib1* quando comparados a WT (Tabela 1). Resultado semelhante foi observado para irradiância de saturação (I_s). Registre-se também que a I_s , A_{RFA} e assim como a I_c foram semelhantes entre WT e *gib3* demonstrando que a deficiência moderada de GA pouco ou nada afetou esses parâmetros.

Tabela 1: Parâmetros fotossintéticos derivados de curvas de luz. Valores representam as médias \pm EP (n=5). Os valores que diferem significativamente entre ($P < 0,05$) pelo teste F apresentam-se acompanhados de letras diferentes.

Parâmetros	WT	<i>gib3</i>	<i>gib2</i>	<i>gib1</i>
A_{RFA} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	16.54 \pm 0.49 c	18.38 \pm 0.21 c	22.37 \pm 0.29 b	24.63 \pm 1,12 a
I_c ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	24.25 \pm 1.47 c	17.82 \pm 0.53 c	34.69 \pm 2.74 a	30.45 \pm 2.18 ab
I_s ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	704.67 \pm 29.57 b	656.58 \pm 25.32 b	874.48 \pm 20.37 a	892.02 \pm 25.48 a

I_c : irradiância de compensação; I_s : irradiância de saturação; A_{RFA} : fotossíntese líquida.

Em adição, curvas A_N/C_i foram obtidas e transformadas em curvas A_N/C_c (Figura 5). Tanto nas curvas A_N/C_i como nas A_N/C_c , os genótipos *gib3* e *gib1* apresentaram inicialmente uma maior taxa fotossintética que os genótipos *gib2* e WT (Figura 5A e B, respectivamente), porém na porção final da curva, o genótipo *gib2* sobressai-se ao WT e se iguala aos demais mutantes.

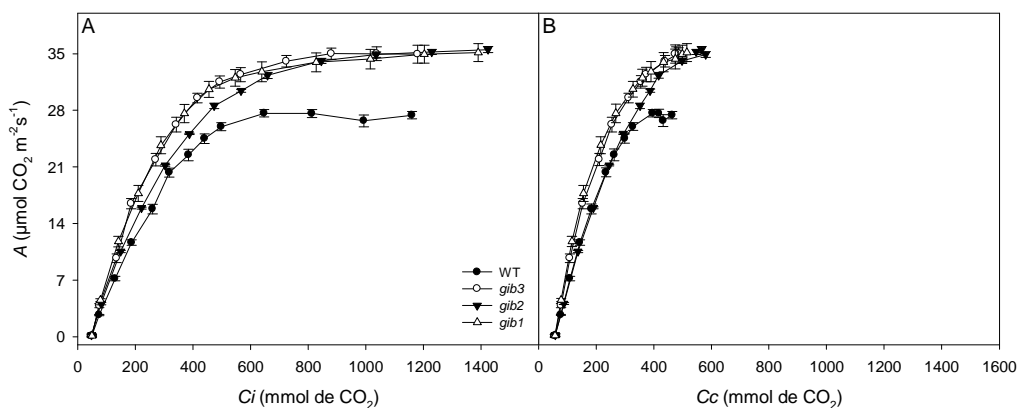


Figura 5: Curvas de resposta da fotossíntese líquida (A_N) a concentração subestomática (C_i), e cloroplastídica (C_c) de CO_2 . Curvas A_N/C_c (A); Curvas A_N/C_i (B), respectivamente. Valores representam as médias \pm EP ($n=5$).

As curvas A_N/C_i e A_N/C_c apresentaram comportamento muito semelhante, tendo na fase inicial uma inclinação bem acentuada e, na porção final, onde as limitações são devidas à taxa de transporte de elétrons e pelo uso das trioses fosfato, as mesmas foram relativamente atenuadas (Figura 5).

A concentração cloroplastídica de CO_2 (C_c), assim como g_m , foram estimadas pela combinação de parâmetros fotossintéticos e de fluorescência da clorofila *a* (Tabela 2). De forma geral, observou-se maiores g_m nos mutantes, aumento esse significativo apenas no *gib3*. De modo interessante, os parâmetros derivados das curvas ($V_{c,\max}$, J_{\max} e V_{TPU}) foram sempre superiores para as linhas mutantes em relação ao WT, sejam eles expressos em base C_i ou C_c . Exceção apenas para $V_{c,\max}$ em base C_c , em que diferenças

significativas entre o WT e o mutante *gib2* não foram observadas. De forma geral, As razões $J_{\max_C_i} : V_{c,\max_C_i}$ e $J_{\max_C_c} : V_{c,\max_C_c}$, apresentaram tendências de maiores valores em plantas *gib2* (significativas apenas em base C_c) e reduções nos mutantes *gib3* e *gib1* (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros fotossintéticos derivados das curvas A_N/C_i e A_N/C_c . Valores representam as médias \pm EP (n =5). Os valores que diferem significativamente entre ($P < 0,05$) pelo teste F apresentam-se acompanhados de letras diferentes.

	Genótipos			
	WT	<i>gib3</i>	<i>gib2</i>	<i>gib1</i>
$V_{c,\max}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	78.06 \pm 4.06 c	108.26 \pm 3.90 a	90.43 \pm 1.23 b	108.93 \pm 3.44 a
J_{\max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	136.30 \pm 1.70 b	173.41 \pm 1.16 a	166.98 \pm 2.48 a	168.60 \pm 3.95 a
gm^* ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$)	0.23 \pm 0.03 b	0.42 \pm 0.06 a	0.37 \pm 0.02 ab	0.34 \pm 0.04 ab
$J_{\max}/V_{c,\max}$	1.78 \pm 0.08 a	1.61 \pm 0.05 b	1.85 \pm 0.01 a	1.55 \pm 0.02 b

Valores estimados via C_i pelo método de Harley

	Genótipos			
	WT	<i>gib3</i>	<i>gib2</i>	<i>gib1</i>
$V_{c,\max}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	112.34 \pm 2.11 c	148.02 \pm 3.82 b	108.55 \pm 1.60 c	158.28 \pm 2.70 a
J_{\max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	159.08 \pm 1.26 b	199.75 \pm 2.46 a	192.75 \pm 3.78 a	199.71 \pm 2.64 a
$J_{\max}/V_{c,\max}$	1.42 \pm 0.02 b	1.35 \pm 0.02 c	1.77 \pm 0.02 a	1.26 \pm 0.02 d

Valores estimados via C_c pelo método de Harley

2.3.4) Caracterização de células epidérmicas

Todas as plantas mutantes (*gib3*, *gib2* e *gib1*) apresentaram maiores densidades estomáticas que as plantas WT (Figura 6A). Esses mutantes também diferiram entre si, sendo que *gib2* destaca-se entre os demais apresentando a maior densidade dentre os mutantes. De modo similar, a mesma tendência de variação foi observada para a

abertura do poro estomático (Figura 6B). Estes resultados ajudam a explicar, ao menos parcialmente, alguns dos resultados encontrados em trocas gasosas (Figura 3), tais como A_N , g_s , C_i e E (Figuras 3A, 3C, 3D e 3F, respectivamente).

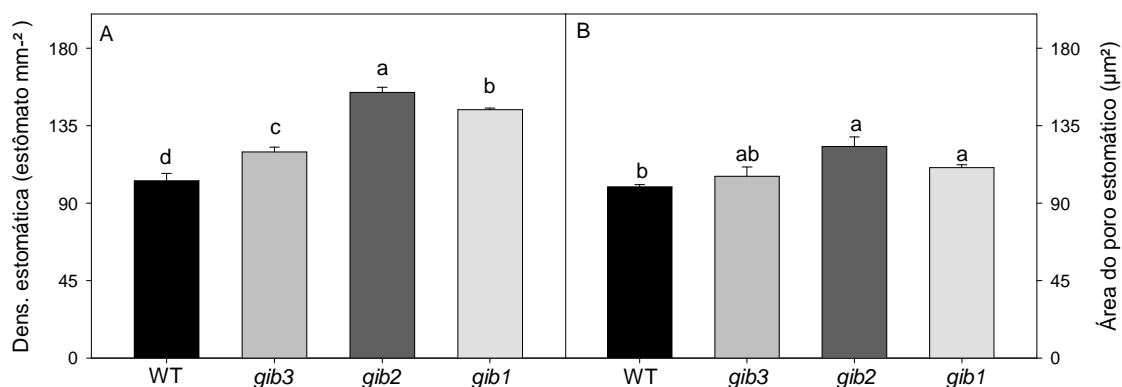


Figura 6: Variação em células epidérmicas em resposta a redução endógena nos níveis de GA. Foram analisados: densidade estomática (A), abertura do poro estomática (B), respectivamente. Estatísticas e abreviaturas como descrito na Figura 2.

2.3.5) Determinação de pigmentos

Em função das variações observadas em relação ao crescimento e as trocas gasosas decidiu-se avaliar os pigmentos fotossintéticos. De forma geral, a concentração de clorofilas (*a* e *b*) não diferiu entre plantas WT e deficientes na biossíntese de GAs (Figura 7A). Ressalte-se, todavia, que houve uma tendência de aumento no conteúdo de clorofila *b* concomitantemente com reduções na concentração endógena de GAs, o que pode ser observado pelas reduções na razão entre clorofila *a* e clorofila *b*, que foi significativamente menor em plantas *gib2* e *gib1* (Figura 7B). Uma possível explicação para tal fato é que plantas com reduzido teor de GA expandem menos suas folhas, provocando assim uma concentração dos pigmentos fotossintetizantes por unidade de massa.

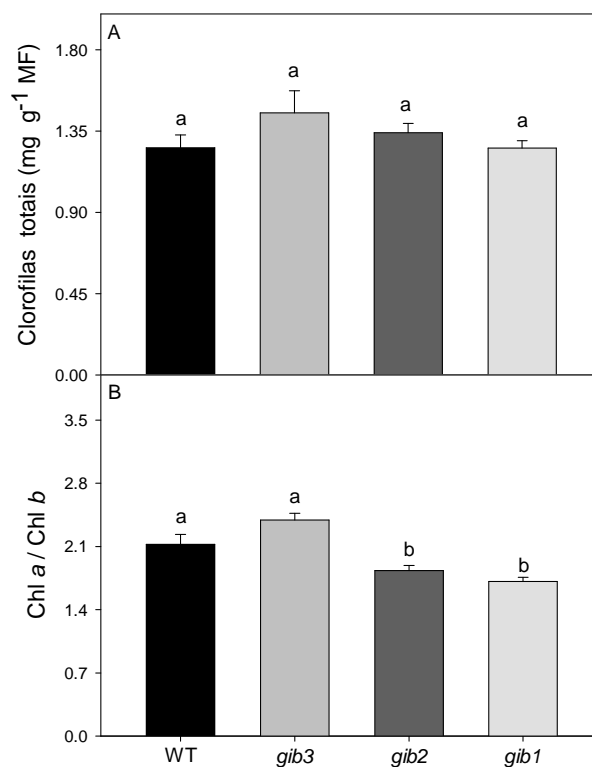


Figura 7: Variação na concentração de clorofilas em resposta a redução endógena nos níveis de GA. Foram analisados: clorofilas totais em função da massa fresca (MF) (A); razão Chl a/b (B), respectivamente. Estatísticas e abreviaturas como descrito na Figura 2.

2.3.6) Alterações metabólicas em respostas a variações endógenas nos níveis de GAs

Em função dos resultados observados para as análises de trocas gasosas (Figura 3), uma análise metabólica foi realizada. Uma considerável redução nos conteúdos de glicose e frutose (Figura 8A e 8B, respectivamente) foi observada nos genótipos deficientes em GA em relação ao WT (significativa em *gib2* e *gib1*), com pouca ou nenhuma alteração nas concentrações de sacarose (Figura 8C). Resultados semelhantes aos de açúcares solúveis foram também verificados para a concentração de amido (Figura 8D). Embora os níveis de nitrato não tenham diferido significativamente entre genótipos (Figura 8G), menores concentrações de aminoácidos totais (significativos

apenas em *gib1*) e maiores concentrações de proteínas totais foram observadas (Figura 8H e 8I, respectivamente). Em geral, e semelhantemente às concentrações de açúcares e de amido, a concentração tanto de malato (Figura 8E) quanto fumarato (Figura 8F) foi menor em plantas deficientes em GA. Cumpre ressaltar que, em todos os casos, a concentração dos metabólitos analisados esteve dentro de valores similares aos previamente relatados para tomate (Nunes-Nesi et al., 2007; Sienkiewicz-Porzucek et al., 2008).

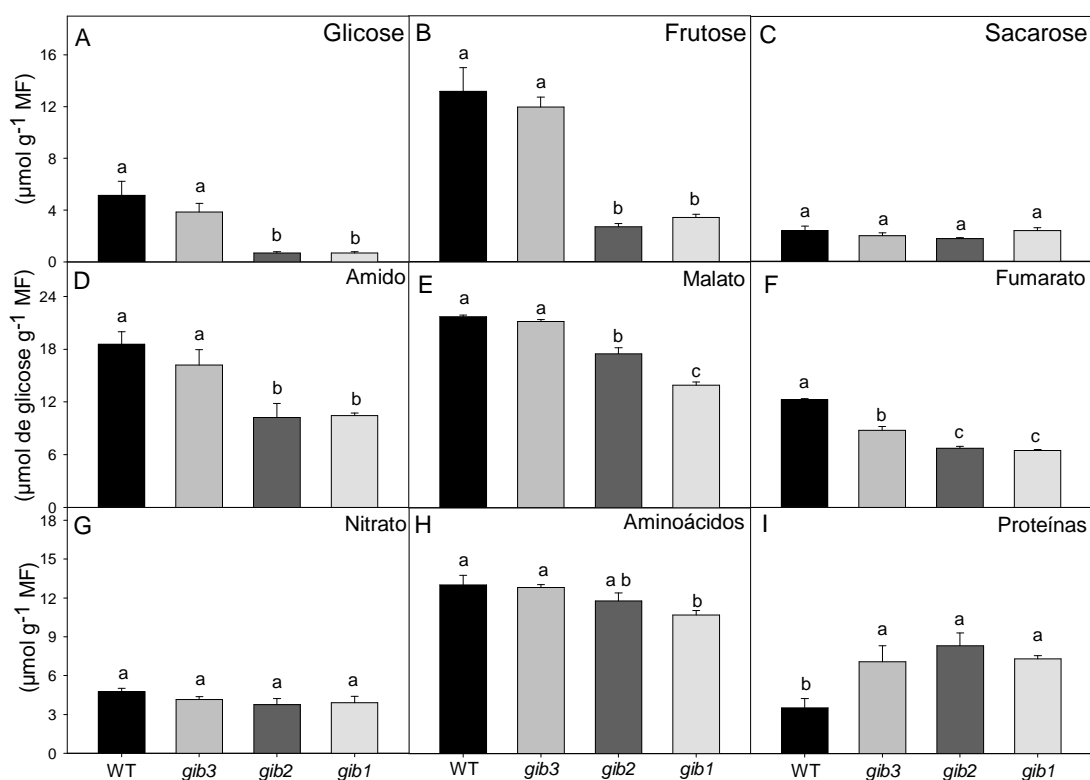


Figura 8: Variação no conteúdo de metabólitos em resposta a redução endógena nos níveis de GA. Foram analisados: glicose (A); frutose (B); sacarose (C); amido (D); malato (E); fumarato (F); nitrato (G); aminoácidos (H); proteínas (I), respectivamente. Estatísticas e abreviaturas como descrito na Figura 2. MF- massa fresca.

Considerando as variações metabólicas observadas (Figura 8) decidiu-se expandir este estudo para uma análise mais detalhada das principais rotas metabólicas

em plantas através do perfil metabólico mediante a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). De forma geral, essa análise permitiu a identificação de aproximadamente 60 metabólitos revelando variações consideráveis nos níveis de uma gama de aminoácidos (Figura 9), ácidos orgânicos e aminoácidos (Figura 10) e açúcares (Figura 11). Assim, foram observados aumentos significativos nos teores de valina, tirosina, metionina, lisina, isoleucina, histidina, asparagina, alanina e GABA (ácido gama-aminobutírico) em plantas *gib2* e *gib1* (Figura 9). Reduções significativas nos teores relativos de glicina, glutamina, homoserina e ornitina foram observadas tanto em plantas *gib2* quanto em *gib1*. Para o mutante *gib3*, que mais se assemelha ao WT, somente seis aminoácidos diferiram significativamente do WT, observando-se reduções nas concentrações de fenilalanina, glicina e homoserina e incrementos nas concentrações de alanina, aspartato e tiramina, com destaque para um incremento superior a 100% nos níveis de alanina (Figura 9).

Ao analisarem-se os ácidos orgânicos, alterações significativas nos níveis de alguns intermediários do ciclo TCA foram observadas (Figura 10A). Assim, embora os teores de isocitrato foram significativamente reduzidos apenas no mutante *gib2*, foi observada uma tendência de aumento em *gib1* quando comparado ao controle. Já os níveis de fumarato reduziram em todos os mutantes. Em contraste, não foram observadas alterações significativas nos níveis de succinato e de 2-oxoglutarato. Registre-se que reduções gradativas nos níveis de ascorbato e desidroascorbato foram observadas em acordo com a redução endógena de GAs (Koornneef et al., 1990) (Figura 10B).

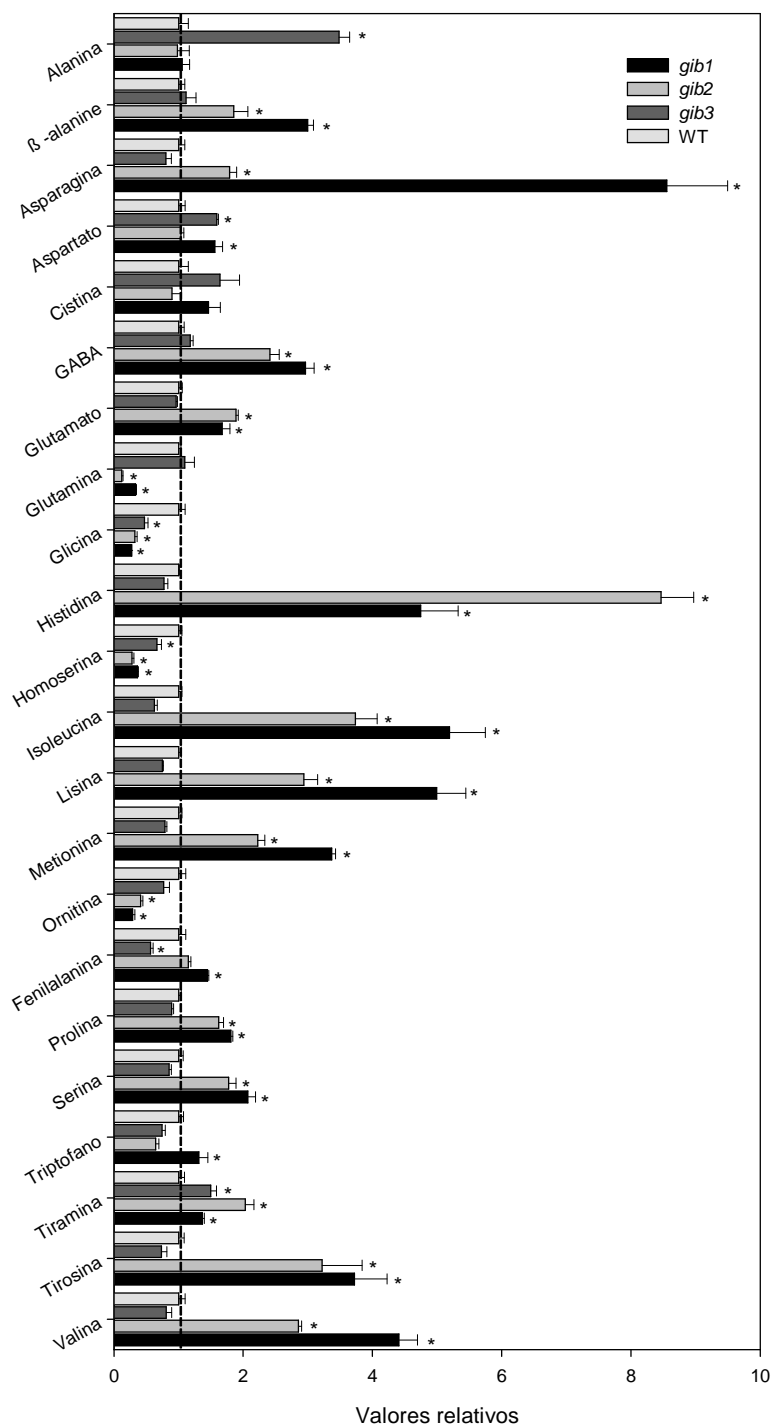


Figura 9: Variação no conteúdo de aminoácidos em respostas a variações endógenas no conteúdo de GAs. Os dados obtidos foram normalizados em relação a resposta média calculada para o genótipo WT e para possibilitar análises estatísticas, repetições foram individualmente normalizadas. Valores representam a média de valores relativos \pm EP de pelos menos 5 plantas independentes. Asteriscos indicam diferenças significativas dos mutantes (*gib3*, *gib2* e *gib1*) em relação ao WT ($P < 0.05$) segundo o teste F.

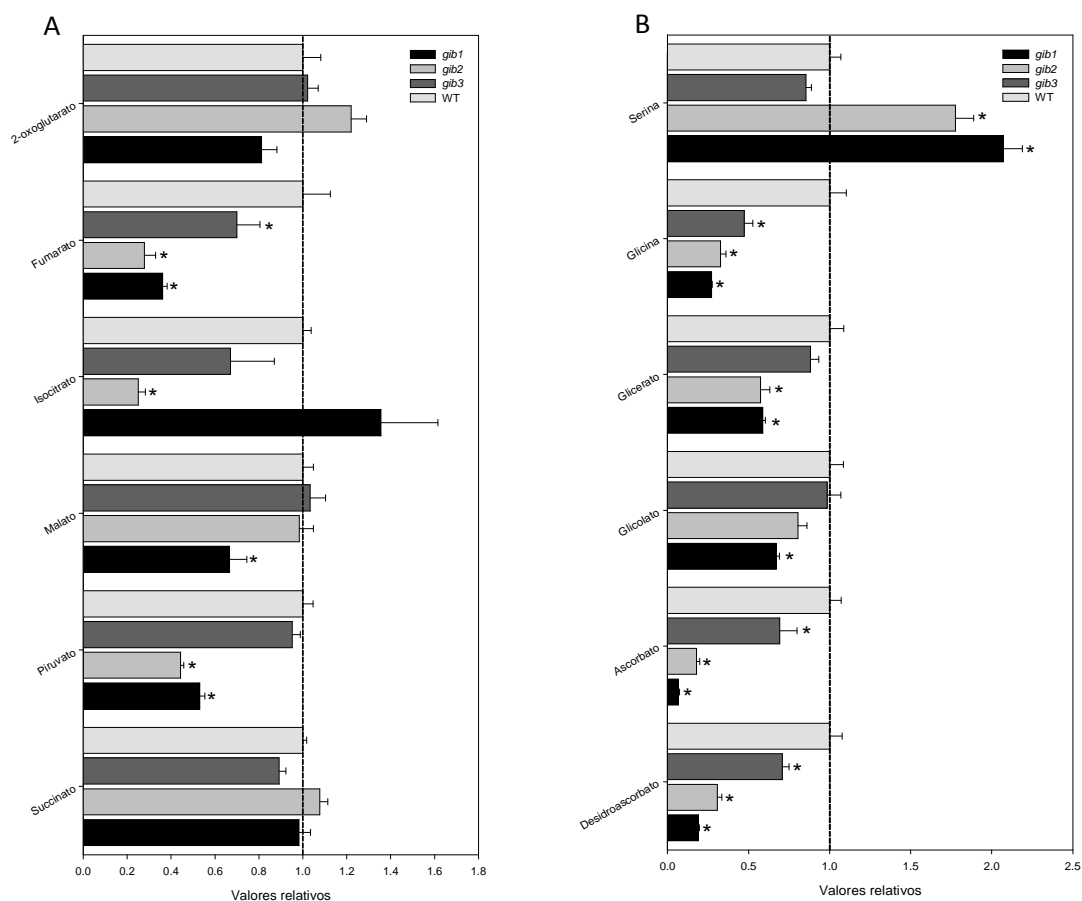


Figura 10: Variação no conteúdo de ácidos orgânicos do TCA (A), assim como de ácido orgânicos e aminoácidos relacionados à fotorrespiração e sistema antioxidante (B) em respostas a variações endógenas no conteúdo de GAs. Estatística e abreviaturas como descrita na Figura 9.

Os níveis de glicose e frutose foram significativamente reduzidos nos mutantes *gib1* e *gib2* (Figura 11), ao passo que os níveis de gentiobiose reduziram apenas no mutante *gib1*. Reduções gradativas nos níveis de trealose foram observadas, acompanhando a redução endógena no nível de GAs. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de sacarose nos mutantes em relação aos do controle, enquanto os teores de glicose-6-fosfato aumentaram significativamente em todos os mutantes (Figura 11).

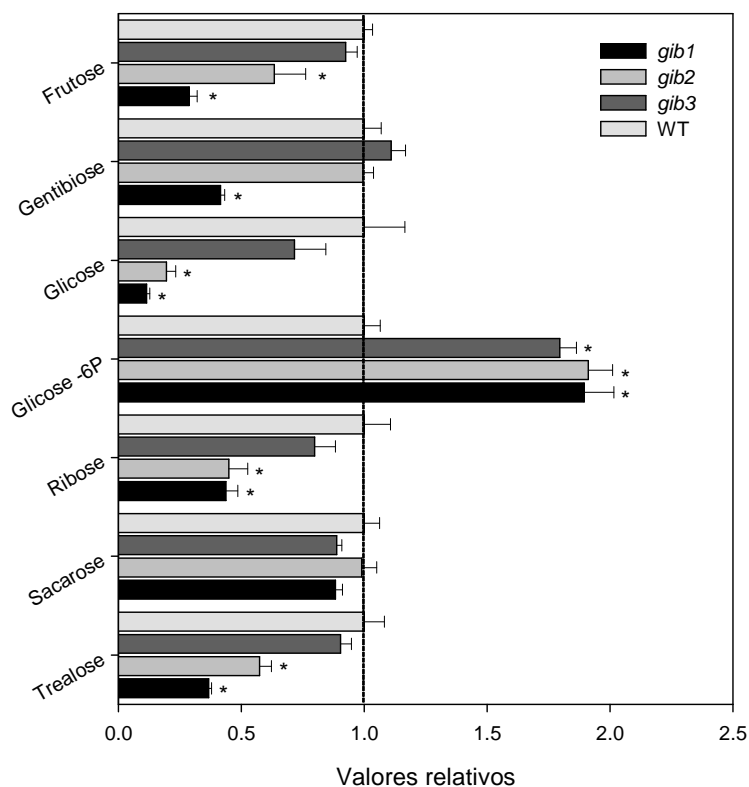


Figura 11: Variação no conteúdo de açúcares em respostas a variações endógenas no conteúdo de GAs. Estatística e abreviaturas como descritas na Figura 9.

2.4) Discussão

Considerando-se que os efeitos da manipulação nos níveis endógenos de GAs são ainda pouco entendidos, neste trabalho procurou-se abordar, em uma espécie de interesse agrônomo, a influência de alterações nos níveis endógenos de GAs no metabolismo e no crescimento de maneira geral. Sabe-se que as GAs estão diretamente envolvidas no crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo o alongamento dos entrenós (Hedden & Kamiya, 1997). Assim, os mutantes *gib2* e *gib1* (medianamente e extremamente deficientes na biossíntese de GAs, respectivamente) apresentaram menores taxas de crescimento em altura, sendo, portanto, consideravelmente diferentes dos genótipos *gib3* (mutante moderadamente deficiente na biossíntese de GAs) e WT

para a grande maioria dos parâmetros de crescimento avaliados (Figura 2). Alterações morfológicas semelhantes foram também observadas em plantas de soja (Suo et al., 2012) e tomate (Li et al., 2012) superexpressando o fator de transcrição *AtDREB1A*, assim como em monocotiledôneas da família *Liliaceae* com superexpressão do gene *GA2ox* (Otani et al., 2013). No entanto, as diferenças aqui observadas não foram acompanhadas por alterações na razão raiz:parte aérea (Figura 2H). Tomados em conjunto, estes resultados confirmam o papel das GAs como agentes reguladores do crescimento em plantas superiores, embora não suportem a hipótese de que altas taxas de crescimento estejam diretamente associadas a diferenças na alocação de biomassa (Reich et al., 1998). Cumpre mencionar também que o menor crescimento observado nesse trabalho (Figuras 1 e 2) não esteve associado a menores taxas fotossintéticas por unidade de área foliar (Figura 3A). Registre-se, que o crescimento lento observado anteriormente nesses mesmos genótipos mutantes (Nagel & Lambers, 2002) não esteve associado à variações das taxas de fotossíntese por unidade de área foliar e nem na fração de biomassa presente em folhas (razão de massa foliar), mas sim a uma menor área foliar específica (AFE) apresentada em relação à do WT. Esses resultados, distintos dos previamente encontrados (Nagel & Lambers, 2002), podem ter ocorrido em função das condições de crescimento (ambientais e nutricionais), assim como dos métodos de análise. Em ambos os trabalhos, no entanto, observou-se que menores taxas de crescimento não estão associadas a limitações as taxas fotossintéticas, sugerindo que mecanismos outros sejam os principais responsáveis pela alteração no padrão de crescimento observado em resposta a flutuações endógenas nos níveis de GAs.

Embora diferenças nas taxas fotossintéticas tenham sido observadas (Figura 3) a variação do conteúdo de GA pouco, ou nada, afetou o aparato fotossintético, uma vez que não foram observadas diferenças na razão F_v/F_m entre os genótipos (Figura 3E). Por

outro lado, as variações encontradas em trocas gasosas (Figura 3) são consistentes com as variações encontradas em DE e AE (Figuras 6A e 6B, respectivamente). Assim, plantas com menores conteúdos de GAs apresentaram maiores valores de DE e AE, o que de certa forma corrobora as maiores A_N , g_s , C_i e E (Figuras 3A, 3C, 3D e 3F, respectivamente) por unidade de área. De forma semelhante, maiores DE foram observadas em plantas de tomate com baixo conteúdo de GAs causada pela superexpressão do fator de transcrição *DREB* (DREB: proteínas ligadas a elementos responsivos a desidratação), embora essas plantas apresentem menores taxas transpiratórias (Li et al., 2012). Tomados em conjunto, os resultados do presente trabalho indicam que as alterações ocasionadas pela alteração nos níveis de GAs não apresentam um padrão de resposta claramente definido no que diz respeito a transpiração e a eficiência no uso da água. Registre-se, no entanto que essas alterações em DE e AE assim como em E observadas sob condições ótimas de cultivo, como as do presente trabalho, devem ser prejudiciais sob condições estressantes. Assim, futuros estudos devem se concentrar também nos efeitos da manipulação de GAs não apenas sob condições ótimas de cultivo, mas também sob condições sub-ótimas. Essas alterações devem ter impactos não apenas sobre o metabolismo fotossintético, mas também mitocondrial, como recentemente reconhecido (Araújo et al., 2013). Salienta-se também que, embora estudos diversos demonstrem que a alteração nos níveis ou na rota de sinalização de GAs afeta a resposta de plantas a estresses abióticos, incluindo seca e salinidade (Magome et al., 2004; Achard et al., 2006; Shan et al., 2007; Li et al., 2012), o mecanismo associado a essa resposta não foi ainda completamente elucidado. Os resultados aqui apresentados também fornecem uma relação positiva entre A_N (Figura 3A) e a razão Chl a/b (Figura 7B). É plausível sugerir que plantas com reduzido teor de GA expandem menos suas folhas, provocando assim uma concentração dos pigmentos

fotossintetizantes por unidade de massa. Resultados similares foram também observados em plantas de tomate superexpressando o gene *AtGAMT1*, que codifica uma enzima que catalisa a metilação de GAs bioativas tornando-as inativas (Nir et al., 2013). De fato, Ribeiro e co-autores demonstraram que vários dos genes envolvidos nas vias biossintéticas de GAs sofrem aumentos na quantidade de mRNA produzido em resposta a redução na quantidade de GA após a aplicação de paclobutrazol, sem um aumento associado nos níveis de proteínas/enzimas (Ribeiro et al., 2012b). Embora esses resultados sugiram que um considerável tamponamento da expressão gênica em resposta a flutuações nos níveis de GAs seja possível, os resultados aqui obtidos não permitem excluir a hipótese de alterações no padrão de expressão de genes envolvidos com a biossíntese e sinalização de GAs.

Com o intuito de investigar como a alteração endógena de GA afeta o metabolismo primário, um perfil metabólico e uma gama de compostos foram determinados. A grande maioria dos metabólitos associados ao metabolismo do carbono (Figura 8A a 8F) foi reduzida em plantas com menores conteúdos de GAs (*gib2* e *gib1*), contrastando, assim com as maiores taxas fotossintéticas apresentadas por essas plantas (Figura 3A). Embora o crescimento foliar seja reconhecidamente dependente da disponibilidade de carbono (Wiese et al., 2007; Pantin et al., 2011), a redução nos níveis de GAs foi acompanhada por reduções nos teores de amido e açúcares, assim como dos ácidos orgânicos malato e fumarato (Figura 9). Não obstante as pequenas alterações observadas nos teores de nitrato, menores níveis de aminoácidos acoplados a maiores concentrações de proteínas foram observadas. Concomitantemente, estes dados indicam que GAs são capazes de regular não apenas o crescimento, mas também de redirecionar o metabolismo de carbono com impactos no metabolismo do nitrogênio. Registre-se, no entanto, que pequenas variações nas atividades catalíticas máximas de importantes

enzimas do metabolismo fotossintético, respiratório e do nitrogênio foram observadas em resposta a variações artificiais nos níveis de GAs (Capítulo II). Cumpre mencionar que o metabolismo do carbono (fotossíntese, catabolismo e alocação) são altamente regulados via *feedback* pela sinalização por açúcares. De forma geral, a atividade de forças fonte, tais como a fotossíntese, a mobilização de nutrientes e de exportação são positivamente reguladas sob condições de baixo conteúdo de açúcares, ao passo as atividades-dreno como crescimento e armazenamento, são positivamente reguladas quando as fontes de carbono são abundantemente disponíveis (Paul & Foyer, 2001; Rolland et al., 2006). Nesse contexto, a sacarose, principal açúcar transportado nas plantas (Rolland et al., 2006), não diferiu entre os genótipos analisados (Figura 8C) indicando assim que os menores teores de hexoses (Figuras 8A e 8B) não foram consequência de uma maior força dreno (acúmulo de amido, Figura 8D) mas provavelmente associados a um desbalanço metabólico e/ou energético em resposta a menores níveis de GAs. Em adição, considerando que o amido é uma forma transitória de armazenamento de carbono que se acumula nas folhas durante o dia e é remobilizado para suportar o crescimento e metabolismo durante a noite (Smith & Stitt, 2007; Stitt & Zeeman, 2012), menores níveis de amido, mesmo em plantas com maiores taxas fotossintéticas, fornecem fortes indícios de que alterações nos níveis de GAs ocasionem um desbalanço acentuado entre crescimento e metabolismo de carbono.

As maiores A_N observadas neste trabalho foram acompanhadas por maiores R_d (Figura 3A); contudo, possivelmente essa maior produção de energia na forma de ATPs não se traduziu em produção e acúmulo de biomassa, indicando um possível desvio de energia e/ou metabólitos para outras rotas. De modo interessante, incrementos nesses processos (A_N e R_d) foram acompanhados por reduções nas concentrações de aminoácidos totais (Figura 8H) e aumento na concentração de proteínas (Figura 8I).

Adicionalmente, maiores conteúdos de proteínas foram observados em plantas com menores conteúdos de amido, um indicativo que os esqueletos de carbono estão sendo desviados para a assimilação do nitrogênio, garantindo assim níveis semelhantes de nitrato (Figura 8G). Ressalta-se que tanto o crescimento como o desenvolvimento vegetal são extremamente dependentes da interação existente entre os metabolismos do C e N (Nunes-Nesi et al., 2010) e, assim, as alterações observadas no que diz respeito ao crescimento devem estar associadas as alterações no perfil metabólico. Ademais, as alterações observadas no perfil metabólico dessas plantas explicam, ao menos parcialmente, um desvio energético em resposta a alterações nos níveis de GAs. Assim, as flutuações observadas na concentração de aminoácidos (Figura 9), justificariam uma maior concentração de proteínas encontrada nos mutantes *gib2* e *gib1* (Figura 8I). Registre-se que os custos energéticos associados à síntese protéica são consideráveis e, portanto, ajustes diurnos tanto no metabolismo de aminoácidos quanto na síntese protéica devem ser essenciais para garantir que esqueletos de carbono e custos respiratórios sejam mantidos durante o período noturno e redirecionados para o crescimento (Piques et al., 2009).

Incrementos consideráveis em serina e reduções em glicina (Figura 10B), aminoácidos intermediários do processo fotorrespiratório, foram observados. Entretanto, esse potencial mecanismo dissipador do excesso de energia que está sendo gerado em forma de poder redutor pela fotossíntese não está provavelmente associado as respostas observadas, uma vez que (i) maiores taxas fotossintéticas foram observadas nessas plantas e (ii) que o acúmulo de um desses aminoácidos é possível indício de ocorrência limitada de fotorrespiração. Cumpre mencionar que o excesso de poder redutor quando não dissipado pode ocasionar a geração de espécies reativas de oxigênio em nível de PSI e /ou promover a fotoinibição, processo este devido a uma excessiva

redução da Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE). Contudo, não foi observada a ocorrência de danos no aparato fotossintético em nenhum dos genótipos avaliados, uma vez os valores apresentados por F_v/F_m são condizentes aos de uma plantas sadia (Björkman & Demmig, 1987). Outro indicativo da não ocorrência de estresse é a redução nos níveis de ascorbato e desidroascorbato (Figura 10B), substrato e produto, respectivamente, de uma importante enzima do sistema antioxidativo das plantas, a ascorbato peroxidase (APX) (Cakmak & Horst, 1991; Resende et al., 2003). Em adição, o incremento no conteúdo de proteínas não foi acompanhado por grandes variações no conteúdo de alguns metabólitos intermediários do ciclo TCA (Figura 10A) que poderiam ser desviados para a síntese de aminoácidos, culminando com maior conteúdo de proteínas. Entretanto, maior R_d associado a um possível aumento da atividade da via oxidativa das pentoses fosfatos (OxPPP) ocasionaria incrementos em glicose-6P, frutose-6P e glicose-1P (Figura 11) como observado em plantas com redução nos níveis de GAs. Concomitantemente, estes resultados indicam uma extensiva reprogramação metabólica em resposta a alterações endógenas nos níveis de GAs.

Registre-se também que a redução no pool de aminoácidos (Figuras 8 e 9) associada à manutenção nos níveis de nitrato (Figura 8G) e de 2-oxoglutarato (Figura 10A), com alterações nos níveis de malato e fumarato (Figuras 8E e F) e em R_d , fornecem indicativos de um importante papel das GAs na regulação e controle do metabolismo mitocondrial e do nitrogênio (Araújo et al., 2012; Ribeiro et al., 2012a). Importante mencionar que a manutenção de maiores taxas respiratórias não deve ter ocorrido a expensas de incrementos em vias respiratórias alternativas como fonte de elétrons para a cadeia de transporte de elétrons (Araújo et al., 2010; Araújo et al., 2011), como observado pelos maiores teores de aminoácidos de cadeia ramificada (*e.g.* isoleucina, lisina e valina; Figura 9). Os resultados metabólicos juntamente com os de

R_d indicam que a inibição do crescimento causada pela redução nos níveis de GAs promove uma extensiva reorganização metabólica, associada com a possível ocorrência de fluxos não cíclicos no ciclo TCA e uma regulação positiva do desvio metabólico do aminoácido não proteico GABA (discutido abaixo).

As alterações observadas no perfil metabólico fornecem evidências complementares para o papel das GAs na reorganização metabólica, como pode ser deduzido pelas alterações nos níveis de açúcares e intermediários do ciclo TCA, assim como um aumento compensatório observado nos níveis de GABA de forma a garantir a manutenção do ciclo, como observado pela manutenção nos níveis de succinato. Registre-se, no entanto, que tal resposta compensatória promove mudanças significativas nos níveis de aminoácidos. Os resultados ora apresentados sugerem também que as GAs desempenhariam um importante papel em modular o fluxo de 2-oxoglutarato para o metabolismo de aminoácidos, o que é suportado pela resposta diferencial de diversos aminoácidos, incluindo aqueles derivados do 2-oxoglutarato (prolina, ornitina, glutamato e glutamina) confirmando uma forte regulação metabólica existente na coordenação do metabolismo de aminoácidos em plantas (Foyer et al., 2003; Zhu & Galili, 2003; Sweetlove & Fernie, 2005; Gu et al., 2010; Araújo et al., 2011). Os resultados gerados no perfil suportam a importância do desvio metabólico do GABA (Fait et al., 2008), sendo semelhantes a outros reportados em plantas (Araújo et al., 2008) e em neurônios (Santos et al., 2006; Shi et al., 2009). Assim, embora a natureza precisa dessa recorrente interação entre o metabolismo energético e controle do crescimento mediado pelas GAs não foi completamente elucidada neste trabalho, abrem-se excitantes oportunidades para pesquisas futuras nesse tópico.

Tomados em conjunto, os resultados do presente trabalho apresentam fortes indícios de que a redução endógena de GAs afeta sobremodo o crescimento em plantas

de tomate. As mudanças encontradas não foram associadas as limitações difusivas e/ou bioquímicas devido a pouca ou nenhuma alteração observada na razão F_v/F_m , assim como nos parâmetros derivados das curvas A_N/C_i e A_N/C_c . Os dados de trocas gasosas tiveram estreita relação com as adaptações anatômicas/morfológicas decorrentes da redução dos teores de GAs. Ademais, mudanças metabólicas indicam um desbalanço entre crescimento e metabolismo do carbono em detrimento do metabolismo do nitrogênio, indicando um possível desvio de energia para outras rotas metabólicas. Contudo, estudos metabólicos mais aprofundados, assim como estudos moleculares ainda serão necessários para uma melhor compreensão do efeito da redução do nível endógeno de GAs sobre o metabolismo dessas plantas. Consideradas em conjunto, as informações obtidas com o presente trabalho levarão a uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos e metabólicos associados à deficiência de GAs em plantas.

2.5) Referências

- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP** (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**: 91-94
- Araújo W, Nunes-Nesi A, Fernie A** (2013) On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions. *Photosynth Res* DOI: 10.1007/s11120-11013-19807-11124
- Araújo WL, Ishizaki K, Nunes-Nesi A, Larson TR, Tohge T, Krahnert I, Witt S, Obata T, Schauer N, Graham IA, Leaver CJ, Fernie AR** (2010) Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of *Arabidopsis* mitochondria. *Plant Cell* **22**: 1549-1563
- Araújo WL, Nunes-Nesi A, Trenkamp S, Bunik VI, Fernie AR** (2008) Inhibition of 2-oxoglutarate dehydrogenase in potato tuber suggests the enzyme is limiting for

- respiration and confirms its importance in nitrogen assimilation. *Plant Physiol* **148**: 1782-1796
- Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR** (2011) Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends Plant Sci* **16**: 489-498
- Araújo WL, Tohge T, Osorio S, Lohse M, Balbo I, Krahnert I, Sienkiewicz-Porzucek A, Usadel B, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2012) Antisense inhibition of the 2-Oxoglutarate dehydrogenase complex in tomato demonstrates its importance for plant respiration and during leaf senescence and fruit maturation. *Plant Cell* **24**: 2328-2351
- Atkin OK, Botman B, Lambers H** (1996) The causes of inherently slow growth in alpine plants: an analysis based on the underlying carbon economies of alpine and lowland *Poa* species. *Funct Ecol* **10**: 698-707
- Bensen RJ, Zeevaart JAD** (1990) Comparison of ent-kaurene synthetase A and B activities in cell-free extracts from young tomato fruits of wild-type and gib-1, gib-2, and gib-3 tomato plants. *Plant Growth Reg* **9**: 237-242
- Berger D, Altmann T** (2000) A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **14**: 1119-1131
- Bermúdez MA, Galmés J, Moreno I, Mullineaux P, Gotor C, Romero LC** (2012) Photosynthetic adaptation to length of day is dependent on S-sulfocysteine synthase activity in the thylakoid lumen. *Plant Physiol* **160**: 274-278
- Bernacchi CJ, Singaas EL, Pimentel C, Portis Jr AR, Long SP** (2001) Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. *Plant Cell Environ* **24**: 253-259
- Björkman O, Demmig B** (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**: 489-504
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254

- Cakmak I, Horst WJ** (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol Plant* **83**: 463-468
- Cowling RJ, Kamiya Y, Seto H, Harberd NP** (1998) Gibberellin dose-response regulation of GA4 gene transcript levels in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **117**: 1195-1203
- DaMatta F, Loos R, Silva E, Loureiro M, Ducatti C** (2002) Effects of soil water deficit and nitrogen nutrition on water relations and photosynthesis of pot-grown *Coffea canephora* Pierre. *Trees* **16**: 555-558
- Davière J-M, Achard P** (2013) Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**: 1147-1151
- Fait A, Hanhineva K, Beleggia R, Dai N, Rogachev I, Nikiforova VJ, Fernie AR, Aharoni A** (2008) Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. *Plant Physiol* **148**: 730-750
- Fernie AR, Aharoni A, Willmitzer L, Stitt M, Tohge T, Kopka J, Carroll AJ, Saito K, Fraser PD, DeLuca V** (2011) Recommendations for reporting metabolite data. *Plant Cell* **23**: 2477-2482
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ** (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* **212**: 250-263
- Foyer CH, Parry M, Noctor G** (2003) Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J Exp Bot* **54**: 585-593
- Galmés J, Medrano H, Flexas J** (2006) Acclimation of Rubisco specificity factor to drought in tobacco: discrepancies between in vitro and in vivo estimations. *J Exp Bot* **57**: 3659-3667
- Gu Y, Fetsch CR, Adeyemo B, Deangelis GC, Angelaki DE** (2010) Decoding of MSTd population activity accounts for variations in the precision of heading perception. *Neuron* **66**: 596-609
- Halevy AH** (1964) Effects of gibberellin and growth-retarding chemicals on respiration and catalase activity in various organs of cucumber seedlings. *J Exp Bot* **15**: 546-555
- Harberd NP** (2009) Botany relieving DELLA restraint. *Science* **299**: 1853-1854

- Harley PC, Loreto F, Di Marco G, Sharkey TD** (1992) Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO₂ flux by analysis of the response of photosynthesis to CO₂. *Plant Physiol* **98**: 1429-1436
- Hedden P** (2003) The genes of the Green Revolution. *Trends in Genetics* **19**: 5-9
- Hedden P, Kamiya Y** (1997) GIBBERELLIN BIOSYNTHESIS: enzymes, genes and their regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 431-460
- Jan A, Nakamura H, Handa H, Ichikawa H, Matsumoto H, Komatsu S** (2006) Gibberellin regulates mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity in rice. *Plant Cell Physiol* **47**: 244-253
- Kato J** (1956) Effect of gibberellin elongation, water uptake, and respiration of pea stem sections. *Science* **123**: 1132- 1132
- Koornneef M, Bosma TDG, Hanhart CJ, van der Veen JH, Zeevaart JAD** (1990) The isolation and characterization of gibberellin-deficient mutants in tomato. *Theor Appl Gen* **80**: 852-857
- Li J, Sima W, Ouyang B, Wang T, Ziaf K, Luo Z, Liu L, Li H, Chen M, Huang Y, Feng Y, Hao Y, Ye Z** (2012) Tomato SIDREB gene restricts leaf expansion and internode elongation by downregulating key genes for gibberellin biosynthesis. *J Exp Bot* **63**: 6407-6420
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME** (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ Exp Bot* **47**: 239-247
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* **1**: 387-396
- Long M, Betrán E, Thornton K, Wang W** (2003) The origin of new genes: glimpses from the young and old. *Nat Rev Genet* **4**: 865-875
- Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J** (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* **24**: 732-737
- Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, Kamiya Y, Oda K** (2004) dwarf and delayed-flowering 1, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant J* **37**: 720-729

- Monna L, Kitazawa N, Yoshino R, Suzuki J, Masuda H, Maehara Y, Tanji M, Sato M, Nasu S, Minobe Y** (2002) Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: rice “green revolution gene” encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res* **9**: 11-17
- Nagel OW, Lambers H** (2002) Changes in the acquisition and partitioning of carbon and nitrogen in the gibberellin-deficient mutants A70 and W335 of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Cell Environ* **25**: 883-891
- Nir I, Moshelion M, Weiss D** (2013) The *Arabidopsis* GIBBERELLIN METHYLTRANSFERASE 1 suppresses gibberellin activity, reduces whole-plant transpiration and promotes drought tolerance in transgenic tomato. *Plant Cell Environ* DOI: 10.1111/pce.12135
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J* **50**: 1096-1106
- Nunes-Nesi A, Fernie AR, Stitt M** (2010) Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Mol Plant* **3**: 973-996
- Otani M, Meguro S, Gondaira H, Hayashi M, Saito M, Han D-S, Inthima P, Supaibulwatana K, Mori S, Jikumaru Y, Kamiya Y, Li T, Niki T, Nishijima T, Koshioka M, Nakano M** (2013) Overexpression of the gibberellin 2-oxidase gene from *Torenia fournieri* induces dwarf phenotypes in the liliaceous monocotyledon *Tricyrtis* sp. *J Plant Physiol* **170**: 1416-1423
- Pantin F, Simonneau T, Rolland G, Dauzat M, Muller B** (2011) Control of leaf expansion: a developmental switch from metabolics to hydraulics. *Plant Physiol* **156**: 803-815
- Paul MJ, Foyer CH** (2001) Sink regulation of photosynthesis. *J Exp Bot* **52**: 1383-1400
- Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, Beales J, Fish LJ, Worland AJ, Pelica F, Sudhakar D, Christou P, Snape JW, Gale MD, Harberd NP** (1999) 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**: 256-261

- Piques M, Schulze WX, Höhne M, Usadel B, Gibon Y, Rohwer J, Stitt M** (2009) Ribosome and transcript copy numbers, polysome occupancy and enzyme dynamics in *Arabidopsis*. *Mol Syst Biol* **5**: 314
- Poorter H, Remkes C, Lambers H** (1990) Carbon and nitrogen economy of 24 wild species differing in relative growth rate. *Plant Physiol* **94**: 621-627
- Porra R, Thompson W, Kriedemann P** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **975**: 384-394
- Reich PB, Tjoelker MG, Walters MB, Vanderklein DW, Buschena C** (1998) Close association of RGR, leaf and root morphology, seed mass and shade tolerance in seedlings of nine boreal tree species grown in high and low light. *Funct Ecol* **12**: 327-338
- Resende MLV, Salgado SML, Chaves ZM** (2003) Espécies reativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatol Bras* **28**: 123-130
- Ribeiro DM, Araújo WL, Fernie AR, Schippers JHM, Mueller-Roeber B** (2012a) Action of gibberellins on growth and metabolism of *Arabidopsis* plants associated with high concentration of carbon dioxide. *Plant Physiol* **160**: 1781-1794
- Ribeiro DM, Araújo WL, Fernie AR, Schippers JHM, Mueller-Roeber B** (2012b) Translatome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **63**: 2769-2786
- Richards DE, King KE, Ait-Ali T, Harberd NP** (2001) How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 67-88
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 675-709
- Sánchez-Rodríguez C, Rubio-Somoza I, Sibout R, Persson S** (2010) Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. *Trends Plant Sci* **15**: 291-301
- Santos SS, Gibson GE, Cooper AJL, Denton TT, Thompson CM, Bunik VI, Alves PM, Sonnewald U** (2006) Inhibitors of the α -ketoglutarate dehydrogenase

- complex alter [1-13C]glucose and [U-13C]glutamate metabolism in cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* **83**: 450-458
- Shan D, Huang J, Yang Y, Guo Y, Wu C, Yang G, Gao Z, Zheng C** (2007) Cotton GhDREB1 increases plant tolerance to low temperature and is negatively regulated by gibberellic acid. *New Phytol* **176**: 70-81
- Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singsaas EL** (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant Cell Environ* **30**: 1035-1040
- Shi Q, Risa A, Sonnewald U, Gibson GE** (2009) Mild reduction in the activity of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex elevates GABA shunt and glycolysis. *J Neurochem* **109 Suppl 1**: 214-221
- Sienkiewicz-Porzupek A, Nunes-Nesi A, Sulpice R, Lisec J, Centeno DC, Carillo P, Leisse A, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR** (2008) Mild reductions in mitochondrial citrate synthase activity result in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on photosynthetic performance or growth. *Plant Physiol* **147**: 115-127
- Smith AM, Stitt M** (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* **30**: 1126-1149
- Spielmeier W, Ellis MH, Chandler PM** (2002) Semidwarf (sd-1), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9043-9048
- Stitt M, Zeeman SC** (2012) Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 282-292
- Suo H, Ma Q, Ye K, Yang C, Tang Y, Hao J, Zhang ZJ, Chen M, Feng Y, Nian H** (2012) Overexpression of AtDREB1A causes a severe dwarf phenotype by decreasing endogenous gibberellin levels in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plos One* **DOI**: 10.1111/pce.12135
- Sweetlove LJ, Fernie AR** (2005) Regulation of metabolic networks: understanding metabolic complexity in the systems biology era. *New Phytol* **168**: 9-24
- Szalai I, Nagy M, Heifrich M** (1975) What is possible role of gibberellin in breaking of potato dormancy.1.physiological-effects of GA3 on carbohydrate-metabolism, amylase activity and respiration in strouting potato. *Acta Agron Acad Sci Hungaricae* **24**: 335-342

- Van Der Werf A, van Nuenen M, Visser AJ, Lambers H** (1993) Effects of N-supply on the rates of photosynthesis and shoot and root respiration of inherently fast- and slow-growing monocotyledonous species. *Physiol Plant* **89**: 563-569
- von Caemmerer S** (2000) *Biochemical models of leaf photosynthesis* Victoria, Australia: CSIRO Publishing: 165p
- Von Groll U, Berger D, Altmann T** (2002) The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during *Arabidopsis* stomatal development. *Plant Cell* **14**: 1527-1539
- Wang Y, Deng D, Ding H, Xu X, Zhang R, Wang S, Bian Y, Yin Z, Chen W** (2013) Gibberellin biosynthetic deficiency is responsible for maize dominant dwarf11(D11) mutant phenotype: physiological and transcriptomic evidence. *PloS One* doi: 10.1371/journal.pone.0066466
- Wang Y, Li J** (2008) Molecular basis of plant architecture. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 253-279
- Wiese A, Christ MM, Virnich O, Schurr U, Walter A** (2007) Spatio-temporal leaf growth patterns of *Arabidopsis thaliana* and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. *New Phytol* **174**: 752-761
- Yim KO, Kwon YW, Bayer DE** (1997) Growth Responses and allocation of assimilates of rice seedlings by paclobutrazol and gibberellin treatment. *J Plant Growth Reg* **16**: 35-41
- Zhu X, Galili G** (2003) Increased lysine synthesis coupled with a knockout of its catabolism synergistically boosts lysine content and also transregulates the metabolism of other amino acids in *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* **15**: 845-853

3 Capítulo II

Mudanças fisiológica, metabólica e anatômica em plantas de tomate com alterações nos níveis de giberelinas

3.1) Introdução

As giberelinas (GAs) são fitohormônios reconhecidamente capazes de controlar diversos processos tais como germinação, expansão foliar, alongamento do caule, florescimento e amadurecimento do fruto (Olszewski et al., 2002; Biemelt et al., 2004; Schwechheimer & Willige, 2008). Assim, em função de sua importância, a via biossintética das GAs tem sido elucidada pela combinação de abordagens bioquímicas e genéticas. Sabe-se atualmente que os primeiros passos da via, iniciando pelo geranylgeranyl difosfato (GGPP) até o GA₁₂-aldeído, são comuns a todas as espécies (Weiss & Ori, 2007). Contudo, os passos finais, que culminam com a formação de GAs bioativas, são altamente específicos, e na maioria dos casos requerem a atividade das enzimas GA20ox e GA3ox (Hedden & Thomas, 2012). Por outro lado, a enzima GA2ox atua na desativação dessas GAs mediante a β -hidroxilação do carbono 2 (Hedden & Thomas, 2012). Registre-se que a expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas nas últimas etapas da rota biossintética está sujeita a regulação pelas próprias GAs (Achard & Genschik, 2008). Durante os últimos anos, estudos envolvendo hormônios de crescimento e, em particular GAs, têm sido dominados pelo uso de plantas mutantes ou transgênicas e, assim, revelado uma grande quantidade de genes envolvidos tanto na síntese quanto no catabolismo e na sinalização de GAs (Araújo & Fernie, 2012). Entretanto, embora muitos dos componentes da rede de biossíntese e sinalização desse fitohormônio tenham sido identificados, pouco ou nada se sabe acerca dos precisos mecanismos pelos quais as GAs são capazes de regular o crescimento e

desenvolvimento *per se*. Neste contexto, estudos básicos relacionando alterações nos níveis endógenos de GAs aos seus efeitos no metabolismo são bastante escassos. Verifica-se, entretanto, que, apesar de muitos genes, incluindo vários relacionados ao metabolismo primário e secundário, serem regulados pela ação das GAs (Yamaguchi, 2008), apenas em alguns casos essa regulação tem efeito significativo sobre o metabolismo primário (Ribeiro et al., 2012b). Em adição, a recente investigação em nível molecular das mudanças em transcritos e metabólitos demonstrou que a redução nos níveis de GAs afeta o crescimento, particularmente por desacoplá-lo da disponibilidade de carbono (Ribeiro et al., 2012b).

Embora intensivos esforços venham sendo devotados à elucidação das funções fisiológicas dos vários genes regulados pelas GAs (Yamaguchi, 2008), estudos investigando os efeitos de GAs sobre o metabolismo energético e expressão gênica associados ao crescimento são relativamente raros. No entanto, as GAs parecem ser responsáveis pelo aumento na expressão da isoforma 1 da cinase da piruvato desidrogenase (PDK1) (Jan et al., 2006), uma enzima-chave na regulação negativa da atividade do complexo enzimático mitocondrial piruvato desidrogenase (PDH). Dessa forma, as GAs poderiam influenciar diretamente o processo respiratório atuando sobre a principal entrada de carbono do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) em tecidos autotróficos. Suporte para essa hipótese foi recentemente obtido em outro estudo correlacionando o conteúdo de GAs ao processo respiratório (Araújo et al., 2012). Nesse caso em particular, reduções na expressão de uma enzima do ciclo TCA, a 2-oxoglutarato desidrogenase (OGDH) em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), foram associadas a reduções na expressão de genes responsivos a GAs, além das dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato. De forma interessante, a expressão dos transcritos para GA2ox4 e GA3-β-hidroxilase 3 (G3BH3) foi significativamente reduzida, acarretando uma diminuição drástica (60%) no conteúdo de GA₃ em relação

ao tipo selvagem (Araújo et al., 2012). Uma possível explicação para tal efeito é que a maioria das dioxigenases, incluindo todas as envolvidas na biossíntese de GAs, utilizam o 2-oxoglutarato como co-substrato (Hedden & Phillips, 2000), tornando esse ácido orgânico um composto-chave no metabolismo das GAs.

Plantas transgênicas de *Populus* superexpressando uma versão da proteína DELLA apresentaram um metabolismo celular completamente distinto daquele observado em plantas do tipo selvagem (Busov et al., 2006). Essa manipulação gênica alterou a taxa respiratória das raízes, reduzindo o fluxo de carbono para a rota de biossíntese de lignina, além de uma mudança no armazenamento de compostos de defesa na parte aérea, principalmente compostos ligados à rota dos fenilpropanóides. Em adição, plantas de tomate mutantes nas etapas iniciais da via biossintética de GAs W335 (*gib1*: mutante extremamente deficiente) e A70 (*gib3*: medianamente deficiente) foram avaliadas juntamente com plantas WT sob condições de limitação de nitrogênio (Nagel et al., 2001). Os mutantes apresentaram menor crescimento em altura e reduzida taxa de crescimento relativo em relação ao WT. Registre-se, no entanto, que a forte interação entre o suplemento de nitrogênio e a concentração de GAs anteriormente relatada (Krauss & Marschner, 1982) não foi observada. Utilizando-se dessas mesmas plantas (*gib3* e *gib1*), a aquisição e partição de carbono e nitrogênio foram avaliadas (Nagel & Lambers, 2002). Esses autores concluíram que a taxa de crescimento relativo assim como a área foliar específica, que são reduzidas nesses mutantes, estão sobre controle direto das GAs. Em adição, plantas de soja e tomate mutantes superexpressando o fator de transcrição *AtDREB1* (Suo et al., 2012) e *SIDREB* (Li et al., 2012), respectivamente, tiveram menores conteúdos de GAs. Em plantas mutantes de tomate, a superexpressão de *SIDREB* (Li et al., 2012) ocasionou redução da expressão das enzimas CPS (*ent*-copalil difosfato sintase) e GA20ox (1, 2 e 4), enzimas-chave da rota de síntese de GA. Em função dessa menor expressão e, conseqüentemente menores

conteúdos de GAs, essas plantas transgênicas apresentaram reduções em altura e densidade estomática; em contrapartida, apresentaram uma maior espessura foliar. O nível de expressão das demais enzimas da via também foram quantificados, e assim, a KS (*ent*-caureno sintase) e GA3ox, subsequentes a CPS e GA20ox, respectivamente, tiveram incrementos na expressão. Tomados em conjunto, esses dados sugerem que, mesmo em condições de baixa disponibilidade de GAs, as plantas se mantêm em “estado de alerta” para uma possível regeneração da via ou retorno a concentrações ótimas de GAs.

Em plantas de soja superexpressando *AtDREBI* (Suo et al., 2012), verificou-se uma redução no conteúdo de GAs em função do aumento nos transcritos da enzima GA2ox, culminando em plantas com reduções em altura, área foliar, tamanho do grão e, curiosamente, em maior tolerância ao herbicida Glufosinate (Suo et al., 2012). Cumpre mencionar que o local e modo de ação, assim como o mecanismo de resistência não foram completamente esclarecidos (Suo et al., 2012). Entretanto a associação entre menores conteúdos de GAs e aumento da tolerância a estresses em plantas mutantes não é sem precedente na literatura (Achard et al., 2008; Tuna et al., 2008; Nir et al., 2013). Assim, aceita-se atualmente, que hormônios, e em particular as GAs, não somente exercem um controle intrínseco sobre o crescimento, mas também medeiam a adaptação do desenvolvimento vegetal a flutuações nas condições ambientes (Wolters & Jürgens, 2009).

O uso de substâncias inibidoras da biossíntese de GAs como ferramenta para um melhor entendimento do mecanismo de controle do metabolismo pelas GAs é amplamente reconhecido. Assim, o paclobutrazol (PBZ), um inibidor da KO (*ent*-caureno oxidase) tem sido bastante utilizado (Jiao et al., 1986; Almeida & Pereira, 1997; Berova & Zlatev, 2000; Jaleel et al., 2007; Ribeiro et al., 2012b; Ribeiro et al., 2012a). Recentemente, a aplicação exógena de GA₃ e/ou PBZ, em plantas de

Arabidopsis thaliana (Ribeiro et al., 2012b), promoveu um desacoplamento entre o crescimento e metabolismo primário, em particular o metabolismo do carbono e do nitrogênio, em condição de baixo conteúdo de GAs. Concomitantemente, os resultados discutidos acima levam a uma visão pontual de como as GAs poderiam controlar o metabolismo e, conseqüentemente, o crescimento. Todavia, permanece ainda uma lacuna sobre o papel global das GAs, uma vez que, até o momento, não são conhecidos exatamente os efeitos da manipulação nos níveis de GAs no metabolismo e no crescimento de plantas.

Embora avanços já tenham sido alcançados no que respeita à biossíntese e regulação das GAs, ainda há uma carência de informações concretas no que diz respeito ao seu envolvimento e/ou regulação no metabolismo primário das plantas. Ademais, resultados bastante interessantes e, em alguns casos, ainda não conclusivos, foram encontrados no Capítulo I. Em função disso, estudos complementares foram realizados com o intuito de se entender os mecanismos de resposta de plantas quando da variação artificial de GAs. Portanto, o presente trabalho objetivou: analisar o impacto da manipulação artificial nos níveis de GAs sobre o metabolismo primário de plantas de tomate cultivadas em solo suplementado com PBZ, para tanto, características fisiológicas, metabólicas e anatômicas foram analisadas. Tomadas em conjunto, as informações obtidas com o presente trabalho fornecem uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos e metabólicos associados à deficiência endógena ou artificial de GAs em plantas de tomate.

3.2) Material e métodos

O presente trabalho foi realizado na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) e no Laboratório de Nutrição e Metabolismo Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (20° 45'S, 42° 15' W), Viçosa, Minas

Gerais, Brasil. Foram utilizadas plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv Moneymaker) do tipo selvagem (WT) e mutante deficiente na biossíntese de GAs (*gib3*) gentilmente cedidas pelo Dr. M. Koornneef (Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany).

3.2.1) Material vegetal e condições de cultivo

As sementes de tomate do mutante *gib3* e WT foram germinadas em placas de Petri com duas camadas de papel filtro Whatman nº1 e embebidas com solução de GA (Duchefa, Haarlem, The Netherlands; GA₃ 50µM). A germinação das sementes foi realizada em câmara de crescimento (Forma Scientific, Inc, Ohio, EUA), sob fotoperíodo de 12 / 12 h (dia/noite), temperatura 25 / 16 °C (dia/noite), umidade relativa de 65 ± 5 % e intensidade de luz durante o período luminoso de 150 µmol m⁻² s⁻¹. Após sete dias, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo substrato e colocadas em casa de vegetação. Duas semanas após o transplante as plantas foram expostas a soluções de GA₃ e PBZ. A suspensão de PBZ (Duchefa, Haarlem, The Netherlands; 5,0 mg vaso⁻¹) foi distribuída na superfície do solo com o auxílio de uma pipeta. A primeira aplicação de GA₃ contendo 0.1 % (v/v) Tween 80, foi feita concomitantemente com a aplicação de PBZ, sendo realizada a cada dois dias durante três semanas, de modo a promover a reversão dos efeitos do PBZ, compondo assim os seguintes tratamentos: controle, GA, PBZ e PBZ+GA.

3.2.2) Quantificação dos parâmetros de crescimento

A altura, tomada do nível do solo até o nó apical superior, número total de folhas, ramos e entrenós das plantas, assim como o diâmetro do caule (tomado a um cm do solo), foram mensurados a cada dois dias. A área foliar total e específica, assim como a massa seca foram determinadas ao final do experimento, aos 42 dias após

transplântio DAT. As raízes, hastes e as folhas foram levadas a uma estufa de circulação forçada e mantidas a 70 °C, por 72 h, determinando-se então a massa seca de cada órgão. De posse da massa seca dos órgãos, determinou-se a alocação de matéria seca para os diversos constituintes da planta, além da razão raiz/parte aérea.

3.2.3) Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

A caracterização de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foi feita em folhas completamente expandidas de plantas, após 40 DAT, em casa de vegetação utilizando-se um analisador de gases a infravermelho em sistema aberto, acoplado um fluorômetro (IRGA, Li-cor Inc. LI-6400XT, Lincoln, EUA). A taxa de assimilação líquida do carbono (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração interna de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), fluorescência mínima (F_0), fluorescência máxima emitida (F_m) e os demais parâmetros relacionados à fluorescência foram determinados sob concentração controlada de CO_2 ($400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), irradiância ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com 10% de luz azul) e temperatura e vapor de água ambiente. Parâmetros relacionados à fluorescência foram estimados conforme previamente descrito (DaMatta et al., 2002; Lima et al., 2002). A taxa de respiração no escuro (R_d) foi determinada nas mesmas folhas supracitadas, por meio do equipamento já mencionado, após pelo menos 3 h de adaptação ao escuro.

3.2.4) Mensuração das propriedades ópticas

Mensurações das propriedades ópticas foliares foram feitas utilizando-se um sistema duplo de esferas integradas. Foi utilizada uma esfera integradora ISP-REF (OceanOptics, Inc., Dunedin, Florida, EUA), com uma fonte de luz embutida em combinação com uma esfera integradora FOIS-1 (OceanOptics) por fibra óptica. Ambas as esferas de integração são conectadas via fibra óptica de ondas curtas a um JAZ VIS

espectrorradiômetro NIR (OceanOptics), com uma resolução de cerca de 0,3 nm. Primeiramente, a reflectância (R) da folha foi medida com a esfera integradora ISP-REF e, em seguida, a transmitância (T) foi mensurada com a esfera FOIS-1. R e T, foram calculados usando o software SpectraSuite fornecido pelo fabricante. A absorvância (A) foi então calculada como $A = 1 - (R + T)$.

3.2.5) Anatomia

3.2.5.1) Características morfo-anatômicas da folha

As características anatômicas foliares foram examinadas avaliando-se as espessuras de: lâmina foliar; parênquimas paliçádico e lacunoso; epiderme nas faces abaxial e adaxial; além dos espaços intercelulares e área da nervura e do sistema vascular principal. Discos foliares retirados da região mediana da terceira folha completamente expandida, aos 42 DAT, foram fixados em FAA 50 (solução composta por formalina, ácido acético e álcool etílico), por 48 h e estocados em etanol 70 %, sendo utilizadas quatro repetições por tratamento. Em seguida, o material vegetal foi incluído em metacrilato (Historesin-Leica), segundo as recomendações do fabricante. Secções transversais (5 μ m) foram cortadas usando um micrótomo de avanço automático (Reichert/Leica, Deerfield, IL) e coradas com azul de toluidina. Para determinação das características anatômicas em secção transversal, as imagens foram digitalizadas e analisadas usando-seo Software Axiovision 4.8.

3.2.5.2) Características de células epidérmicas

Para análise de células epidérmicas, utilizaram-se folhas completamente expandidas nas quais impressões epidérmicas foram feitas na superfície abaxial, utilizando-se um molde odontológico (Berger & Altmann, 2000), com quatro repetições por tratamento. A partir desses moldes, em cada repetição, foram amostradas três

regiões a fim de caracterizar, de forma mais homogênea possível, a região foliar amostrada. Sobre esse molde foi passado uma base incolor (Von Groll et al., 2002) e com isso foi possível a visualização da impressão das células. A visualização e registro das imagens foram feitos utilizando-se uma câmera digital (AxiocamMRc) acoplada ao microscópio Zeiss modelo AX10. O número de células e sua respectiva área foram determinados utilizando-se o programa Axiovision 4.8. De posse desses dados, foram calculadas/estimadas a densidade estomática e abertura do poro estomático.

3.2.6) Análises bioquímicas

Nas mesmas folhas utilizadas para as análises de trocas gasosas, amostras de material vegetal (~15 mg) foram coletadas aos 42 DAT entre 11:00 e 12:00 h e, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo armazenadas a -80 °C, procedendo-se, *a posteriori*, às seguintes análises:

a) Extração e determinação de açúcares solúveis, aminoácidos totais, amido, pigmentos, proteínas, malato e fumarato

As amostras foram submetidas à extração etanólica, a quente, determinando-se, na fração solúvel em etanol, os teores de glicose, frutose e sacarose (Fernie et al., 2001); aminoácidos totais (Sienkiewicz-Porzucek et al., 2008) e malato e fumarato (Nunes-Nesi et al., 2007); na fração insolúvel, os teores de amido (Fernie et al., 2001) e o conteúdo de proteínas solúveis pela técnica de Bradford (Bradford, 1976).

Os teores de clorofilas (*a* e *b*) foram determinados nos extratos etanólicos, em leitor de microplacas de ELISA, conforme previamente descrito (Porra et al., 1989). Os teores de clorofila totais (*a+b*) assim como a razão clorofila *a/b* foram calculados.

b) Determinação de pigmentos cloroplastídicos em tecidos foliares

A determinação dos pigmentos cloroplastídicos foi realizada utilizando-se uma coluna C18 (Waters®) de fase reversa (diâmetro de 5µm, C18 column, 250 x 4.6 mm). A fase móvel consistiu de dois componentes: solvente A, acetonitrila:metanol:H₂O (84:9:7); e solvente B, metanol:acetato de etila (68:32). Os pigmentos foram eluídos em um gradiente linear de 100% de A a 100% de B nos primeiros 12 min, seguido de um gradiente isocrático de B pelos próximos 6 min. Logo em seguida, o fluxo retornou a 100% de A por mais 5 min, a fim de reequilibrar a coluna nas condições iniciais. O fluxo durante a corrida foi mantido em 1.2 mL min⁻¹ e o volume de injeção das amostras foi de 100 µL. A detecção dos compostos foi realizada a 445 nm e a identificação de cada um dos pigmentos foi feita com base na comparação com padrões puros (DHI, Hoeshlm, Denmark).

3.2.7) Determinação de enzimas e metabólito envolvidos no metabolismo antioxidativo e danos celulares

3.2.7.1) Peroxidação de lipídeos

A peroxidação de lipídeos, quantificada indiretamente pela determinação do conteúdo de malonaldeído (MDA), foi realizada conforme previamente descrito (Lima et al., 2002). Foram utilizados aproximadamente 50 mg de matéria fresca e o conteúdo expresso por unidade de massa fresca.

3.2.7.2) Ensaio enzimáticos

A determinação das atividades das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foi feita segundo (Cakmak & Horst, 1991). Para tal, foram utilizados aproximadamente 160 mg de matéria fresca e as atividades da CAT e SOD foram expressas em mmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína e U.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína, respectivamente.

3.2.8) Determinação de enzimas e metabólitos envolvidos no metabolismo do carbono e respiratório

O extrato para determinação da atividade enzimática foi preparado como previamente descrito (Gibon et al., 2004). A atividade de todas as enzimas foi determinada espectrofotometricamente por meio da oxidação de NADH ou NADPH, de acordo com cada enzima, a 340 nm. A atividade total (24 min de incubação a 25 °C) e inicial da Rubisco foi determinada como descrito previamente (Sulpice et al., 2007). Para transcetolase, avaliada de acordo com (Gibon et al., 2004). A atividade de NADP-GAPDH foi determinada de acordo com (Leegood & Walker, 1980). A atividade da malato desidrogenase dependente de NAD (NAD-MDH) foi determinada segundo (Jenner et al., 2001) com algumas modificações. A atividade da NADP-MDH foi determinada como descrito por (Scheibe & Stitt, 1988).

3.2.9) Determinação do conteúdo de nucleotídeos de piridina

Os conteúdos de NAD(H)s e NADP(H)s foram determinados como descrito anteriormente (Schippers et al., 2008). Para tanto, aproximadamente 25 mg de matéria fresca foram utilizadas. As formas reduzidas e oxidadas são distinguidas pela destruição preferencial em ácido ou base, respectivamente. Em um leitor ELISA foram obtidas as absorvâncias a 570 nm. A equação utilizada para determinação da concentração dos nucleotídeos foi obtida por regressão a partir da curva padrão e posterior normalização para a massa fresca.

3.2.10) Procedimentos estatísticos

O experimento foi instalado e analisado segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 2 (dois genótipos x 2 níveis de GAs x dois níveis de PBZ). A unidade experimental dos experimentos de análise de

trocas gasosas, metabólitos e atividade enzimática foi composta por uma planta, com oito repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste *F*, a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG).

3.3) Resultados

3.3.1) Análises fisiológicas

Embora as plantas de tomate dos genótipos WT e *gib3* presumivelmente apresentem diferentes níveis endógenos de GAs, observou-se que tanto o crescimento inicial (Figura 1A e 1B) quanto o final (Figura 1C) foram semelhantes entre os genótipos. No entanto, esse padrão não foi mantido quando da aplicação de GA e/ou PBZ.

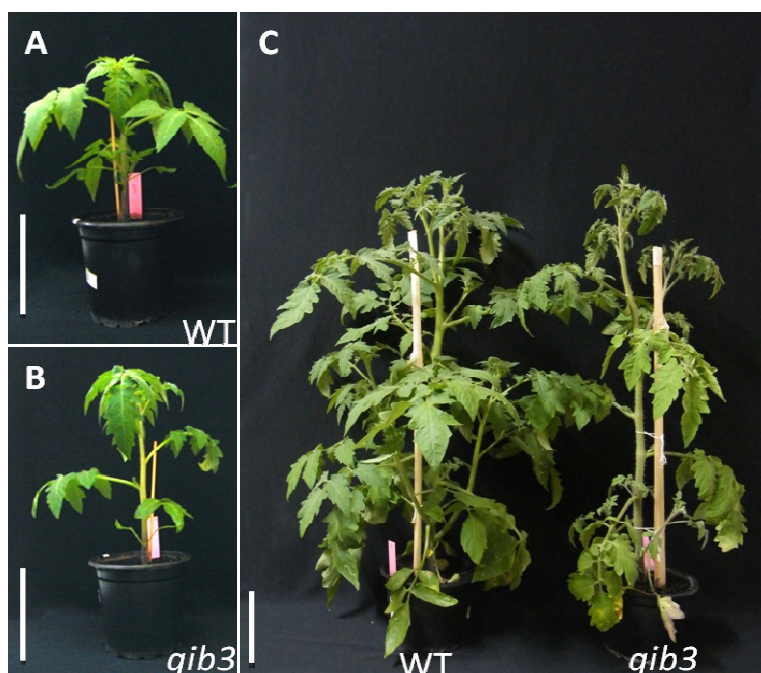


FIGURA 1: Imagens representativas de plantas controles WT e *gib3* antes e após aplicação dos tratamentos. Antes da imposição dos tratamentos (dia 0) plantas WT (1A) e *gib3* (1B) e ao final do experimento (21 dias) (1C) apresentam fenótipos bem similares, confirmando que os mesmos são adequados para as comparações ora propostas. Barras verticais representativas equivalentes a 10 cm. Esses mesmos fenótipos foram observados em pelo menos três experimentos distintos.

3.3.1.1) Crescimento é afetado em resposta às variações nos níveis de GAs

Tanto as plantas controles do genótipo *gib3*, mutantes deficientes na biossíntese de GAs, assim como as tratadas com GAs, apresentaram crescimento semelhante quando comparadas as plantas WT (Figura 2A). O efeito do genótipo só foi significativo no tratamento com PBZ isoladamente. Incrementos na altura em plantas WT e *gib3* foram observados quando da presença de GAs, independentemente da presença ou não de PBZ. A aplicação isolada de PBZ, um inibidor da biossíntese de GAs, promoveu uma drástica redução na altura de plantas WT e *gib3* (Figura 2A). Observa-se também que a aplicação de PBZ ocasionou uma restrição ao crescimento ainda maior em plantas *gib3* (>70%) do que no WT (< 40%) (Figura 2A). Isso pode ser explicado, ao menos parcialmente, pelo fato de a concentração endógena de GA, que já é restrita naquelas plantas, ser ainda mais restringida, culminando, assim, em menor crescimento. É importante mencionar que a inibição do crescimento induzida pela aplicação de PBZ foi completamente revertida pela aplicação de GA₃, o que sugere que a aplicação da PBZ teve um efeito específico sobre a biossíntese de GA, não afetando sobremodo a rota de sinalização das GAs.

Observou-se também menor diâmetro do caule em plantas *gib3* em relação ao das plantas WT, independentemente dos níveis de GAs e PBZ (Figura 2B), demonstrando, assim, que esse parâmetro é característico do próprio genótipo. Saliente-se, no entanto, que GA isoladamente promoveu um aumento no diâmetro em plantas *gib3*, quando comparadas a seu controle.

A baixa concentração endógena de GAs em plantas mutantes *per se* promoveu reduções no número total de folhas, independentemente de alterações promovidas por fatores externos (Figura 2C), característica essa que parecer ser intrínseca ao genótipo e não causada pelos tratamentos. Plantas WT tratadas com GA, com ou sem PBZ, apresentaram maior número de folhas, comportamento semelhante ao encontrado para

altura (Figura 2A). Em contraste, plantas *gib3* apenas em presença de PBZ apresentaram um menor número de folhas. Como previamente mencionado, esse menor número de folhas pode também ser explicado pelo menor investimento em altura. Tomados em conjunto, estes resultados confirmam os efeitos negativos da aplicação de PBZ e da variação nos níveis de GAs no crescimento de plantas de tomate.

A área foliar total (AFT) foi menor em plantas mutantes (*gib3*) em relação ao WT nos tratamentos controle e com GA e PBZ (Figura 2E), demonstrando, assim, um efeito do genótipo. A aplicação de GA, isolada ou conjuntamente com PBZ, promoveu incrementos na AFT em plantas *gib3* e redução em plantas WT quando aplicada simultaneamente a PBZ. Já a aplicação isolada de PBZ promoveu reduções na AFT de plantas *gib3*. Por outro lado, a área foliar específica (AFE) aumentou em ambos os genótipos quando da aplicação de GA, isolada ou associada ao PBZ (Figura 2F). Porém, quando da aplicação isolada do inibidor tanto *gib3* quanto WT sofreram reduções em AFE. A AFE no mutante *gib3* aumentou em relação ao WT nos tratamentos controle e aplicação isolada de PBZ, já quando da aplicação deste em conjunto com GA houve redução (Figura 2F). Em adição, a massa seca total foi drasticamente reduzida em plantas-controle *gib3* quando comparadas ao WT (Figura 2G); reduções também foram observadas tanto em *gib3* como em WT tratadas com PBZ isoladamente (Figura 2G). Todavia, a aplicação de GA foi capaz de reverter o efeito inibitório de PBZ em ambos genótipos; da mesma forma, a aplicação isolada de GA promoveu aumentos na massa seca total em plantas mutantes. A razão raiz/parte aérea foi positivamente afetada pela aplicação do PBZ em ambos os genótipos (Figura 2H); de modo oposto, aplicação de GA associada ao PBZ afetou negativamente ambos os genótipos, e quando isolada, esse efeito somente se verificou em plantas *gib3* (Figura 2H).

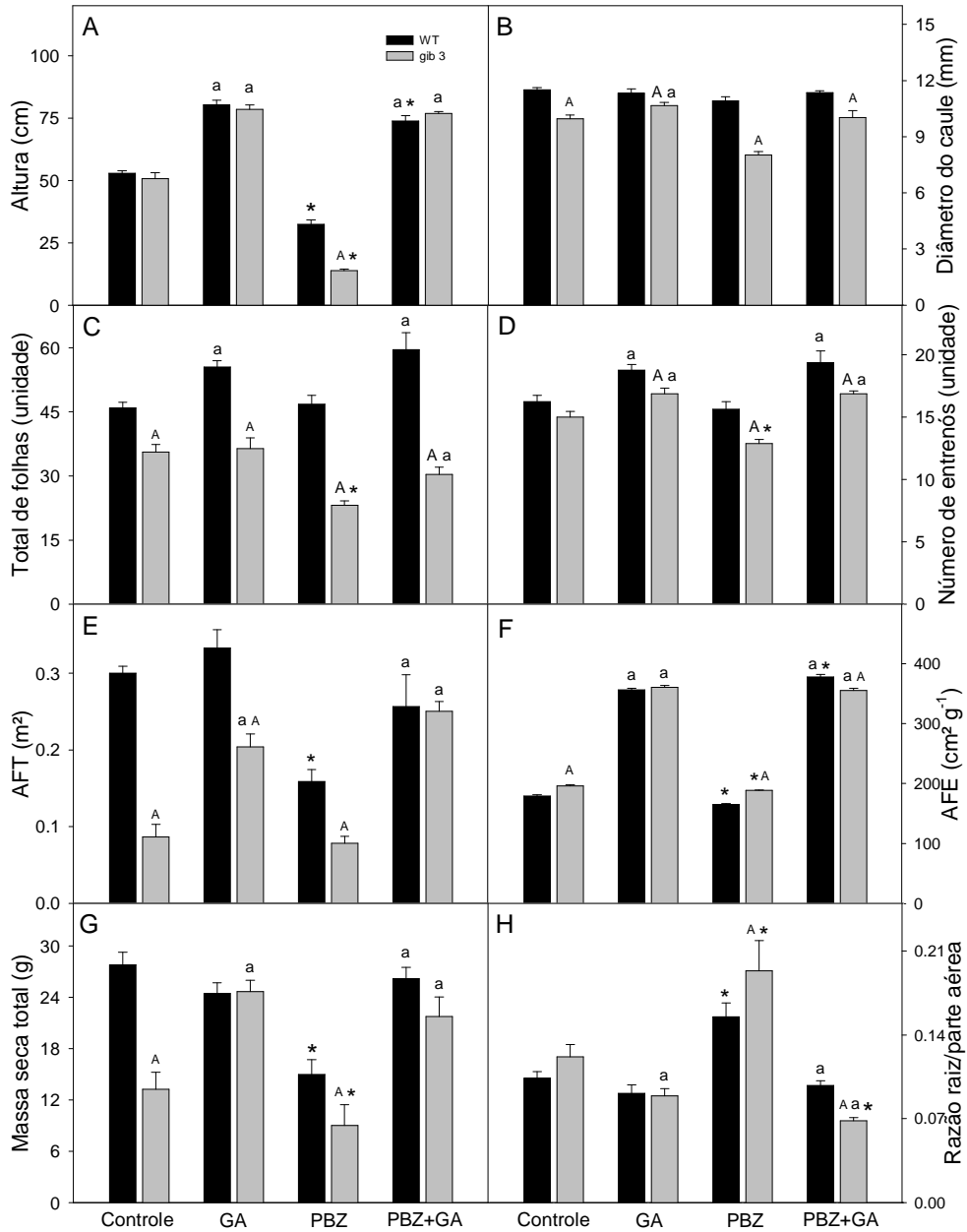


Figura 2: Variação nos parâmetros de crescimento em resposta a flutuação nos níveis de GA. Foram analisados: altura de plantas (A); diâmetro do caule (B); número total de folhas (C); número de entrenós (D); AFT (E); AFE (H); MS (G); razão raiz/parte aérea (H). Valores representam médias ± EP de pelos menos seis plantas independentes com 42 dias de cultivo. Letras maiúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$), comparando genótipos dentro de cada tratamento; letras minúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$), dentro dos níveis de GAs; e asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), dentro dos níveis de PBZ. WT: tipo selvagem; GA: giberelina e PBZ: paclobutrazol. Estatística realizada segundo as comparações utilizando-se o teste F.

3.3.1.2) Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* são afetadas em resposta a variações nos níveis de GAs

Tendo em vista que a produtividade e o crescimento vegetal são largamente dependentes do balanço entre fotossíntese e respiração, esses dois parâmetros foram analisados em plantas com 35 DAT. De forma interessante, a aplicação de GA em plantas WT afetou negativamente a fotossíntese líquida (A_N) (Figura 3A), ocasionando, assim, uma menor A_N independentemente da presença ou não de PBZ. Em contraste, no tratamento com PBZ, isoladamente, foi observada uma resposta inversa, ou seja, um incremento nas taxas fotossintéticas (Figura 3A). Esse comportamento inverso entre taxa fotossintética por unidade de área e crescimento sugere que, em reduzida concentração de GAs, as plantas possivelmente investem mais no acúmulo de biomassa do que na altura *per se* promovendo, portanto uma concentração de pigmentos por unidade de área, o que justificaria por sua vez maiores taxas fotossintéticas por unidade de área, como observado na presença de PBZ. O oposto seria válido para as plantas com elevados teores de GAs. Interessantemente, plantas *gib3* tiveram reduções em A_N quando em presença de PBZ e ausência de GA, em relação ao seu controle. Em plantas *gib3* a redução endógena de GA promove incrementos na taxa fotossintética, semelhantemente ao observado quando da reversão do efeito do PBZ pela aplicação de GA (Figura 3A). Uma plausível explicação seria que plantas *gib3*, por apresentarem deficiência endógena de GA, estariam investindo mais em A_N na tentativa de manutenção do metabolismo. Porém quando analisamos o efeito da aplicação de GA dentro do nível de PBZ, observamos que o aumento dos teores de GA reduz A_N em ambos os genótipos sendo esse efeito mais pronunciado em plantas WT (Figura 3A).

Maiores taxas respiratórias (Figura 3B), assim como maiores taxas fotossintéticas (Figura 3A), foram observadas em plantas WT em presença de PBZ, indicando uma estreita associação entre redução do crescimento, fotossíntese e

respiração. Resultados semelhantes foram observados para plantas controle *gib3* (Figuras 3A e 3B). Interessantemente, os genótipos e tratamentos que apresentaram uma maior taxa fotossintética, apresentaram também uma maior taxa de respiração (Figura 3B). A condutância estomática (g_s) (Figura 3C) foi negativamente afetada pelo aumento do conteúdo artificial de GAs, independentemente da aplicação de PBZ. É importante mencionar que menor g_s está diretamente associada a menores A_N nesses tratamentos (Figura 3A), indicando que estas plantas mantêm os estômatos parcialmente fechados para, possivelmente, evitar uma maior perda de água pela transpiração. Registre-se que os controles não diferiram entre si, o que pode indicar que alterações em g_s estejam associadas às variações artificiais em GA. Cabe ressaltar, entretanto que a interpretação destes resultados precisa ser feita com cautela uma vez que valores relativamente similares apresentando diferenças estatísticas podem não corresponder necessariamente às explicações biológicas.

A transpiração em plantas controle *gib3* foi menor que em plantas WT (Figura 3D), e que associada a maior taxa fotossintética apresentada por essas plantas sugere que as mesmas apresentam uma maior eficiência instantânea no uso da água. Com isso elas poderiam permanecer por mais tempo com os estômatos abertos e conseqüentemente realizarem mais fotossíntese, fato este realmente verificado neste trabalho (Figura 3A). Embora a aplicação de GA associada ao PBZ tenha promovido reduções na transpiração em ambos os genótipos, quando aplicada sozinha este efeito somente foi significativo para o genótipo WT. No entanto, PBZ isoladamente leva a incrementos na transpiração (Figura 3D). Esse resultado é plausível, uma vez que maiores A_N e g_s foram observadas nesse tratamento (PBZ) em relação a plantas que receberam GA. Comparando-se genótipos, no tratamento contendo GA conjuntamente ao PBZ, não foi significativa na redução da transpiração em plantas *gib3* indicando,

portanto, que uma melhor utilização da água é uma característica mais relacionada ao genótipo do que ao efeito dos tratamentos ora utilizados.

A razão F_v/F_m fornece uma medida muito útil relativa do rendimento quântico fotoquímico máximo do PSII; assim, embora este parâmetro tenha sido positivamente afetado em plantas WT tratadas com PBZ isoladamente e, negativamente em *gib3* na presença de GA com ou sem PBZ (Figura 3E), essa razão foi sempre superior a 0,80, e, portanto, dentro de uma faixa considerada ótima, indicando que os tratamentos não ocasionaram situações consideradas estressantes.

A concentração interna de CO_2 (C_i) é um parâmetro que pode ser utilizado com indício de limitação difusiva no processo fotossintético. Assim, comparando-se os genótipos, foi observado que apenas em presença de GA e PBZ esses se diferem, sendo que o mutante apresentou uma maior C_i (Figura 3F). A aplicação de GA afetou negativamente ambos os genótipos na ausência de PBZ; porém quando esse inibidor estava presente, esse efeito só foi observado para as plantas WT. A aplicação isolada de PBZ promoveu reduções em C_i , indicando, que o efeito do mesmo pode ser revertido pela aplicação exógena de GAs (Figura 3F). Tomados em conjunto estes dados sugerem que a menor taxa de fotossíntese observada nos tratamentos com GAs possa estar associada tanto a limitações estomáticas, quanto a maior expansão foliar.

Comportamento semelhante entre os tratamentos tanto para a taxa de transporte de elétrons (ETR) (Figura 3G) quanto o rendimento quântico efetivo do PSII (Y(II)) (Figura 3H) foram observados. Esses parâmetros foram reduzidos em plantas *gib3* tratadas com GAs independentemente da presença de PBZ. No entanto, no genótipo WT esse efeito só foi observado quando utilizou-se o inibidor. Quando usado de forma isolada, o PBZ promoveu incrementos em Y(II) e ETR em plantas WT sem quaisquer efeitos em plantas *gib3* (Figuras 3G e 3H). O efeito do genótipo foi verificado apenas na ausência de GAs, sendo que a presença de PBZ promoveu reduções nesses parâmetros;

no entanto, em plantas-controle, o genótipo mutante apresentou incrementos tanto em Y(II) quanto em ETR.

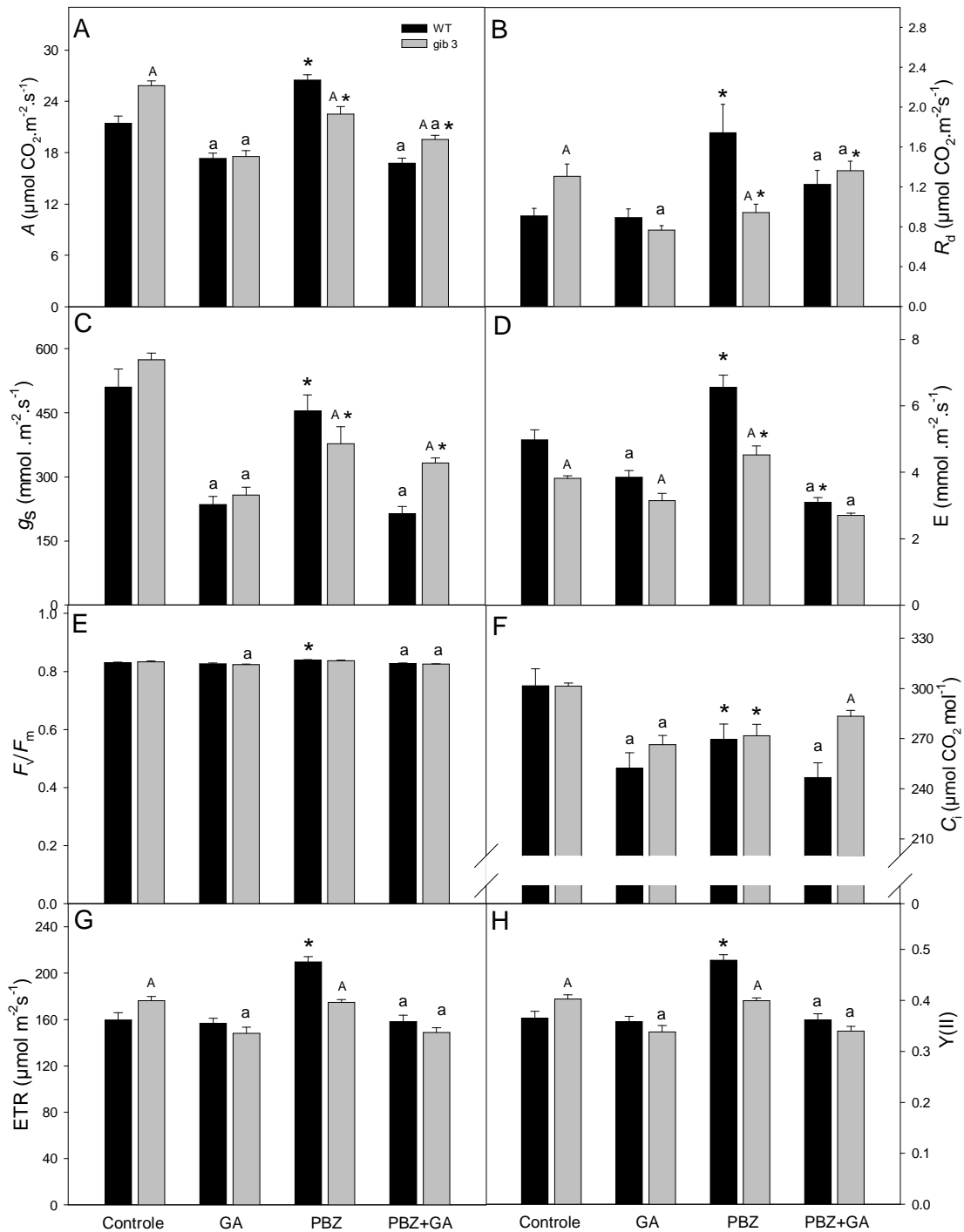


Figura 3: Variação nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência em resposta a flutuação nos níveis de GA. Foram analisados: fotossíntese (A); respiração (B); condutância estomática (C); transpiração (D); razão F_v/F_m (E); concentração interna de CO_2 (F); taxa de transporte de elétrons (G); rendimento quântico efetivo do PSII. Estatísticas e abreviaturas como descritas na Figura 2.

3.3.1.3) Propriedades ópticas

A interação da radiação eletromagnética com as folhas depende, dentre outros fatores, de suas características físicas, químicas e fitossanitárias, além da região espectral (Carriello et al., 2003). Considerando essencialmente as características morfológicas e fisiológicas, as propriedades espectrais de reflexão, de transmissão e de absorção variam de acordo com a espécie estudada (Sims & Gamon, 2002). Em adição, essas propriedades estão diretamente relacionadas com a presença, tipo e quantidade de pigmentos cloroplastídicos, assim como os espaços intercelulares e espessura foliar (Carriello et al., 2003). Tendo em vista as alterações observadas em AFE (Figura 2F) e características anatômicas (descritas abaixo), essas propriedades espectrais foram analisadas no presente estudo.

Plantas-controle mutantes na biossíntese de GAs apresentaram maiores absorptâncias em comparação com as plantas WT (Figura 4A), no entanto, estas apresentaram maiores absorptâncias quando tratadas somente com GA. Independentemente da presença de PBZ, a aplicação de GAs afetou negativamente ambos os genótipos no que diz respeito àquele parâmetro. De modo interessante, quando analisamos o efeito da aplicação isolada de PBZ, incrementos na absorptância tanto em WT quanto em *gib3* foram observados (Figura 4A); porém, quando aplicou-se GA, esse efeito foi somente verificado em plantas *gib3*. Esse fato demonstra que a presença de GA em planta WT reverte o efeito desse inibidor. Esses resultados são bem associados com os valores observados de A_N (Figura 2A). Adicionalmente, a reflectância foi afetada negativamente pela redução endógena de GAs, como pode ser observado comparando-se as plantas-controle (Figura 4B). Aumentando-se o nível de GA incrementos na reflectância independentemente da presença de PBZ foram observados. Quando analisamos o efeito da presença de PBZ, as mesmas diferenças significativas encontradas para a absorptância (Figura 4A) foram observadas, porém com

valores inversos. Os efeitos de transmitância (Figura 4C) foram semelhantes aos encontrados para reflectância, diferindo apenas quando comparamos os genótipos tratados com GA isoladamente, em que se pôde observar que *gib3* apresentou maiores valores que plantas WT.

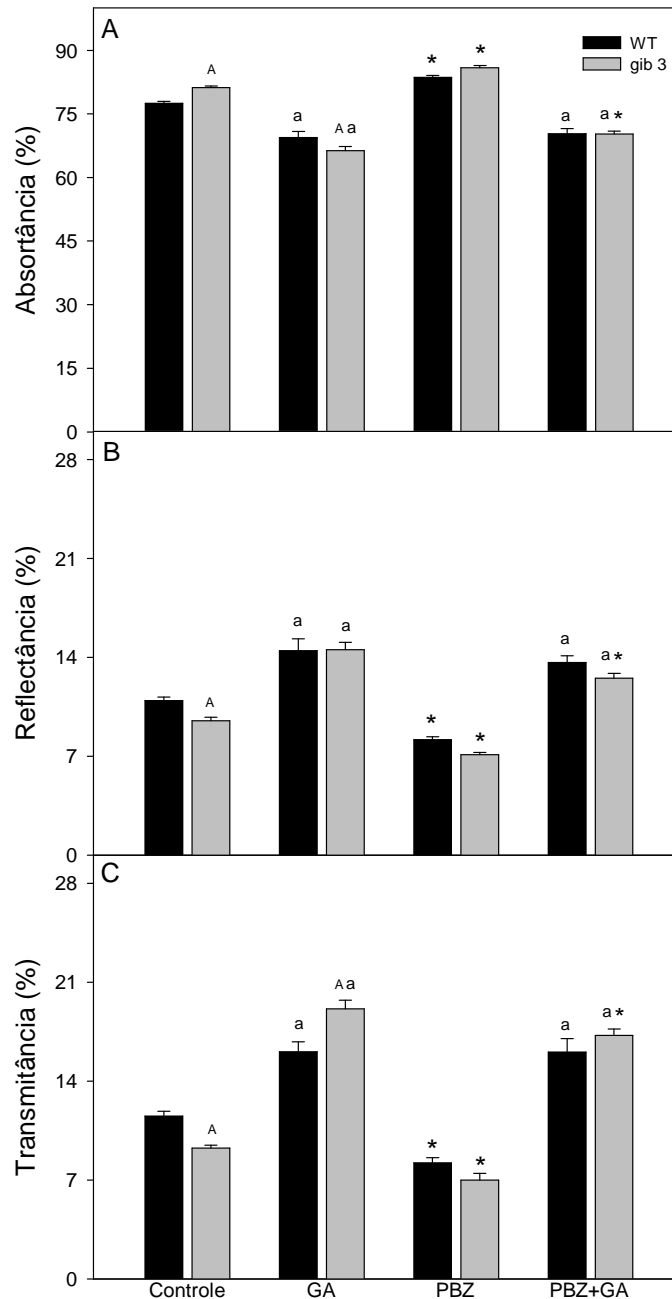


Figura 4: Variação nas propriedades ópticas em resposta a flutuação nos níveis de GA. Foram analisados: absorvância (A); reflectância (B); transmitância (C), respectivamente. Estatística e abreviaturas como descritas na Figura 2.

3.3.1.4) Características morfo-anatômicas das folhas

Em função das variações observadas no que diz respeito ao crescimento e trocas gasosas, decidiu-se analisar algumas características morfo-anatômicas foliares em resposta a variações endógenas e artificiais nos níveis de GAs. Não foram observadas variações na densidade estomática (DE) entre plantas-controle (Figura 5A). Efeito de genótipo foi encontrado apenas quando se aplicou PBZ juntamente com GA. Assim, a aplicação de GAs isoladamente promoveu redução na DE em ambos os genótipos, ao passo que, em presença de PBZ, esse efeito somente foi verificado em plantas *gib3*. Por outro lado, a aplicação isolada de PBZ acarretou incrementos na DE em plantas *gib3* e, quando aplicado em conjunto com GA, não promoveu qualquer efeito sobre o referido genótipo, promovendo, entretanto, incrementos em plantas WT. Por outro lado, resultados bem discrepantes dos encontrados para DE (Figura 5A) foram observados para a abertura estomática (Figura 5B). Assim, embora plantas-controle não diferissem entre si, a imposição dos tratamentos promoveu uma maior abertura estomática em plantas mutantes com pouco ou nenhum efeito em plantas WT (Figura 5B). A espessura da epiderme superior (EES) foi pouco afetada pelos tratamentos (Figura 5C), sendo, todavia, maior em plantas-mutantes-controle, quando tratadas com GAs; já em plantas WT verificou-se esse efeito apenas nas plantas cultivadas com GAs em conjunto ao PBZ. Adicionalmente, observa-se que a espessura da epiderme inferior (EEI) foi também pouco ou nada afetada (Figura 5D). Assim, em plantas mutantes não foi observada nenhuma alteração em função dos tratamentos impostos; já em plantas WT, a aplicação de PBZ isoladamente e em presença de GA promoveu incrementos e reduções em EEI, respectivamente. A espessura do parênquima lacunoso (EPL) foi significativamente maior em plantas-controle *gib3* em relação às plantas WT (Figura 5E). A aplicação de GAs, com ou sem PBZ, acarretou reduções da EPL em plantas

gib3; por outro lado, em plantas WT esse efeito somente foi verificado em presença conjunta de GA e PBZ. Assim, a aplicação isolada de PBZ promoveu incrementos em EPL nas plantas *gib3*, sugerindo que a redução na concentração de interna GAs favoreceria um espessamento do parênquima lacunoso em tomate. O espessamento no parênquima paliçádico (EPP) sofreu efeito do genótipo em plantas *gib3* nos controles e também na presença de PBZ (Figura 5F). Assim como para EPL (Figura 5E), a aplicação de GA, isoladamente ou não, acarretou reduções da espessura do EPP (Figura 5F). A espessura total da folha (ETF) (Figura 5G), como era de se esperar, variou de forma semelhante à EPL (Figura 5E) e EPP (Figura 6F). Efeito de genótipos foi observado apenas em plantas *gib3* controles e em presença de apenas GA. A aplicação isolada de PBZ promoveu espessamento foliar em *gib3* e, indiferentemente dos genótipos e presença de PBZ, aplicações de GAs culminaram em reduções na ETF. Esse efeito está muito provavelmente ligado ao fato de que plantas de tomate tratadas com GAs apresentam uma maior expansão do limbo foliar. Pôde-se observar também que porcentagem de espaços intercelulares somente foi afetada em plantas *gib3* (Figura 5H). Assim, plantas mutantes, controles ou tratadas com GA isoladamente, apresentaram menores espaços intercelulares que as respectivas plantas WT. A aplicação de GA promoveu incrementos nessa variável independentemente da presença de PBZ.

Avaliou-se também as áreas da nervura principal (AN) (Figura 6A), do feixe vascular (AFV) (Figura 6B) e a porcentagem da nervura que se encontra ocupada pelo feixe vascular (Figura 6C). Apesar da tendência de redução na AN em plantas *gib3* em relação ao WT, quando tratadas isoladamente por GA ou PBZ, reduções significativas só foram observadas no tratamento com PBZ (Figura 6A). Semelhante comportamento foi observado para a AFV (Figura 6B), no entanto, para este parâmetro a redução foi significativa. A aplicação isolada de PBZ afetou positivamente a AFV em plantas WT.

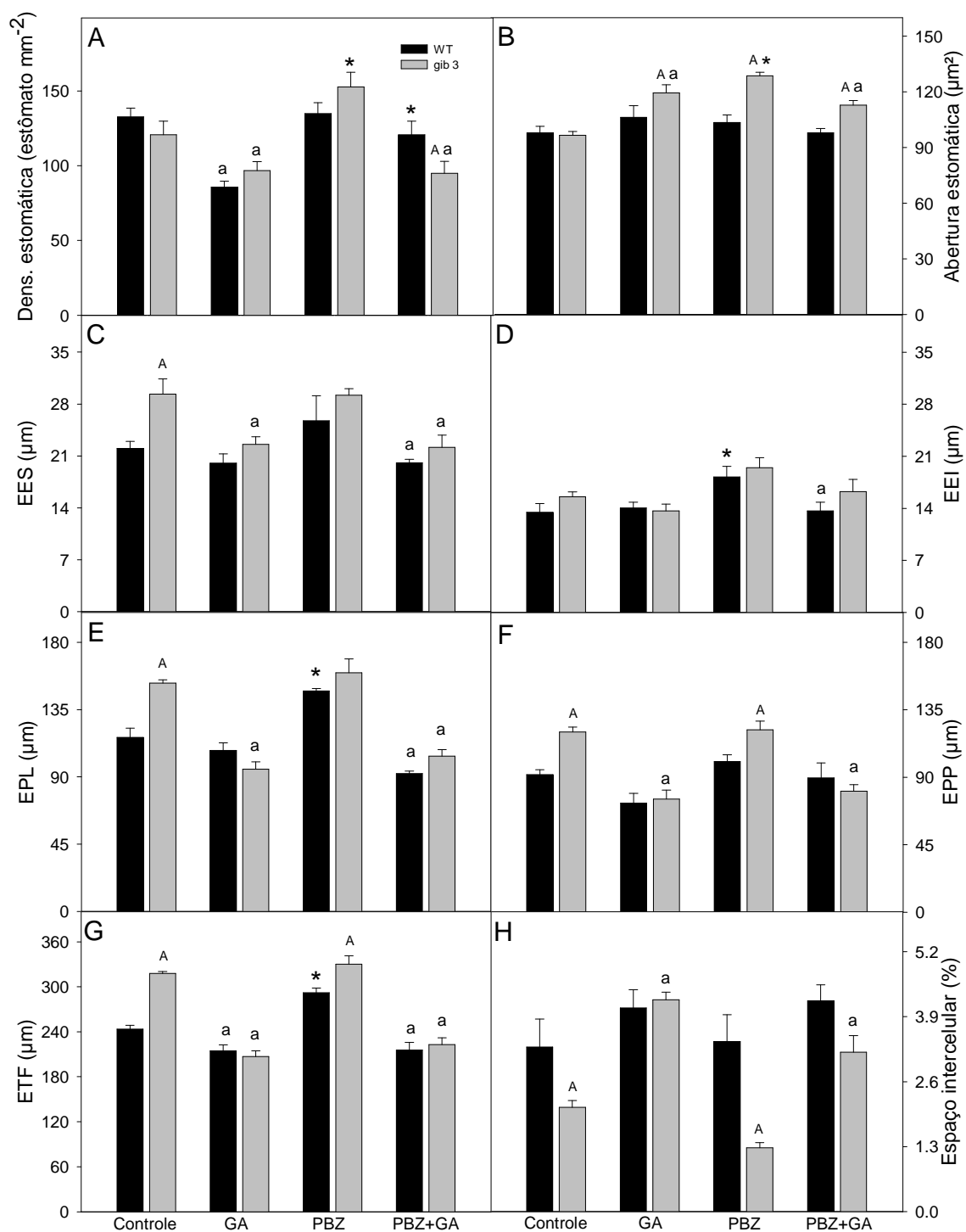


Figura 5: Variação nos parâmetros anatômicos da folha em resposta a flutuação nos níveis de GA. Foram analisados: densidade estomática (A); abertura do poro (B); espessura da epiderme superior (C); espessura da epiderme inferior (D); espessura do parênquima lacunoso (E); espessura do parênquima paliçádico (F); espessura total da folha (G); espaço intercelular (H), respectivamente. Estatísticas e abreviaturas como descritas na Figura 2.

Porém, quando em conjunto com GA o efeito observado foi o inverso, ou seja, redução na AFV. Para o mutante, a presença de GA juntamente com PBZ promoveu incrementos em AFV. A porcentagem da nervura que é ocupada pelo feixe vascular variou pouco ou quase nada entre os genótipos, sendo significativamente diferente apenas na presença de GA para WT.

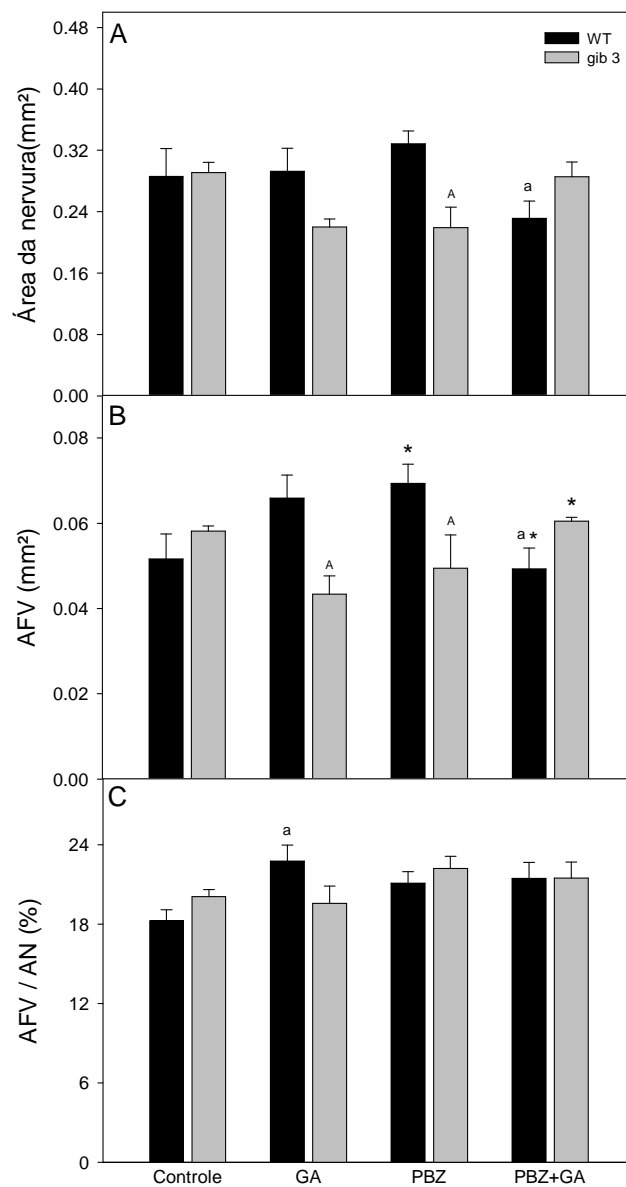


Figura 6: Variação nos parâmetros anatômicos da folha em resposta a flutuação nos níveis de GA. Foram analisados: área da nervura principal (A); área do feixe vascular (B); porcentagem da área da nervura ocupada pelo feixe vascular (C), respectivamente. Estatísticas e abreviaturas como descritas na Figura 2.

3.3.1.5) Alterações metabólicas em resposta a variações nos níveis de GAs

A redução do nível endógeno de GAs promovido pela mutação (*gib3*) foi associada a um grande aumento (82%) na concentração de aminoácidos totais em relação ao genótipo WT. Ademais, aumento nos níveis de aminoácidos foi verificado em plantas WT submetidas à GA e PBZ isoladamente; de forma contrária, esses tratamentos não promoveram alterações significativas em *gib3* (Figura 7A). Registre-se, todavia, que a aplicação de PBZ e posterior reversão por GA promoveu reduções na concentração de aminoácidos totais em ambos os genótipos. Embora grande variação na concentração de aminoácidos tenha sido observada, em condições controle não houve diferença na concentração protéica entre genótipos (Figura 7A). Adicionalmente, a aplicação exógena de GA, isoladamente, ocasionou redução e incrementos nos níveis de proteínas em plantas WT e *gib3*, respectivamente (Figura 7B). A aplicação de PBZ, independentemente de GA, acarretou incremento na concentração de proteínas em plantas WT. A comparação da concentração de proteínas entre os genótipos apresentou-se significativa, quando tratados com GA isoladamente, observou-se incremento nesse metabólito em plantas *gib3* e, reduções quando da presença apenas do PBZ.

Em função dos resultados observados para as análises de trocas gasosas (Figura 3), os teores de açúcares foram mensurados. Os teores de glicose e frutose sofreram uma redução drástica em plantas *gib3* e WT em presença de PBZ isolado (Figuras 7C e 7D). Já com a aplicação de GA, aumentos na concentração destes açúcares em plantas WT independentemente de PBZ, foram observados. Esse efeito somente foi verificado em plantas *gib3* em presença de GA conjuntamente ao PBZ. O efeito da mutação sobre a concentração de açúcares somente foi observado para a frutose, quando da aplicação conjunta de GA e PBZ (Figura 7D). Diferentemente do observado em relação à A_N (Figura 3A) e g_s (Figura 3C), pequenas variações foram notadas para o teor de sacarose,

que somente foi reduzido em plantas *gib3* tratadas com PBZ isoladamente, seja comparada ao seu controle ou ao genótipo WT. Pôde-se observar também uma ligeira tendência de aumento da concentração de sacarose em plantas *gib3* em relação a WT apenas na associação de GA e PBZ (Figura 7E). No tratamento controle, plantas WT apresentam maiores teores de amido do que plantas *gib3* (Figura 7F), assim quando tratadas com PBZ. A aplicação de GA, isoladamente ou revertendo o efeito do PBZ, promoveu incrementos significativos na concentração de amido no genótipo *gib3* (Figura 7F); contudo, quando aplicada de forma isolada, a GA afeta significativamente o teor de amido em plantas WT (Figura 7F). Reduções nos teores de amido foram observadas tanto em plantas *gib3* como em WT em presença de PBZ em relação aos seus respectivos controles. Esse mesmo efeito foi observado quando da redução de GAs promovida pela mutação (*gib3*). O conteúdo de malato em plantas WT foi reduzido no tratamento com PBZ, ao passo que incrementos foram observados quando da aplicação de GA com o intuito de reverter seu efeito inibitório (Figura 7G). Assim como o malato, poucas variações nos níveis de fumarato foram encontradas (Figura 7H). Salienta-se que a aplicação isolada de GA promoveu um aumento exorbitante no teor de fumarato em plantas WT (aproximadamente cinco vezes em relação ao seu controle) e em plantas *gib3* (50%). A aplicação de GA associada com PBZ também ocasionou aumento nos teores de fumarato em plantas WT. Nos demais tratamentos houve uma tendência de redução do teor desse ácido orgânico no genótipo *gib3*, porém essa redução não foi significativa.

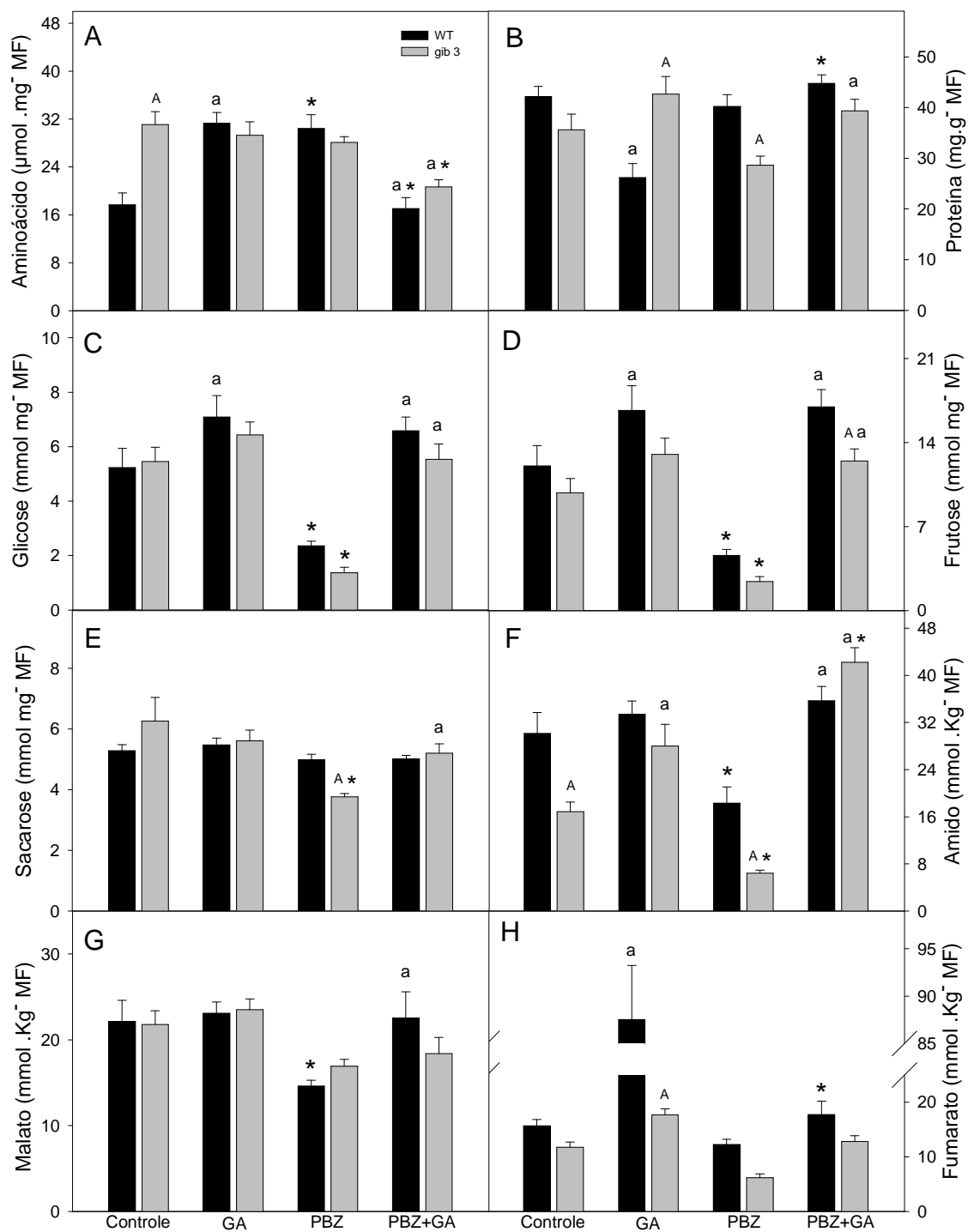


Figura 7: Variação nos níveis de metabólitos em resposta a flutuação nos níveis de GA. Foram analisados: aminoácidos (A); proteína (B); glicose (C); frutose (D); sacarose (E); amido (F); malato (G); fumarato (H), respectivamente. Estatísticas e abreviaturas como descritas na Figura 2.

3.3.1.6) Determinação de pigmentos cloroplastídicos

A concentração dos pigmentos associados à fotossíntese foi quantificada (Figura 8) com intuito de se entender as variações encontradas nos parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência, assim como nas propriedades ópticas. Tanto para o conteúdo de luteína (Figura 8A) como de β -caroteno (Figura 8B) observou-se uma tendência (não significativa) de redução em plantas mutantes (*gib3*) em relação às plantas WT em todos os tratamentos. Em plantas *gib3* reduções em luteína foram observadas quando da aplicação isolada de PBZ; por outro lado, incrementos tanto para luteína quanto para β -caroteno foram observados quando da aplicação de PBZ em conjunto com GA. A redução do nível endógeno de GA em *gib3* promoveu reduções em violaxantina em relação a plantas WT (Figura 8C). Em adição, a aplicação de GAs, isoladamente ou associada ao PBZ, ocasionou incrementos em violaxantina em plantas *gib3* (Figura 8C). Plantas WT tiveram alteração apenas em presença de PBZ isoladamente, observando-se uma redução em violaxantina. Assim como observado para luteína e β -caroteno (Figuras 8A e 8B, respectivamente), o conteúdo de neoxantina (Figura 8D) apresentou tendência de redução em plantas *gib3*, sem, no entanto, diferir significativamente. Não obstante, e diferentemente do encontrado até então, os conteúdos de zeaxantina (Figura 8E) e anteraxantina (Figura 8F) mostraram-se bastante variáveis em todos os tratamentos. Assim, a aplicação de PBZ isoladamente promoveu reduções significativas no conteúdo desses dois pigmentos em ambos os genótipos. O efeito intrínseco do genótipo (*gib3*) acarretou incrementos desses pigmentos em plantas-controle e, somente de anteraxantina quando na presença isolada de GA. A aplicação de GA acarretou em reduções nos níveis de zeaxantina nos dois genótipos (Figura 8E) e incrementos em plantas WT quando associada ao PBZ (Figura 6E). Os teores de clorofila *a* (Figura 8G) e *b* (Figura 8H), e conseqüentemente o teor de clorofila total (Figura 8I) foram pouco ou

nada afetados nos vários tratamentos aqui utilizados. Registre-se, no entanto que as reduções nos teores de clorofilas em plantas *gib3*, quando comparadas ao WT, não foram significativas em todos os tratamentos (Figuras 8G, 8H e 8I).

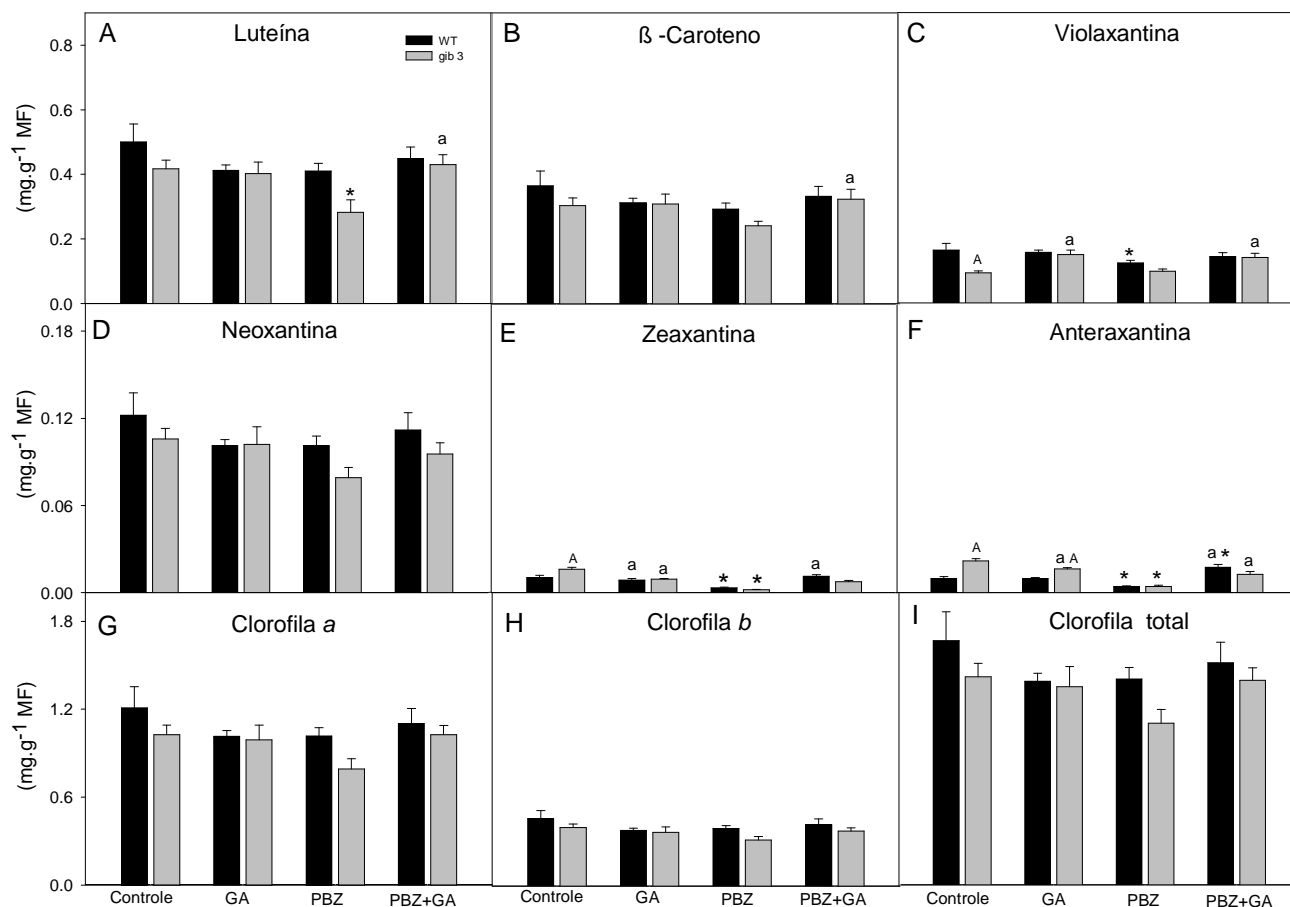


Figura 8: Variação nos conteúdos de pigmentos cloroplastídicos em resposta a flutuação nos níveis de GA. Foram analisados: luteína (A); β-caroteno (B); violaxantina (C); neoxantina (D); zeaxantina (E); anteraxantina (F); clorofila *a*(G); clorofila *b*; clorofila total (I), respectivamente. Estatísticas e abreviaturas como descritas na Figura 2.

3.3.1.7) Determinação de atividade enzimática e metabólitos envolvidos no metabolismo antioxidativo e danos celulares

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas naturalmente durante algumas reações do metabolismo celular. No entanto, a presença de um sistema antioxidante enzimático mantém essas espécies em concentrações tais que essas EROs

não promovam danos às células em condições normais (Resende et al., 2003). Assim, em função das diferenças observadas em relação a trocas gasosas e concentrações de pigmentos fotossintéticos decidiu-se analisar esse sistema antioxidante. Inicialmente, ao se compararem genótipos, plantas-controle *gib3* apresentaram maiores teores de MDA (Figura 9A). A aplicação de GA juntamente a PBZ promoveu incrementos nos teores de MDA quando comparado com a aplicação isolada do inibidor, no entanto, a aplicação isolada de GA não proporcionou qualquer efeito. Quando o inibidor está presente isoladamente, reduções no teor de MDA em ambos os genótipos foram observadas, sugerindo assim que a inibição da biossíntese de GAs, embora reduza o crescimento (Figura 2), não ocasiona estresse oxidativo nessas plantas. De modo geral, a atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), duas enzimas que formam um sistema extremamente importante na defesa de plantas contra as EROs (Asada, 1992), também não sofreram muitas alterações. Registre-se, no entanto, que a atividade da SOD foi negativamente alterada em plantas *gib3* tratadas com GAs conjuntamente ao PBZ (Figura 9B), enquanto nos demais tratamentos não foram observadas quaisquer alterações. De modo similar, as variações na atividade da CAT (Figura 9C), assemelharam-se às observadas para a SOD (Figura 9B), o que de certa forma poderia ser esperado, uma vez que um dos produtos da SOD, o H_2O_2 , é substrato da CAT. Nota-se também que a aplicação de PBZ *per se* promove reduções na atividade da CAT em plantas *gib3* quando comparadas ao WT, indiferentemente da aplicação de GA. Porém, a aplicação de GA, isolada, promoveu um aumento na atividade da CAT tanto em nível de genótipo quanto em nível dos tratamentos (Figura 9C).

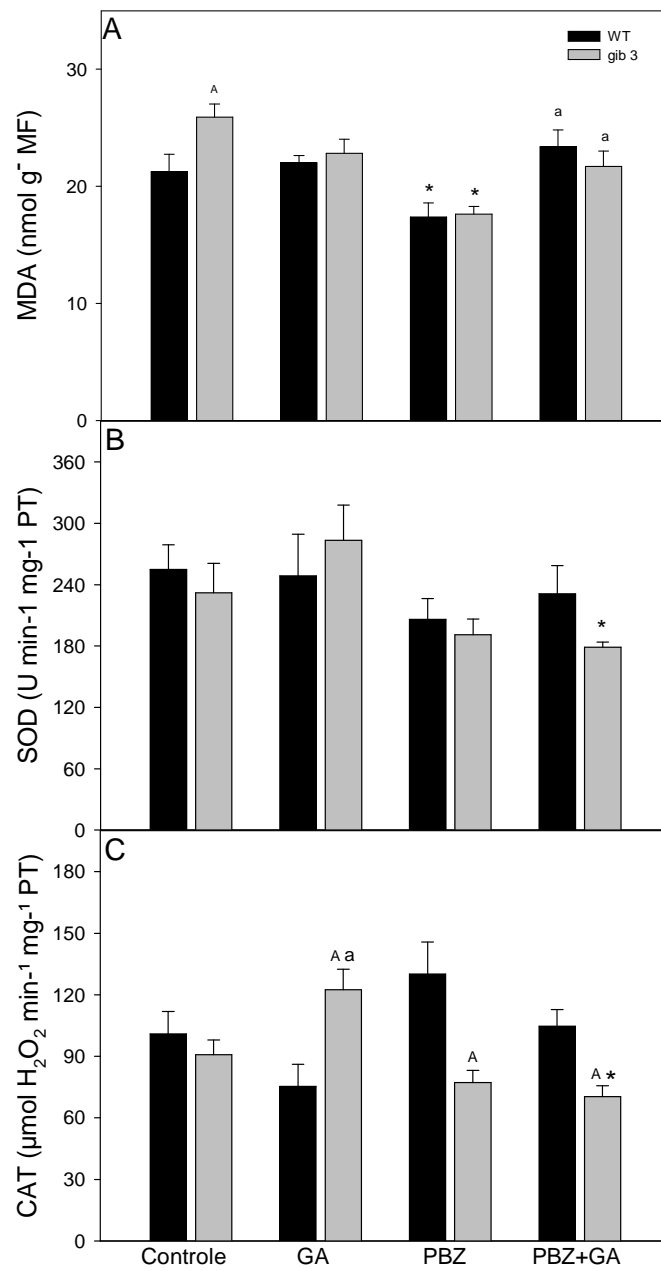


Figura 9: Variação no conteúdo de MDA e atividade da SOD e CAT em resposta a flutuação nos níveis de GA. Foram analisados: MDA (A); SOD (B); CAT (C), respectivamente. Estatística e abreviaturas como descritas na Figura 2.

3.3.1.8) Atividade enzimática: metabolismo do carbono e respiratório

De modo geral, pouca ou nenhuma variação na atividade das cinco enzimas envolvidas no metabolismo do carbono e/ou respiratório analisadas foi observada. Destaque apenas para a atividade da enzima NADH-GAPDH (Tabela 1), observando-se que plantas mutantes diferiram de plantas WT em todos os tratamentos. Ressaltando-se que a atividade desta enzima foi superior nas plantas-controle, enquanto em presença de GA e/ou PBZ houve uma redução. É válido ressaltar, portanto, que as variações observadas no processo de assimilação do carbono e na respiração não estariam diretamente associadas com mudanças na atividade catalítica máxima das enzimas ora analisadas.

Tabela 1: Variação na atividade das enzimas do metabolismo do carbono e/ou respiratório em resposta a flutuação nos níveis de GA.

Estatística e abreviaturas como descritas na Figura 2.

	WT				<i>gib3</i>			
	Controle	GA	PBZ	PBZ+GA	Controle	GA	PBZ	PBZ+GA
	nmol.min ⁻¹ .g ⁻¹ .FW							
Rubisco inicial	2141.4 ± 249.2	1959.9 ± 169.5	1541.7 ± 151.3*	1953.41 ± 155.9	1569.4 ± 66.7 A	1280.5 ± 101.5 A	1802.1 ± 199.4	1639.6 ± 142.5
Rubisco total	2395 ± 261.0	2824.4 ± 294.4	2258 ± 203.3	2338.9 ± 133.9	2218.1 ± 202.7 A	2037.5 ± 177.4	2460.0 ± 193.1	2044.8 ± 84.7
Estado de ativação (%)	84 ± 6.2	73 ± 4.8	68 ± 3.6*	84 ± 4.2 a	74 ± 4.8	65 ± 5.2	73 ± 5.1	79 ± 4.8
NADP-MDH inicial	346.3 ± 7.3	342.3 ± 3.1	300.3 ± 18.7*	339.5 ± 8.2 a	337.3 ± 11.1	303.6 ± 6.6 Aa	354.5 ± 5.5 A	337.2 ± 9.3*
NAD-MDH total	459.1 ± 33.7	511.4 ± 19	440.2 ± 32.1	429.1 ± 18.9	478.9 ± 12.3	435.3 ± 18.2	512.3 ± 60.6	407.5 ± 19.9 a
Taxa de ativação (%)	78 ± 5	68 ± 3	69 ± 2.8	80 ± 2.9*	71 ± 2.5	71 ± 3.2	70 ± 5.6	84 ± 4.7 a *
NAD-MDH	60.87 ± 3.6	61.42 ± 3.8	66.91 ± 3.7	53.66 ± 7.1	62.66 ± 4.3	56.98 ± 3.7	59.49 ± 4.5	68.39 ± 3.5 A
NADP-GAPDH	6298.7 ± 223.7	7773.6 ± 227.3	6326.1 ± 473.1	6980.0 ± 337.8	6549.8 ± 332.6 A	5531.4 ± 456.7 A	5670.2 ± 329.6 A	6701.9 ± 476.8 Aa *
Transcetolase	1789.2 ± 107.5	2466.0 ± 84.1 a	2220.8 ± 174.6*	1981.8 ± 115.7*	2080.9 ± 83.3	1814.8 ± 125.0 A	1972.9 ± 89.9	2090.2 ± 65.5

NAD-MDH: atividade expressa em μmol min⁻¹ g⁻¹MF (Matéria Fresca)

3.3.1.9) Nucleotídeos de piridina

Como algumas perturbações tanto morfológicas quanto metabólicas foram observadas devido às variações naturais e/ou artificiais nos níveis de GAs, a investigação do estado redox dessas plantas pode ajudar a entender tais variações. Por isso quantificaram-se as concentrações de NAD(P)(H)s (Figura 10). Os níveis de NAD⁺ (Figura 10A) apresentaram tendência de redução em plantas mutantes em relação ao WT em todos os tratamentos, efeito este significativo apenas em plantas-controle ou tratadas com GA isoladamente. Interessantemente, aplicação de PBZ associada ou não com GA culminou com reduções no teor de NAD⁺ em plantas *gib3* e, em plantas WT, apenas quando conjuntamente com GA. Diferentemente do que foi observado para o conteúdo de NAD⁺ (Figura 10A), a sua forma reduzida, NADH (Figura 10B), permaneceu praticamente constante nos diferentes tratamentos e genótipos. Resultados semelhantes foram encontrados para NADP⁺ (Figura 10C). Diferentemente do que foi encontrado para o NADP⁺ (Figura 10C), a forma reduzida, NADPH (Figura 10D), sofreu grandes variações em decorrência dos tratamentos. A aplicação de GA isoladamente promoveu incrementos no conteúdo desse composto em plantas WT; o mesmo foi verificado para a aplicação de PBZ, isoladamente ou em presença de GA. Já em plantas *gib3*, a aplicação de GA promoveu reduções, tanto na presença como na ausência de PBZ, em relação ao WT assim como em relação ao seu controle. Plantas tratadas com PBZ, associado ou não com GA, tiveram incremento nos teores de NADPH. A razão NAD/NADH apresentou tendência de redução em *gib3* dentro dos tratamentos, sendo significativa apenas em presença de PBZ (Figura 10E). Assim como esperado, a grande variação de conteúdo de NADPH afetou drasticamente a razão NADP/NADPH (Figura 10F), apresentando valores inversos aos encontrados para NADPH (Figura 10E).

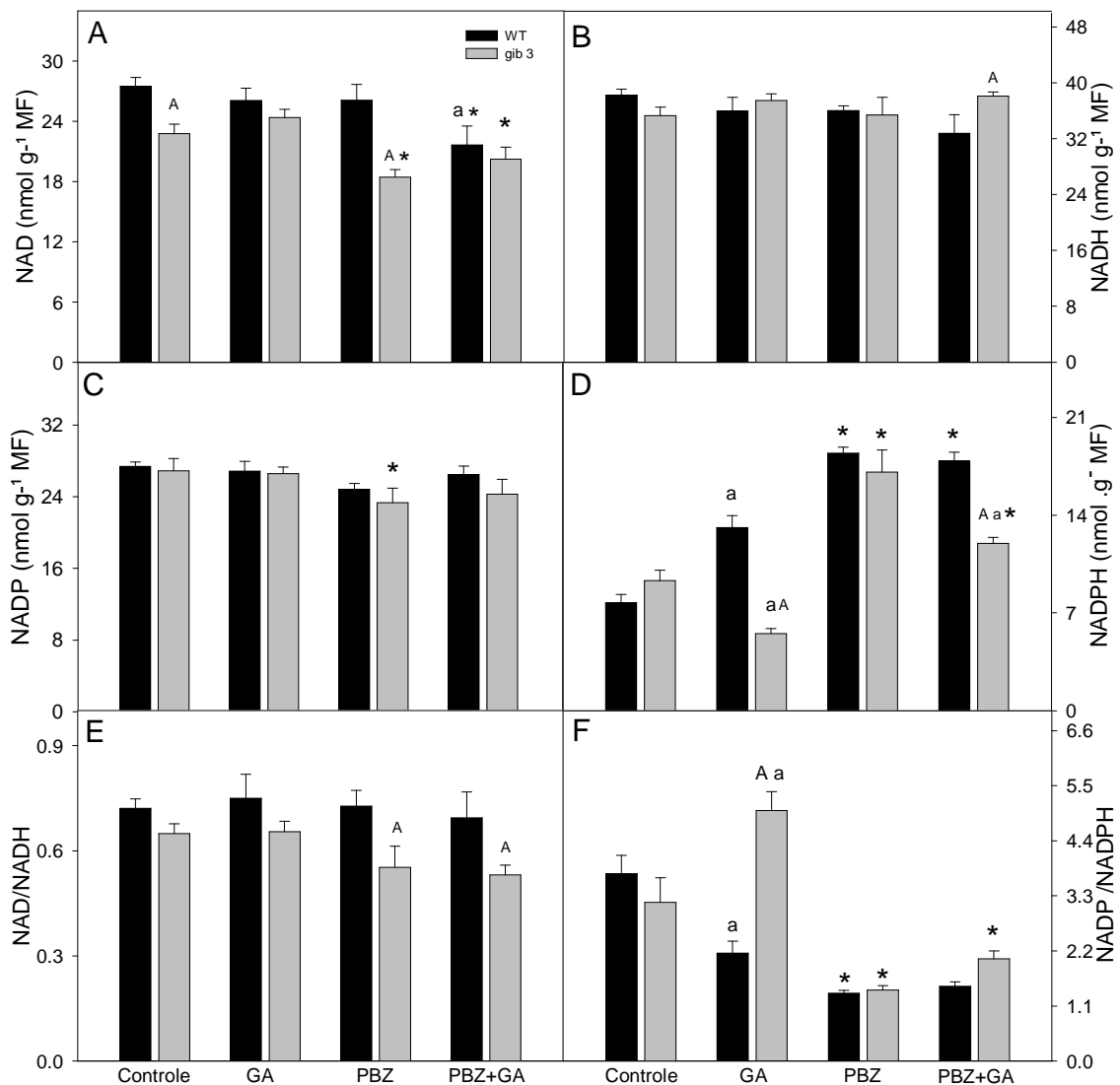


Figura 10: Variação nos níveis de nucleotídeos de piridina em resposta a flutuação nos níveis de GA. Foram analisados: NAD⁺ (A); NADH (B); NADP⁺ (C); NADPH (D); NAD/NADH (E); NADP/NADPH (F), respectivamente. Estatísticas e abreviaturas como descritas na Figura 2.

3.4) Discussão

Como previamente demonstrado (Capítulo I), variações nos níveis de GAs promovem extensas variações morfológicas, anatômicas e fisiológicas em plantas de tomate e, embora diversos mutantes tanto para a biossíntese como para sinalização de GAs sejam conhecidos (Yamaguchi, 2008), neste trabalho decidiu-se utilizar apenas os mutantes *gib3* (moderadamente deficiente em GAs) associado a manipulação artificial

de GAs mediada por PBZ e GA exógena. Essa estratégia permitiu a identificação de mudanças metabólicas e fisiológicas associadas à variação endógena de GAs. De modo geral, os parâmetros de crescimento, tanto em plantas WT quanto em *gib3*, foram alterados em resposta a variações nos níveis de GAs. A altura de plantas (Figura 2A), assim como a área foliar específica e a massa seca total (Figuras 2F e 2G, respectivamente) foram positivamente afetados pela aplicação de GAs e, de maneira negativa, pelo tratamento com PBZ (inibidor da biossíntese de GAs). Resultados semelhantes foram observados em plantas de *Lilium oriental* hybrids ‘Sorbonne’ (Zheng et al., 2012) e em plantas de milho também tratadas com PBZ (Wang et al., 2013). Em adição, a razão raiz/parte aérea apresentou incrementos quando no tratamento contendo PBZ, sugerindo que em presença desse inibidor as plantas investiriam mais recursos na formação e manutenção do sistema radicular em detrimento da parte aérea. Juntos, estes resultados corroboram com a proposição de que as GAs atuam como “um inibidor” de um inibidor do crescimento (Stowe & Yamaki, 1959), conceito esse recentemente reforçado pela identificação molecular do mecanismo de ação das GAs (Achard & Genschik, 2008; Davière et al., 2008; Yamaguchi, 2008).

Durante as últimas décadas, avanços consideráveis têm sido alcançados no entendimento das interações entre fotossíntese e respiração e os possíveis mecanismos associando as funções mitocondriais e a eficiência fotossintética foram recentemente revisados (Araújo et al., 2013). Ademais, o balanço existente entre os processos fotossintético e respiratório é de extrema importância para o crescimento, desenvolvimento e a produtividade vegetal. Nesse contexto, verificou-se comportamentos inversos entre crescimento em altura (Figura 2A) e A_N (Figura 3A), possivelmente porque plantas com menores níveis de GAs tenham investido mais em acúmulo de biomassa que em altura. Esse maior investimento em massa ocorreu

particularmente no sistema radicular, visto que a razão raiz:parte aérea foi sobremaneira significativa (Figura 2H), destaque para o mutante *gib3*, que, em contraste à menor altura, apresentou a maior razão raiz/parte aérea. Esperar-se-ia, portanto, uma maior concentração de pigmentos fotossintéticos nessas plantas, fato esse não verificado, como notado pela semelhança no conteúdo de clorofilas por unidade de massa (Figuras 8G, 8H e 8I), no entanto, se a expressão da concentração de clorofilas for por unidade de área, possivelmente haverá diferenças significativas, visto que houve variações na AFE. Interessantemente os genótipos e tratamentos que tiveram uma maior taxa fotossintética apresentaram também uma maior R_d (Figura 3B). Estes resultados são distintos dos encontrados em plantas de *Arabidopsis thaliana* submetidas a condições semelhantes (Ribeiro et al., 2012b). Registre-se, no entanto, que alguns estudos demonstraram que o incremento nos níveis de GAs fez reduzir de forma significativa as taxas fotossintéticas em *Plantago major* (transagem), correlacionando positivamente com a redução nos conteúdos de clorofilas e carotenóides (Dijkstra et al., 1990). Interessantemente, em outro estudo com folhas e protoplastos isolados de soja (*Glycine max*) e fava (*Vicia faba*), verificou-se que a aplicação de GAs promoveu aumentos significativos da taxa fotossintética, sem contudo alterar a condutância estomática (Yuan & Xu, 2001). Esse aumento foi provavelmente devido a um efeito bioquímico e não difusivo, uma vez que a aplicação de GA ocasionou um aumento na tradução e atividade da Rubisco, enzima-chave do processo carboxilativo, o que pode ter refletido na elevação da fotossíntese líquida. Alterações positivas na taxa fotossintética em plantas de tabaco que superexpressavam a enzima GA20ox, uma enzima da rota biossintética das GAs (Biemelt et al., 2004), também foram observadas. Neste trabalho, entretanto, as variações encontradas em A_N parecem não estar associadas às limitações bioquímicas e nem enzimáticas, assim como impactos em R_d , visto que não foram

observadas mudanças nas atividades máximas de importantes enzimas do metabolismo fotossintético e respiratório (Tabela 1). Estes resultados são, no entanto, semelhantes aos observados em plantas de tomate em que a inibição do complexo 2-oxoglutarato desidrogenase, uma importante enzima do metabolismo respiratório, promoveu alterações nos níveis de GAs sem, contudo, afetar a atividade catalítica máxima de importantes enzimas envolvidas nesses processos (Araújo et al., 2012). É plausível sugerir, portanto, que o papel do metabolismo mitocondrial, associado ao crescimento, esteja diretamente associado com o suprimento de energia na forma de ATP, assim como de esqueletos de carbono, necessários para um eficiente metabolismo como um todo. Entretanto, para a comprovação desta hipótese estudos metabólicos futuros deverão ser realizados.

A taxa de transporte de elétrons (ETR) (Figura 3G) assim como o rendimento quântico efetivo do PSII (Y(II)) (Figura 3H) apresentaram resultados semelhantes e consistentes aos observados para g_s e A_N (Figura 3). Adicionalmente, as grandes variações observadas em fotossíntese não foram acompanhadas por variações na razão F_v/F_m (Figura 3E). A razão F_v/F_m , uma medida muito útil e relativa do rendimento quântico fotoquímico máximo do PSII, esteve sempre próxima aos valores normalmente registrados para folhas não estressadas (em torno de 0,83) (Björkman & Demmig, 1987). Assim, a manutenção dos valores de F_v/F_m (Figura 3E) associada as pequenas variações observadas no que diz respeito as enzimas e metabólitos associados ao sistema antioxidativo (Figura 9) sugerem que a alteração endógena moderada ou artificial nos níveis de GAs promoveu pouco, se algum, efeito estressante em plantas de tomate. As reduções nas concentrações de anteraxantina (Figura 8F), e principalmente, de zeaxantina (Figura 8E) em relação ao conteúdo de violaxantina (Figura 8C) indicam que esses pigmentos se interconvertem para promover a dissipação do excesso de

energia que atinge o PSII. Em adição, a zeaxantina também atuaria reduzindo a formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e, conseqüentemente evitando o processo de peroxidação lipídica da membrana dos tilacóides (Jahns & Holzwarth, 2012). O $^1\text{O}_2$, juntamente com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}) formando intermediários reativos de oxigênio (Scandalios, 1993; Mittler, 2002). Adicionalmente, as pequenas variações observadas no conteúdo de MDA (Figura 9A), produto este oriundo da peroxidação de lipídeos, assim como a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (Figura 9B) e da catalase (CAT) (Figura 9C) sugere que danos fotooxidativos não tenham ocorrido em função das oscilações nos teores de GAs. Registre-se que, de maneira geral, as plantas apresentam, até certo ponto, tolerância a essas EROs, promovidas pela ação de enzimas e/ou metabolitos (Mittler, 2002) como observado no presente trabalho.

As características anatômicas das folhas podem influenciar sobremaneira os processos de trocas gasosas, assim como as suas propriedades ópticas (Carriello et al., 2003). Nesse sentido, plantas tratadas com GAs apresentaram uma maior expansão foliar, culminando assim com uma maior AFE (Figura 2F), assim como uma menor espessura do limbo foliar (Figura 6G), maiores espaços intercelulares (Figura 6H) e, conseqüentemente uma maior transmitância (Figura 4C). Por outro lado, essa maior transmitância não teve relação direta com o conteúdo total de pigmentos, que não apresentaram grandes variações entre os tratamentos (Figura 8). Em contraste relações diretas entre maiores conteúdo de clorofila e maiores absorvância foram previamente observadas (Sims & Gamon, 2002; Souza & Válio, 2003). Segundo (Carriello et al., 2003) o conteúdo de pigmentos, juntamente com a espessura do limbo e o volume de espaços intercelulares, afeta diretamente essa propriedade da folha. Inversamente à transmitância, menores absorvâncias (Figura 5A) foram encontradas, justificando, em

parte, as menores taxas fotossintéticas apresentadas por plantas WT e *gib3* quando em presença de GAs (Figura 3A); uma possível explicação para este resultado seria a que plantas tratadas com GAs tiveram uma maior diluição de seus pigmentos em vista de uma maior área foliar em relação aos demais tratamentos. De forma geral, pequenas mudanças nos conteúdos de metabolitos em função das mudanças nos conteúdos de GAs impostas pelos diferentes tratamentos foram observadas. Considerando que o amido é uma forma transitória de armazenamento de carbono, que se acumula nas folhas durante o dia e é remobilizado para suportar o crescimento e metabolismo durante a noite (Smith & Stitt, 2007; Stitt & Zeeman, 2012) menores níveis de amido, mesmo em plantas com maiores taxas fotossintéticas, sugerem que alterações nos níveis de GAs ocasionem um desbalanço acentuado entre crescimento e metabolismo de carbono. O acúmulo de hexoses (glicose e frutose, Figuras 7C e 7D, respectivamente) foi elevado em plantas WT e *gib3* tratadas com GAs cujas taxas fotossintéticas foram reduzidas e o crescimento acentuado. O oposto foi encontrado em plantas tratadas com o inibidor da biossíntese de GA, em que maiores taxas fotossintéticas não resultaram em maior crescimento em altura. Registre-se que o metabolismo do carbono (fotossíntese, catabolismo e alocação) são altamente regulados via *feedback* pela sinalização por açúcares. Em geral, as atividades da força fonte, tais como a fotossíntese, a mobilização de nutrientes e de exportação são positivamente reguladas sob condições de baixo conteúdo de açúcares, enquanto as atividades dreno como crescimento e armazenamento são superreguladas quando as fontes de carbono são abundantemente disponíveis (Paul & Foyer, 2001; Rolland et al., 2006). Outro destaque fica para o teor de fumarato que em plantas WT tratadas com GA isoladamente foi consideravelmente elevado. Assemelhando-se aos resultados apresentados, o acúmulo de fumarato em folhas foi previamente descrito como necessário para a rápida assimilação de nitrogênio

e crescimento, particularmente em condições em que o nitrogênio não é limitante (Pracharoenwattana et al., 2010). Nesse contexto, os elevados níveis de fumarato observados podem estar associados a uma maior assimilação e uso de nitrogênio, embora nenhuma variação tenha sido observada nos níveis de clorofilas e algumas no nível de aminoácidos. Dentre os nucleotídeos de piridina (Figura 11), foram observadas alterações em nos conteúdos de NADPH (Figura 10D), principalmente no tratamento contendo PBZ. A redução desse composto ocorre em nível da fase fotoquímica da fotossíntese e foi condizente com os valores encontrados em A_N (Figura 3A). O mesmo pode ser utilizado no ciclo de Calvin-Benson durante a fase de redução do CO_2 ou ser oxidado diretamente pelas oxidases alternativas presentes na membrana interna da mitocôndria, o que também corrobora os dados de maiores taxa respiratórias (Figura 3B) aqui apresentados. Variações na razão NADP/NADPH demonstram que há um desbalanço no estado redox das plantas (Schippers et al., 2008), o que foi observado neste trabalho em função da variação do nível endógeno de GAs. Variações na razão $NADP^+/NADPH$ estão diretamente associadas com mudanças no estado fisiológicos das plantas (Rasmusson et al., 2008; Liu et al., 2009). Quando há incremento na razão $NADP^+/NADPH$, ocorre uma indução de genes da fase de transição floral (Liu et al., 2009), reduzindo assim o crescimento. No entanto, essa relação não foi observada nesse trabalho, uma vez que plantas tratadas com PBZ apresentaram menor crescimento e uma reduzida razão $NADP^+/NADPH$. Saliente-se, portanto, que a transição do estado vegetativo para o reprodutivo não é influenciada apenas pela razão $NADP^+/NADPH$, mas também por outros fatores tais como: fotoperíodo, idade da planta, rota autônoma e giberelina (Lee & Lee, 2010). Registre-se, também que a comunicação entre organelas pode ser realizada mediante essas alterações redox (Huner et al., 1998; Fernández &

Strand, 2008; Bräutigam et al., 2009) que poderia explicar, ao menos parcialmente, as variações metabólicas observadas.

Em síntese, os resultados ora apresentados indicam que as variações endógenas e artificiais nos níveis de GA estiveram associadas a mudanças no crescimento. Essas mudanças, no entanto não estiveram diretamente associadas a alterações nas taxas fotossintéticas e respiratórias, que foram afetadas semelhantemente as alterações anatômicas. Registre-se que alterações nos níveis de GAs não estiveram associadas a limitações fotoquímicas conforme observados pela pouca ou nenhuma alteração na razão F_v/F_m . Também não foram observadas correlações entre maiores A_N com conteúdo de pigmentos e a atividade máxima de algumas enzimas aqui avaliadas. Alterações metabólicas, principalmente em relação aos açúcares solúveis, e anatômicas também ocorreram de modo a promover incrementos nas taxas fotossintéticas. No entanto, essa maior assimilação de carbono não foi traduzida em acúmulo de biomassa. Plantas com maiores A_N apresentaram uma maior taxa respiratória, assim como reduções no conteúdo de amido, sugerindo um desvio de energia para outras vias metabólicas, desacoplando assim, o metabolismo do carbono do crescimento. A ocorrência de estresse em função da manipulação dos níveis de GAs não foi observada, visto que alterações nos níveis de pigmentos fotoprotetores e no sistema antioxidante não foram encontradas. Não obstante, as informações obtidas neste trabalho não só confirmam alguns dos resultados encontrados no Capítulo I, com também os complementam, permitindo assim avanços significativos no entendimento no que tanger a manipulação desse hormônio.

3.5) Referências

- Achard P, Genschik P** (2008) Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot* **60**: 1085-1092
- Achard P, Renou J, Berthomé R, Harberd NP, Genschik P** (2008) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol* **18**: 656-660
- Almeida JAS, Pereira MFDA** (1997) Efeito de GA₃ e paclobutrazol no desenvolvimento vegetativo do girassol. *Rev Bras Fisiol Veg* **9**: 55-60
- Araújo W, Nunes-Nesi A, Fernie A** (2013) On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions. *Photosynth Res* DOI: 10.1007/s11120-11013-19807-11124
- Araújo WL, Fernie AR** (2012) Systems biology of gibberellin induced plant cell growth. *Front Plant Science* **3**: 1-8
- Araújo WL, Tohge T, Osorio S, Lohse M, Balbo I, Krahnert I, Sienkiewicz-Porzucek A, Usadel B, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2012) Antisense inhibition of the 2-Oxoglutarate dehydrogenase complex in tomato demonstrates its importance for plant respiration and during leaf senescence and fruit maturation. *Plant Cell* **24**: 2328-2351
- Asada K** (1992) Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* **85**: 235-241
- Berger D, Altmann T** (2000) A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **14**: 1119-1131
- Berova M, Zlatev Z** (2000) Physiological response and yield of paclobutrazol treated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Growth Reg* **30**: 117-123
- Biemelt S, Tschiersch H, Sonnewald U** (2004) Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol* **135**: 254-265
- Björkman O, Demmig B** (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**: 489-504
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Bräutigam K, Dietzel L, Kleine T, Ströher E, Wormuth D, Dietz K, Radke D, Wirtz M, Hell R, Dörmann P, Nunes-Nesi A, Schauer N, Fernie AR, Oliver SN, Geigenberger P, Leister D, Pfannschmidt T** (2009) Dynamic plastid redox signals integrate gene expression and

- metabolism to induce distinct metabolic states in photosynthetic acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 2715-2732
- Busov V, Meilan R, Pearce DW, Rood SB, Ma CP, Tschaplinski TJ, Strauss SH** (2006) Transgenic modification of *gai* or *rgl1* causes dwarfing and alters gibberellins, root growth, and metabolite profiles in *Populus*. *Planta* **224**: 288-299
- Cakmak I, Horst WJ** (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol Plant* **83**: 463-468
- Carriello F, Miranda FG, Ponzoni FJ, A CC, Martins SP** (2003) Uso da transmitância na caracterização espectral de folhas verdes. *Anais XI SBSR*: 2451-2457
- DaMatta F, Loos R, Silva E, Loureiro M, Ducatti C** (2002) Effects of soil water deficit and nitrogen nutrition on water relations and photosynthesis of pot-grown *Coffea canephora* Pierre. *Trees* **16**: 555-558
- Davière J, de Lucas M, Prat S** (2008) Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. *Curr Opin Genet Dev* **18**: 295-303
- Dijkstra P, Ter Reegen H, Kuiper PJC** (1990) Relation between relative growth rate, endogenous gibberellins, and the response to applied gibberellic acid for *Plantago major*. *Physiologia Plantarum* **79**: 629-634
- Fernández AP, Strand A** (2008) Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 509-513
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ** (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* **212**: 250-263
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Höhne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M** (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* **16**: 3304-3325
- Hedden P, Phillips AL** (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* **5**: 523-530
- Hedden P, Thomas SG** (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J* **444**: 11-25
- Huner NPA, Öquist G, Sarhan F** (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci* **3**: 224-230
- Jahns P, Holzwarth AR** (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1817**: 182-193

- Jaleel CA, Manivannan P, Sankar B, Kishorekumar A, Sankari S, Panneerselvam R** (2007) Paclobutrazol enhances photosynthesis and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. *Process Biochem* **42**: 1566-1570
- Jan A, Nakamura H, Handa H, Ichikawa H, Matsumoto H, Komatsu S** (2006) Gibberellin regulates mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity in rice. *Plant Cell Physiol* **47**: 244-253
- Jenner HL, Winning BM, Millar AH, Tomlinson KL, Leaver CJ, Hill SA** (2001) NAD malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. *Plant Physiol* **126**: 1139-1149
- Jiao J, Tsujita MJ, Murr DP** (1986) Effects of paclobutrazol and A-Rest on growth, flowering, leaf carbohydrate and leaf senescence in 'Nellie White' Easter lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). *Sci Horti* **30**: 135-141
- Krauss A, Marschner H** (1982) Influence of nitrogen nutrition, daylength and temperature on contents of gibberellic and abscisic acid and on tuberization in potato plants. *Potato Res* **25**: 13-21
- Lee J, Lee I** (2010) Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *J Exp Bot* **61**: 2247-2254
- Leegood RC, Walker DA** (1980) Autocatalysis and light activation of enzymes in relation to photosynthetic induction in wheat chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* **200**: 575-582
- Li J, Sima W, Ouyang B, Wang T, Ziaf K, Luo Z, Liu L, Li H, Chen M, Huang Y, Feng Y, Hao Y, Ye Z** (2012) Tomato SIDREB gene restricts leaf expansion and internode elongation by downregulating key genes for gibberellin biosynthesis. *J Exp Bot* **63**: 6407-6420
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME** (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ Exp Bot* **47**: 239-247
- Liu YJ, Nunes-Nesi A, Wallström SV, Lager I, Michalecka AM, Norberg FE, Widell S, Fredlund KM, Fernie AR, Rasmusson AG** (2009) A redox-mediated modulation of stem bolting in transgenic *Nicotiana sylvestris* differentially expressing the external mitochondrial NADPH dehydrogenase. *Plant Physiol* **150**: 1248-1259
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410
- Nagel OW, Konings H, Lambers H** (2001) Growth rate and biomass partitioning of wildtype and low-gibberellin tomato (*Solanum lycopersicum*) plants growing at a high and low nitrogen supply. *Physiol Plant* **111**: 33-39

- Nagel OW, Lambers H** (2002) Changes in the acquisition and partitioning of carbon and nitrogen in the gibberellin-deficient mutants A70 and W335 of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Cell Environ* **25**: 883-891
- Nir I, Moshelion M, Weiss D** (2013) The *Arabidopsis* GIBBERELLIN METHYL TRANSFERASE 1 suppresses gibberellin activity, reduces whole-plant transpiration and promotes drought tolerance in transgenic tomato. *Plant Cell Environ* DOI: 10.1111/pce.12135
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J* **50**: 1096-1106
- Olszewski N, Sun T, Gubler F** (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* **14 Suppl**: S61-80
- Paul MJ, Foyer CH** (2001) Sink regulation of photosynthesis. *J Exp Bot* **52**: 1383-1400
- Porra R, Thompson W, Kriedemann P** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **975**: 384-394
- Pracharoenwattana I, Zhou W, Keech O, Francisco PB, Udomchalothorn T, Tschöep H, Stitt M, Gibon Y, Smith SM** (2010) *Arabidopsis* has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *Plant J* **62**: 785-795
- Rasmusson AG, Geisler DA, Møller IM** (2008) The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion* **8**: 47-60
- Resende MLV, Salgado SML, Chaves ZM** (2003) Espécies reativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatol Bras* **28**: 123-130
- Ribeiro DM, Araújo WL, Fernie AR, Schippers JHM, Mueller-Roeber B** (2012a) Action of gibberellins on growth and metabolism of *Arabidopsis* plants associated with high concentration of carbon dioxide. *Plant Physiol* **160**: 1781-1794
- Ribeiro DM, Araújo WL, Fernie AR, Schippers JHM, Mueller-Roeber B** (2012b) Transcriptome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **63**: 2769-2786
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 675-709
- Scandalios JG** (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* **101**: 7-12

- Scheibe R, Stitt M** (1988) Comparison of NADP-malate dehydrogenase activation QA reduction and O₂ evolution in spinach leaves. *Plant Physiol Biochem* **26**: 473-481
- Schippers JHM, Nunes-Nesi A, Apetrei R, Hille J, Fernie AR, Dijkwel PP** (2008) The *Arabidopsis* onset of leaf death5 mutation of quinolinate synthase affects nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and causes early ageing. *The Plant Cell Online* **20**: 2909-2925
- Schwechheimer C, Willige BC** (2008) Shedding light on gibberellic acid signalling. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 57-62
- Sienkiewicz-Porzucek A, Nunes-Nesi A, Sulpice R, Lisec J, Centeno DC, Carillo P, Leisse A, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR** (2008) Mild reductions in mitochondrial citrate synthase activity result in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on photosynthetic performance or growth. *Plant Physiol* **147**: 115-127
- Sims DA, Gamon JA** (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remot Sens Environ* **81**: 337-354
- Smith AM, Stitt M** (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* **30**: 1126-1149
- Souza RP, Valio IFM** (2003) Seedling growth of fifteen Brazilian tropical tree species differing in successional status. *Rev Bras Bot* **26**: 35-47
- Stitt M, Zeeman SC** (2012) Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 282-292
- Stowe BB, Yamaki T** (1959) Gibberellins: stimulants of plant growth. *Science* **129**: 807-816
- Sulpice R, Tschoep H, Von Korff M, Bussis D, Usadel B, Hohne M, Witucka-Wall H, Altmann T, Stitt M, Gibon Y** (2007) Description and applications of a rapid and sensitive non-radioactive microplate-based assay for maximum and initial activity of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Cell Environ* **30**: 1163-1175
- Suo H, Ma Q, Ye K, Yang C, Tang Y, Hao J, Zhang ZJ, Chen M, Feng Y, Nian H** (2012) Overexpression of AtDREB1A causes a severe dwarf phenotype by decreasing endogenous gibberellin levels in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plos One* **DOI**: 10.1111/pce.12135
- Tuna AL, Kaya C, Dikilitas M, Higgs D** (2008) The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. *Environ Exp Bot* **62**: 1-9

- Von Groll U, Berger D, Altmann T** (2002) The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during *Arabidopsis* stomatal development. *Plant Cell* **14**: 1527-1539
- Wang Y, Deng D, Ding H, Xu X, Zhang R, Wang S, Bian Y, Yin Z, Chen W** (2013) Gibberellin biosynthetic deficiency is responsible for maize dominant dwarf11(D11) mutant phenotype: physiological and transcriptomic evidence. *PloS One* doi: 10.1371/journal.pone.0066466
- Weiss D, Ori N** (2007) Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Plant Physiol* **144**: 1240-1246
- Wolters H, Jürgens G** (2009) Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat Rev Genet* **10**: 305-317
- Yamaguchi S** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 225-251
- Yuan L, Xu D-Q** (2001) Stimulation effect of gibberellic acid short-term treatment on leaf photosynthesis related to the increase in Rubisco content in broad bean and soybean. *Photosynthesis Research* **68**: 39-47
- Zheng R, Wu Y, Xia Y** (2012) Chlorocholine chloride and paclobutrazol treatments promote carbohydrate accumulation in bulbs of *Lilium Oriental* hybrids 'Sorbonne'. *J Zhejiang Univ Sci B* **13**: 136-144

3.6) Conclusões gerais e perspectivas

A redução dos níveis de giberelina endógeno e/ou artificial afetou negativamente os parâmetros de crescimento de plantas de tomate. Contudo, essa redução não foi acompanhada de reduções nas taxas fotossintéticas. De modo curioso, plantas com menor crescimento apresentaram maiores taxas de assimilação de CO₂. Em plantas com redução endógena de GAs, uma estreita relação entre maiores taxas de A_N e R_d e reduções nos teores de amido foi observada. A grande produção de energia em forma de ATPs, contudo, não se traduziu em incorporação de matéria seca, sugerindo assim um desacoplamento do metabolismo do carbono e crescimento. Ademais essa redução do amido ocorreu concomitantemente a reduções de aminoácidos e elevação do teor de

proteína, caracterizando assim, um desbalanço entre metabolismo do carbono e do nitrogênio, com desvios de esqueletos de carbono para a possível manutenção de outras rotas metabólicas. Plantas com reduzido conteúdo de GAs apresentaram modificações anatômicas e morfológicas que, justificam ao menos em parte, a elevada A_N . Ressalta-se que maior assimilação de CO_2 ocorreu conjuntamente com maiores densidade e abertura estomática, assim como uma maior concentração de pigmentos, mesmo não sendo observadas alterações no conteúdo dos mesmos. Alterações endógenas e/ou artificiais promovem diversas mudanças no metabolismo, fisiologia e anatomia das plantas, no entanto, essas alterações parecem não ocasionar situações de estresse aparente, visto que pouca ou nenhuma alteração em F_v/F_m e no sistema antioxidativo foram encontradas. Registre-se que alterações os níveis de GAs tem levado a alterações na tolerância de diversas espécies vegetais a situações de estresse (e.g., salino, hídrico, etc.). Concomitantemente a essas informações, os resultados aqui apresentados sugerem que trabalhos futuros devam se concentrar na resposta de plantas com alterações nos níveis/sinalização por GAs a condições de estresse. O efeito da elevação da concentração de CO_2 atmosféricos, por exemplo, tem sido estudada em planta de *Arabidopsis* associada a manipulação dos níveis de GAs tendo apresentado resultados expressivos tanto a nível metabólico quanto moleculares no que tange a regulação dos efeitos de GAs em plantas (Ribeiro et al., 2012a). Ademais, plantas de tomate com reduzido conteúdo de GAs apresentaram uma menor taxa transpiratória, tornando-se mais tolerante ao déficit hídrico (Nir et al., 2013). Assim, um melhor entendimento das relações entre fatores ambientais e sinalização hormonal torna-se uma valiosa ferramenta de previsão do comportamento de algumas espécies mediante as crescentes mudanças climáticas observadas.