

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/02/2021.

CÁLCIO E SINALIZAÇÃO DO RESTABELECIMENTO VEGETAL APÓS ESTRESSE MECÂNICO

FELIPE GIROTTO CAMPOS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas
(Botânica), Área de concentração: Fisiologia
do metabolismo vegetal

BOTUCATU – SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

CÁLCIO E SINALIZAÇÃO DO RESTABELECIMENTO
VEGETAL APÓS ESTRESSE MECÂNICO

FELIPE GIROTTO CAMPOS

PROFA. DRA. CARMEN SÍLVIA FERNANDES BOARO
ORIENTADORA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Fisiologia do metabolismo vegetal

BOTUCATU – SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Campos, Felipe Giroto.

Cálcio e sinalização do restabelecimento vegetal após estresse mecânico /
Felipe Giroto Campos. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Carmen Sílvia Fernandes Boaro
Capes: 20303009

1. Anonacea. 2. *Lycopersicon esculentum*. 3. Expressão gênica. 4.
Antioxidantes. 5. Fotossíntese.

Palavras-chave: *Annona emarginata*; *Solanum lycopersicum* Micro-Tom; expressão
gênica; fotossíntese; sistema antioxidantes.

Dedico

*À minha mãe Maria de
Fatima Giroto, ao meu irmão
Breno Giroto Campos ao meu avô
Ernesto Giroto, que me guia do
céu, e ao meu padrinho Daniel
Antonio Giroto pelo apoio
incondicional e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À CAPES e CNPq pela concessão da bolsa de estudo e ao auxílio financeiro concedido (processo CNPq 140103/2016-3).

Ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

À Deus pela luz, inspiração e determinação para a realização deste estudo.

À professora doutora Carmen Sílvia Fernandes Boaro pela orientação e amizade construída nesses quase 8 anos e por confiar em mim para realização deste estudo.

À professora doutora Gisela Ferreira, pela amizade e por seu fascínio pelas Annonaceae que me contagiou. Não tenho dúvida de que essa família já faz parte da minha vida.

Ao professor doutor Edvaldo Aparecido Amaral da Silva por disponibilizar seu laboratório para a realização de análises moleculares e estar sempre disponível para auxiliar.

À professora doutora Tatiane Maria Rodrigues, por disponibilizar seu laboratório e auxiliar nas análises histoquímicas.

Nunca poderei deixar de agradecer às professoras e amigas Conceição Aparecida Cossa e Maria Aparecida Fonseca Sorace, que sempre confiaram mim. Elas foram fundamentais por meu ingresso no mundo científico e pela realização desse sonho.

Aos meus amigos, Amanda Cristina Esteves Amaro Baron e Daniel Baron, pelo apoio incondicional, em especial nos momentos difíceis.

Aos meus amigos e integrantes de república Sergio Akira Adachi e Luís Paulo Benetti Mantoan, que suas amizades foram e são muito importantes para mim e me ajudaram a vencer essa fase da minha vida.

A minha amiga Maria Ap. Ribeiro Vieira, por todo auxílio e parceria em todas as atividades propostas, até mesmo naquelas que se mostravam impossíveis.

A minha amiga Marília Caixeta Sousa, por toda a parceria, auxílio e execução das análises bioquímicas.

A minha amiga Diana Pacheco Seixas, pela parceria e auxílio no processamento das amostras de histoquímica e interpretação dos resultados desse estudo.

Aos meus amigos Cecília Couto, PIBIC Jr e Alberto Mongolo Júnior pelo auxílio durante a execução desse trabalho.

A Karina Renostro Ducatti que me auxílio nas análises moleculares.

Não posso deixar de agradecer todos os técnicos, amigos e professores do departamento. A presença e amizade de vocês tornaram os dias mais agradáveis e me auxiliaram na execução desse estudo.

Ao Núcleo de Produção de Mudas de São Bento do Sapucaí, CATI (Coordenadoria de Assistência Técnica e Integrada), São Bento do Sapucaí, SP, em especial, à Dra. Silvana Catarina Sales Bueno e ao Sr. Amélio José Berti, pelo fornecimento das mudas de *Annona emarginata*.

À minha mãe, Maria de Fatima Giroto e ao meu irmão, Breno Giroto Campos por serem meus portos seguros de onde retiro toda a força e determinação para superar todos os obstáculos e que não foram poucos.

Ao meu tio e padrinho, Daniel Antônio Giroto, de onde retiro todos os exemplos paternos.

Aos meus avôs maternos, Ernesto Giroto que do céu me ilumina e protege e Maria Vello Giroto que sempre me apoiaram.

Aos meus primos Elizabete Antônia Giroto, Maria Clara Giroto de Faria e Walter de Faria pelo total apoio e presença nessa minha caminhada.

Aos meus tios Luis A. Giroto e Luzia Aparecida Giroto, que sempre acreditaram em mim.

Muito obrigado!

“Hoje

*sou um estranho para mim mesmo sempre fui mudei tanto
como poderia me reconhecer?*

*comemoramos o dia que viemos para este mundo, mas e as
outras tantas vezes que nascemos?*

*das coisas que nunca gostei que hoje amo sons, imagens,
cheiros e temperos das pessoas que amava e abandonei
covardemente nada tem volta*

*o contraste entre aquele que sou e aquele que fui é imenso
nada mais natural a fotografia desbota com o tempo se torna
um grande borrão*

Entramos apenas uma única vez no rio

*Olhe-se bem no espelho, mas não se apegue àquela figura
é a última vez que você verá aquele completo estranho na sua
frente.”*

Breno Giroto

*“A tarefa não é tanto ver aquilo
que ninguém viu, mas pensar o
que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

Sumário

Resumo.....	6
Abstract	8
Introdução	9
Objetivos, perguntas e hipótese.....	16
Capítulo 1: Cálcio no restabelecimento fotossintético após dano mecânico.....	18
Resumo.....	18
Abstract	19
Introdução	20
Material e métodos.....	21
Resultados	25
Discussão.....	35
Conclusão.....	40
Bibliografia	41
Capítulo 2: Cálcio e expressão gênica na sinalização e aclimatação fotossintética após dano mecânico	44
Resumo.....	44
Abstract	45
Introdução	46
Material e métodos.....	48
Resultado.....	54
Conclusão.....	79
Bibliografia	80
Considerações finais.....	86
Anexo	89
Bibliografia	90

Resumo

Cálcio apresenta função estrutural, na parede celular, atua na manutenção da estabilidade da membrana plasmática e é mensageiro secundário, envolvido na regulação de processos fisiológicos do desenvolvimento e em respostas a estresses. No dano mecânico, espécies reativas de oxigênio (ERO) auxiliam no afrouxamento da parede celular e na abertura de canais de Ca^{2+} do retículo endoplasmático e o aumento de Ca^{2+} no citoplasma gera uma cascata de sinais mediados por hormônios, ERO, peroxidases e cálcio-calmodulina. Além disso, o Ca^{2+} é de fundamental importância para o funcionamento do fotossistema II (PSII), uma vez que, sua variação pode interferir na cadeia transportadora de elétrons. O objetivo deste estudo foi investigar a influência da variação de cálcio na sinalização de defesa de plantas de crescimento lento e rápido e submetidas a dano mecânico. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições, em esquema fatorial, onde as plantas foram cultivadas com 0, 2 e 4 mM de Ca^{2+} , com e sem dano mecânico e cinco épocas de avaliação, realizadas aos 0, 15, 30, 60 e 90 dias após o dano mecânico. Com a espécie de crescimento lento, *Annona emarginata*, foram estudados fotossíntese (fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas), massa seca total, crescimento quantitativo e peroxidação lipídica. No *Solanum lycopersicum* Micro-Tom, espécie de crescimento rápido, expressão de genes de estresses, enzimas antioxidantes, peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica, histoquímica de peróxido de hidrogênio, fotossíntese (fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas) e massa seca dos diferentes órgãos foram avaliados. Os resultados permitiram concluir que as plantas de *Annona emarginata* apresentaram maior resistência ao dano mecânico na presença de cálcio e foram mais sensíveis na ausência do mineral. Cultivo dessa espécie com 2 mM de cálcio na solução nutritiva completa garantiu crescimento e restabelecimento fotossintético do vegetal submetido a dano mecânico. Quanto ao *Solanum lycopersicum* Micro-Tom, os

resultados sugerem que peróxido de hidrogênio está envolvido na resposta ao dano mecânico em plantas sem cálcio. Nessa espécie, presença de cálcio foi importante na defesa e aclimação fotossintética após dano mecânico e 2 mM de cálcio na solução nutritiva foram suficientes para defesa e superação do estresse por dano mecânico.

Palavras-chaves: *Annona emarginata*, *Solanum lycopersicum* Micro-Tom, expressão gênica, sistema antioxidantes, fotossíntese

Abstract

Calcium presents structural function in the cell wall, it acts in the maintenance of the stability of the plasma membrane and is secondary messenger, involved in the regulation of physiological processes of development and in responses to stresses. In mechanical damage, reactive oxygen species (ROS) assist in the loosening of the cell wall and in the opening of Ca^{2+} channels of the endoplasmic reticulum, and the increase of Ca^{2+} in the cytoplasm generates a cascade of signals mediated by hormones, ROS, peroxidases and calcium-calmodulin. In addition, Ca^{2+} is of fundamental importance for the functioning of photosystem II (PSII), since its variation can interfere with the electron transport chain. The objective of this study was to investigate the influence of calcium variation on defense signaling of slow and fast growing plants and submitted to mechanical damage. The experimental design was a randomized block, with four replications in a factorial design, where the plants were cultured with 0, 2 and 4 mM Ca^{2+} with and without mechanical damage five evaluation times were made at 0, 15, 30, 60 and 90 days after mechanical damage. With the slow-growing species, *Annona emarginata*, photosynthesis (chlorophyll a fluorescence and gas exchange), total dry mass, quantitative growth and lipid peroxidation were studied. The results allowed to conclude that the *Annona emarginata* plants presented greater resistance to the mechanical damage in the presence of calcium and were more sensitive in the absence of the mineral. Cultivation of this species with 2 mM Ca^{2+} in the complete nutrient solution ensured the growth and photosynthetic reestablishment of the plant submitted to mechanical damage. As for *Solanum lycopersicum* Micro-Tom, the results suggest that hydrogen peroxide is involved in the response to mechanical damage in plants without calcium. In this species, the presence of calcium was important in the defense and photosynthetic acclimation after mechanical damage and 2 mM Ca^{2+} in the nutrient solution were enough for defense and overcoming stress due to mechanical damage.

Introdução

O cálcio é um elemento essencial que apresenta função estrutural, ligando-se a pectatos na parede celular, atua na manutenção da estabilidade da membrana plasmática (BAI et al., 2009) e é mensageiro secundário, envolvido na regulação de processos fisiológicos (DENNESS et al., 2011).

Variação deste elemento pode desencadear inúmeros processos morfofisiológicos como divisão e alongamento celular, polarização e alongamento do tubo polínico, ramificação de raízes, germinação de sementes, fotossíntese, movimento estomático, resposta aos tropismos, senescência, apoptose, estando envolvido também no ritmo circadiano, que controla vários processos fisiológicos.

A sinalização do cálcio no desenvolvimento vegetal é modulada por sua concentração no citoplasma. Influxo e efluxo de cálcio no citosol são mediados por canais e transportadores de Ca^{2+} localizados nas membranas celulares, de modo a manter bem controlada a concentração desse íon no citoplasma (BUSH, 1995; BOGESKI et al., 2011).

Os canais de liberação de Ca^{2+} têm importante função na sinalização a longa distância por meio da entrada e saída do íon, o que permite a propagação de sinais elétricos na membrana plasmática e respostas hormonais, necessárias nos processos que envolvem o Ca^{2+} como mensageiro secundário (STEINHORST; KUDLA, 2014). Sendo assim, o cálcio, e os hormônios atuam na sinalização, na superação de estresses abióticos e bióticos e no controle da fotossíntese (UGGLA et al., 1996; OGAWA et al., 2003; FUKUDA, 2004; GAO et al., 2008; XU; LI; ZHANG, 2013; ZHOU; SONG; XUE, 2013; HOCHMAL et al., 2015). Esse íon desempenha papel na atividade de enzimas antioxidantes e como consequência, pode auxiliar na redução de peroxidação lipídica, permitindo maior tolerância ao estresse (SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011; SIDDIQUI et al., 2012; XU et al., 2013).

Ação do cálcio na indução de tolerância ao estresse por metal pesado foi estudada em *Triticum aestivum*, por toxicidade ao níquel (SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011). Da mesma forma, cálcio sinalizou expressão gênica e ativação de enzimas antioxidantes para neutralização das espécies reativas de oxigênio (ERO). Deve ser ressaltado que as plantas foram tolerantes ao níquel e apresentaram maior taxa fotossintética (YANG et al., 2014).

Na fase inicial do estresse há produção de O_2^- e H_2O_2 e aumentos de espécies reativas de oxigênio (SUZUKI; MITTLER, 2012), que atuam na abertura de canais de Ca^{2+} e promovem aumento momentâneo desse íon no citoplasma. Nessas condições, a proteína RbohD (*Respiratory burst oxidase homologs-D*), responsável pela geração de superóxido e peróxido de hidrogênio por meio da oxidação de $NADPH+H^+$, é ativada de forma direta. De forma indireta, o Ca^{+2} ativa proteínas quinases (CPK5/26) e CBL1/9 responsáveis pela ativação da proteína RbohD (MITTLER et al., 2011; TAKAHASHI et al., 2011; GILROY et al., 2014, 2016) (Fig. 1).

No estresse por dano mecânico, RbohD é requerido para rápida síntese e acúmulo de ERO nos espaços extracelulares na região distal do ferimento. (MITTLER et al., 2011; TAKAHASHI et al., 2011; GILROY et al., 2014), que pode ser convertido em resposta radial propagada entre células vizinhas de xilema, pela liberação do Ca^{2+} a partir do transportador GLRs (*glutamate receptor-like channels*). Sugere-se que esse mecanismo interligue os sinais gerados pelo Ca^{2+} e ERO (STEINHORST; KUDLA, 2014) Além disso, a proteína Zat12, cuja expressão depende de RbohD é induzida poucos minutos após o dano mecânico, sendo responsável pela sinalização dos processos de remediação ao estresse (TAKAHASHI et al., 2011).

Aplicação de Ca^{2+} pode também estimular a atividade de peroxidases do apoplasto, ancoradas na parede celular por pectatos de cálcio (MIKA; BUCK; LÜTHJE,

2008; PLIETH; VOLLBEHR, 2012; MINIBAYEVA; BECKETT; KRANNER, 2015), auxiliando a neutralização de espécies reativas de oxigênio provenientes do dano mecânico.

No citoplasma, as proteínas que se ligam ao Ca^{2+} são o primeiro alvo de seus sinais. Entre elas estão as calmodulinas (CaMs), CaM-like, calcinerina B-like (CBL) e proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} (CDPKs) (WHITE; BROADLEY, 2003). As proteínas CaMs e CaM-like estão envolvidas nos processos de desenvolvimento, controlando a expressão gênica (BOUCHÉ et al., 2002; DOHERTY et al., 2009), assim como em adaptações a ambientes adversos e respostas à patógenos. As proteínas calcinerina B-like e quinases dependentes de Ca^{2+} implementam os sinais de Ca^{2+} no citoplasma por meio da fosforilação, desempenhando ação em cascatas de sinalização, induzidas, por exemplo, por frio, seca, salinidade, ferimento e deficiência nutricional (WHITE; BROADLEY, 2003).

A presença de Ca^{2+} no citoplasma ligado à CaM induz melhor ligação dos brassinosteroides aos seus receptores, atuando na regulação da diferenciação celular (HARDTKE et al., 2007; ZHOU; SONG; XUE, 2013) e em mecanismos de superação de estresses bióticos e abióticos (OH et al., 2012). Aplicação de brassinosteroides em milho promoveu aumento da expressão do gene *ZmCCaMK* e maior atividade da proteína ZmCCaMK, decodificadora de Ca^{2+} para sinalização de enzimas antioxidantes envolvidas com o controle de espécies reativas de oxigênio (YAN et al., 2015).

Estresse mecânico ao desencadear aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO), provoca seu rápido reconhecimento, auxiliando a transmissão de sinal e ativação de vias de defesas, que integram cálcio (Ca^{2+}), proteínas fosforiladas (quinases) e hormônios, ácidos jasmônico, salicílico e abscísico (SEO et al., 2007; TAKAHASHI et al., 2011; STEINHORST; KUDLA, 2014). Aumento momentâneo de cálcio no citoplasma, cria a oscilação responsável pela ativação de proteínas como calmodulinas (CaMs), CaM-

likes, calcinerina B-like e proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) (BOUCHÉ et al., 2002). Níveis elevados de Ca^{2+} e ERO proporcionam na célula a ativação da quinase MPK que se liga a um fosfato e à calmodulina dependente de cálcio, para regular o acúmulo de ERO provenientes de estresse (TAKAHASHI et al., 2011).

Quinases MPK são sinalizadas pelos brassinosteroides provenientes de dano mecânico ou estresse oxidativo (TAKAHASHI et al., 2011; ZHOU et al., 2014; XU; ZHANG, 2015). Proteína quinase induzida por dano mecânico (WIPK) ou por ácido jasmônico (SIPK) foi identificada em plantas de tabaco (ASAI; OHTA; YOSHIOKA, 2008).

Aplicação de ácido abscísico sinaliza cascata de quinases, MAPKKKs, MAPKKs, MAPKKs e MAPK específicas para sinalização de estresse, que atua na imunidade inata (JAMMES et al., 2009). Estudos referem entre as causas de estresse, ferimento, temperatura, seca, metais pesados, salinidade, oxidativo e osmótico, que ativam vias sinalizadas por cálcio, ERO e hormônios (SMÉKALOVÁ et al., 2014).

Após dano mecânico, por tanto, ocorre aumento de proteínas quinases, ativadas por mitógenos (MAPKs), proteínas quinases, induzidas por ferimento (WIPK), e proteínas quinases, induzidas por aumento das concentrações de ácidos salicílico e jasmônico, responsáveis pela ativação de genes envolvidos na resposta ao ferimento (BALDWIN et al., 1997; SEO et al., 2007; DENNESS et al., 2011; ROMEIS; HERDE, 2014).

Assim, evidencia-se uma cascata de sinalizações mediada por hormônios (CARLSBECKER; HELARIUTTA, 2005), espécies reativas de oxigênio (ERO), peroxidases, cálcio-calmodulina e quinases para superação do estresse mecânico pela planta, de modo, a minimizar os danos causados, aos fotossistemas, entre outros (TAKAHASHI et al., 2011; ZHAO et al., 2013).

O Ca^{2+} também é de fundamental importância para o funcionamento dos fotossistemas, uma vez que, mantem a estabilidade e agregação das moléculas de clorofila no complexo antena (RAMALHO et al., 1995), regula o transporte de elétrons e a síntese de NADPH + H^+ e ATP (HOCHMAL et al., 2015). O Ca^{2+} é também constituinte do complexo de evolução de oxigênio (CEO), responsável pela foto-oxidação da água e doação de elétrons para o fotossistema P680 de modo a manter a cadeia transportadora de elétrons (NAJAFPOUR et al., 2012). Assim, danos no CEO podem estar relacionados com deficiência de cálcio, como observado em plantas de milho e tomate submetidas à deficiência desse elemento (KALAJI et al., 2014).

Além disso, o Ca^{2+} atua no movimento estomático, que influencia o processo de transpiração, assimilação de carbono e eficiência do uso da água (LIU et al., 2013). A atuação desse elemento na abertura e fechamento estomático, indica o desencadeamento de sinais diferentes dependendo da velocidade de oscilação da concentração de cálcio no citoplasma. Rápida oscilação sinaliza abertura estomática e lenta, fechamento estomático (EVANS; MCAINSH; HETHERINGTON, 2001; BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

Deste modo, níveis de Ca^{2+} fornecidos às plantas com dano mecânico sinaliza cascata de eventos para seu restabelecimento, com verificação da ação desse elemento na fotossíntese, com importante papel no funcionamento do fotossistema II (PS 680) (RAMALHO et al., 1995; NAJAFPOUR et al., 2012) e processos dele dependentes.

Considerando o requerimento em minerais das espécies vegetais, estudos prévios referem diferenças no metabolismo de cálcio em plantas com crescimento lento e rápido. *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. Rainer cultivada com 50% da concentração de cálcio, na solução nutritiva completa de Hoagland and Arnon (1950) revelou melhor crescimento e maior taxa de assimilação de carbono, sugerindo eficiência no

aproveitamento dos foto-assimilados e nutrientes absorvidos (BARON et al., 2013), condição atribuída à rusticidade da espécie. Talvez o melhor desempenho de espécies da família Annonaceae encontre explicação no fato de que cristais de oxalato de cálcio observados em folhas e caules (DUARTE; OLIVEIRA; SOUZA, 2015), possam constituir reserva do íon para utilização quando necessário. Há anos reconhece-se a possibilidade de armazenamento reversível de cálcio na forma de oxalato, como observado em *Lemna minor* L. (FRANCESCHI, 1989; TOOULAKOU et al., 2016).

Por outro lado, plantas de crescimento mais rápido, como tomate, com maior consumo de cálcio pelos tecidos revelou elevadas taxas de transpiração e crescimento (TONETTO DE FREITAS et al., 2014).

Comparando-se essas duas espécies que apresentam crescimentos rápido e lento, espera-se que a concentração de cálcio para o adequado restabelecimento vegetal possa ser diferente em condição de estresse.

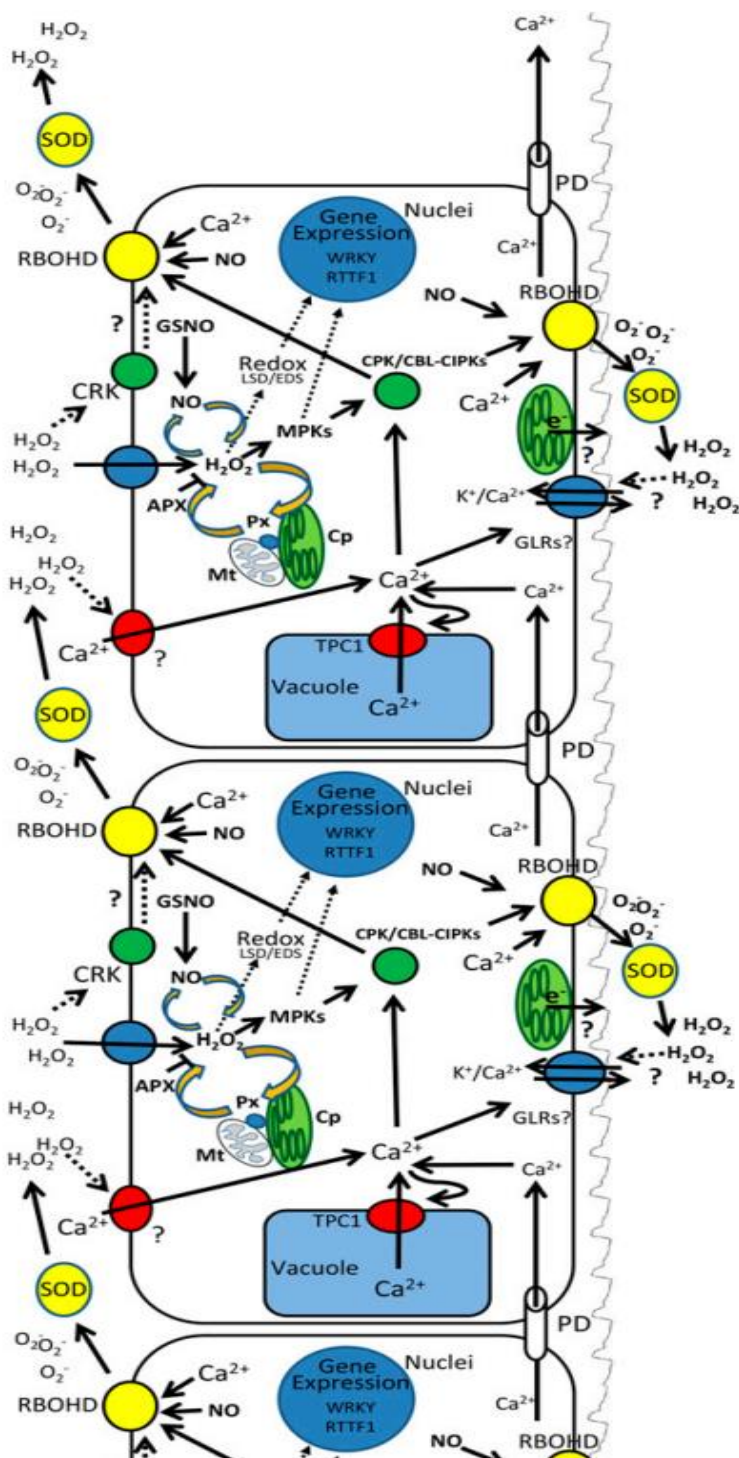


Figura 1: Transmissão do sinal distal célula-célula por meio da integração de ERO, Ca^{2+} e ondas elétricas por ação da proteína RBOH e superóxido dismutases, proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} , canais de cálcio da membrana plasmática, e do vacúolo (TPC1), ativados por cálcio, e transportadores da membrana plasmática (GLRs) ativados por H_2O_2 . Quinases (CPK, CIPKs e MPKs), enzimas antioxidantes (SOD e APx), calmodulina (CBL) e plasmodesmos (PD) (GILROY et al., 2016).

Considerações finais

O mecanismo de superação ao estresse e aclimatação fotossintética após o dano mecânico apresenta estratégia diferente, em plantas com crescimento lento e rápido.

Plantas de *Annona emarginata*, com crescimento lento, quando submetidas à deficiência de cálcio e dano mecânico apresentaram assimilação de carbono menor e taxas assimilatória líquida e de crescimento relativo com rápido decréscimo, indicando aceleração de crescimento. Superação do estresse ocorreu com direcionamento de esqueletos carbônico para o sistema antioxidante, uma vez que não houve diferença de lipoperoxidação na ausência ou presença de cálcio. Como resultado desse direcionamento, houve menor produção de massa seca. Nessas plantas armazenamento de cálcio na forma de cristais pode ter permitido manutenção de algumas funções metabólicas, uma vez que estudo identificado na literatura com *Lemna minor* L. revelou armazenamento reversível de cálcio na forma de oxalato.

Annona emarginata cultivada com cálcio e dano mecânico revelou paralização do crescimento, verificado pelas taxas assimilatória líquida e de crescimento relativo, novamente sugerindo direcionamento de esqueletos carbônicos para superação do dano mecânico, uma vez que os sistemas antioxidante enzimático e não enzimático foram eficientes e os níveis de peroxidação lipídica não variaram.

Dessa forma, o dano mecânico e cálcio estão relacionados com ativação do sistema de defesa. Na ausência do elemento a aceleração do crescimento não influenciou a produção de massa seca, que foi baixa devido ao investimento de recursos para superação desse dano. Nesse caso, cálcio pode ter sido proveniente de cristais de oxalato de cálcio. Na presença de cálcio a paralização do crescimento ocorreu devido ao dano e a cascata de sinalização foi mantida com o elemento fornecido, auxiliando sua superação.

Espécie de crescimento rápido, tomate Micro-Tom, na presença de cálcio e dano mecânico manteve investimento na sinalização e superação do estresse durante grande parte de seu ciclo, o que justifica a menor taxa de assimilação de carbono e massa seca.

As plantas de tomate cultivadas na ausência de cálcio, independente do dano mecânico morreram. No entanto, deve-se salientar que as plantas cultivadas sem cálcio e com dano mecânico sobreviveram mais tempo que as que não receberam o dano, o que pode indicar que as moléculas geradas durante o dano mecânico são importantes sinalizadores para a manutenção da vida, desde que seus níveis sejam controlados pelo sistema antioxidante.

Os resultados das análises moleculares e histoquímica estão de acordo com aqueles observados na fotossíntese e no sistema de defesa antioxidante e nas plantas sem cálcio e com dano mecânico a percepção do estresse levou à sinalização e maiores expressões dos genes alvos, sendo também observado marcação de peróxido de hidrogênio nas paredes celulares das nervuras principais e de menor calibre, indicando que mesmo nas plantas sem cálcio houve sinalização via peróxido de hidrogênio.

No entanto, a ausência de cálcio comprometeu a expressão da calmodulina, que tem função na coordenação da sinalização e superação do estresse. Dessa forma, as plantas sem cálcio e com dano mecânico apesar de terem desencadeado o início da sinalização, não superaram o estresse e morreram.

Plantas cultivadas na presença de cálcio revelaram baixa atividade das enzimas antioxidantes, baixos níveis de peróxido de hidrogênio e de peroxidação lipídica, indicativos de que a presença do cálcio, independente do dano mecânico, manteve as funções metabólicas do vegetal.

A não expressão genica nas plantas cultivadas com cálcio e dano mecânico, talvez se justifique pela presença do íon adiantar a expressão dos genes e não ter sido possível a sua observação nos momentos avaliados, sendo talvez necessárias avaliações em tempos mais curtos.

Sugere-se para experimentos futuros com Micro-Tom aumento do número de avaliações, que realizadas em intervalos menores permitiriam melhor acompanhamento da espécie.

Bibliografia

ASAI, S.; OHTA, K.; YOSHIOKA, H. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. **The Plant cell**, v. 20, n. 5, p. 1390–406, 1 maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18515503>>. Acesso em: 28 jan. 2018.

BAI, J. G.; XU, P. L.; ZONG, C. S.; WANG, C. Y. Effects of Exogenous Calcium on Some Postharvest Characteristics of Cut *Gladiolus*. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, n. 3, p. 293–303, 2009.

BALDWIN, I. T.; ZHANG, Z. P.; DIAB, N.; OHNMEISS, T. E.; MCCLOUD, E. S.; LYND, G. Y.; SCHMELZ, E. A. Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. **Planta**, v. 201, n. 4, p. 397–404, 1997.

BARON, D.; FERREIRA, G.; RODRIGUES, J. D.; BOARO, C. S. F.; MACEDO, A. C. Gas exchange, physiological indexes and ionic accumulation in *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer seedlings in nutrients solution. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 361–376, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452013000200005&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

BOGESKI, I.; KAPPL, R.; KUMMEROW, C.; GULABOSKI, R.; HOTH, M.; NIEMEYER, B. A. Cell Calcium Redox regulation of calcium ion channels: Chemical and physiological aspects. v. 50, p. 407–423, 2011.

BOUCHÉ, N.; SCHARLAT, A.; SNEDDEN, W.; BOUCHEZ, D.; FROMM, H. A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21851–21861, 2002.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS**. John Wiley ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd., 2015.

BUSH, D. S. Calcium Regulation in Plant Cells and its Role in Signaling. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, n. 1, p. 95–122, 1995.

CARLSBECKER, A.; HELARIUTTA, Y. Phloem and xylem specification: Pieces of the puzzle emerge. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 5, p. 512–517, 2005.

DENNESS, L.; MCKENNA, J. F.; SEGONZAC, C.; WORMIT,

A.; MADHOU, P.; BENNETT, M.; MANSFIELD, J.; ZIPFEL, C.; HAMANN, T. Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 156, n. 3, p. 1364–1374, 2011.

DOHERTY, C. J.; VAN BUSKIRK, H. A.; MYERS, S. J.; THOMASHOW, M. F. Roles for Arabidopsis CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. **The Plant cell**, v. 21, n. 3, p. 972–84, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270186>>. Acesso em: 28 jan. 2018.

DUARTE, M. R.; OLIVEIRA, R. B.; SOUZA, D. . Anatomia foliar e caulinar de duas espécies de Rollinia (Annonaceae): *R. rugulosa* E *R. mucosa*. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 3, p. 4–21, 2015.

EVANS, N. H.; MCAINSH, M. R.; HETHERINGTON, A. M. Calcium oscillations in higher plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 4, n. 5, p. 415–420, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VS4-444F51T-9/2/0e0d96a640033426436ceb1dead538a9>>.

FRANCESCHI, V. R. Calcium oxalate formation is a rapid and reversible process in *Lemna minor* L. **Protoplasma**, v. 148, n. 2–3, p. 130–137, jun. 1989. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02079332>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

FUKUDA, H. Signals that control plant vascular cell differentiation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 5, p. 379–391, 2004.

GAO, X.; NAGAWA, S.; WANG, G.; YANG, Z. Cell polarity signaling: Focus on polar auxin transport. **Molecular Plant**, v. 1, n. 6, p. 899–909, 2008.

GILROY, S.; BIA, M.; SUZUKI, N.; GÓRECKA, M.; DEVIREDDY, A. R.; MITTLER, R. Update on Reactive Oxygen Species and Systemic Signaling ROS , Calcium , and Electric Signals : Key Mediators of Rapid Systemic Signaling in Plants. **Plant physiology**, v. 171, n. July, p. 1606–1615, 2016.

GILROY, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; CHOI, W.; TOYOTA, M.; DEVIREDDY, A. R.; MITTLER, R. A tidal wave of signals : calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. v. 19, n. 10, p. 5–7, 2014.

HARDTKE, C. S.; DORCEY, E.; OSMONT, K. S.; SIBOUT, R. Phytohormone collaboration: zooming in on auxin-brassinosteroid interactions. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 10, p. 485–492, 2007.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular**, v. 347, n. 347, p. 1–32, 1950. Disponível em: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/19500302257.html>>.

HOCHMAL, A. K.; SCHULZE, S.; TROMPELT, K.; HIPPLER, M. Biochimica et Biophysica Acta Calcium-dependent regulation of photosynthesis ☆. 2015.

JAMMES, F.; SONG, C.; SHIN, D.; MUNEMASA, S.; TAKEDA, K.; GU, D.; CHO, D.; LEE, S.; GIORDO, R.; SRITUBTIM, S.; LEONHARDT, N.; ELLIS, B. E.; MURATA, Y.; KWAK, J. M. MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 48, 2009.

JINGWEI, A. Y.; LI, G.; YUE, S.; YUAN, Z.; LEI, L.; RUI, L.; MINGYI, J.; MINGPU, T.; ZHANG. **Calcium and ZmCCaMK are involved in brassinosteroid-induced antioxidant defense in maize leaves** **Plant and Cell Physiology**, 2015. . Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20857278>>.

KALAJI, H.; OUKARROUM, A.; ALEXANDROV, V.; KOUZMANOVA, M.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, I. a.; CETNER, M. D.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; GOLTSEV, V. Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 81, p. 16–25, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S098194281400117X>>.

LIU, Y. F.; HAN, X. R.; ZHAN, X. M.; YANG, J. F.; WANG, Y. Z.; SONG, Q. B.; CHEN, X. Regulation of calcium on peanut photosynthesis under low night temperature stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 12, n. 12, p. 2172–2178, 2013.

MIKA, A.; BUCK, F.; LÜTHJE, S. Membrane-bound class III peroxidases: Identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots. **Journal of Proteomics**, v. 71, n. 4, p. 412–424, 2008.

MINIBAYEVA, F.; BECKETT, R. P.; KRANNER, I. Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding. **Phytochemistry**, v. 112, p. 122–129, abr. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942214002593>>. Acesso em: 21

out. 2015.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: The new wave? **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 6, p. 300–309, 2011.

NAJAFPOUR, M. M.; MOGHADDAM, A. N.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; GOVINDJEE. Biological water oxidation: Lessons from Nature. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1817, n. 8, p. 1110–1121, 2012.

OGAWA, M.; HANADA, A.; YAMAUCHI, Y.; KUWAHARA, A.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S. Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. **The Plant cell**, v. 15, n. 7, p. 1591–1604, 2003.

OH, M.-H.; KIM, H. S.; WU, X.; CLOUSE, S. D.; ZIELINSKI, R. E.; HUBER, S. C. Calcium/calmodulin inhibition of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 receptor kinase provides a possible link between calcium and brassinosteroid signalling. **Biochem. J**, v. 443, p. 515–523, 2012. Disponível em: <<http://www.biochemj.org/bj/443/bj4430515add.htm>>. Acesso em: 13 out. 2018.

PLIETH, C.; VOLLBEHR, S. Calcium promotes activity and confers heat stability on plant peroxidases. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 6, p. 650–660, 2012.

RAMALHO, J. C.; REBELO, M. C.; SANTOS, M. E.; ANTUNES, M. L.; NUNES, M. A. Effects of calcium deficiency on Coffea arabica. Nutrient changes and correlation of calcium levels with some photosynthetic parameters. **Plant and Soil**, v. 172, n. 1990, p. 87–96, 1995.

ROMEIS, T.; HERDE, M. From local to global: CDPKs in systemic defense signaling upon microbial and herbivore attack. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 20, n. March, p. 1–10, 2014.

SEO, S.; KATOU, S.; SETO, H.; GOMI, K.; OHASHI, Y. The mitogen-activated protein kinases WIPK and SIPK regulate the levels of jasmonic and salicylic acids in wounded tobacco plants. **The Plant Journal**, v. 49, n. 5, p. 899–909, 2 fev. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2006.03003.x>>. Acesso em: 13 out. 2018.

SIDDIQUI, M. H.; AL-WHAIBI, M. H.; BASALAH, M. O. Interactive effect of calcium and gibberellin on nickel tolerance in relation to antioxidant

systems in *Triticum aestivum* L. **Protoplasma**, v. 248, n. 3, p. 503–511, 24 jul. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00709-010-0197-6>>. Acesso em: 4 jan. 2018.

SIDDIQUI, M. H.; AL-WHAIBI, M. H.; SAKRAN, A. M.; BASALAH, M. O.; ALI, H. M. Effect of calcium and potassium on antioxidant system of *Vicia faba* L. under cadmium stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 6, p. 6604–6619, 2012.

SMÉKALOVÁ, V.; DOSKOČILOVÁ, A.; KOMIS, G.; ŠAMAJ, J. Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 2–11, 2014.

STEINHORST, L.; KUDLA, J. Signaling in cells and organisms — calcium holds the line. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 22, p. 14–21, 2014.

SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 12, p. 2269–2276, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.538>>.

TAKAHASHI, F.; MIZOGUCHI, T.; YOSHIDA, R.; ICHIMURA, K.; SHINOZAKI, K. Calmodulin-Dependent Activation of MAP Kinase for ROS Homeostasis in *Arabidopsis*. **Molecular Cell**, v. 41, n. 6, p. 649–660, 2011.

TONETTO DE FREITAS, S.; MCELRONE, A. J.; SHACKEL, K. A.; MITCHAM, E. J. Calcium partitioning and allocation and blossom-end rot development in tomato plants in response to whole-plant and fruit-specific abscisic acid treatments. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 1, p. 235–247, 1 jan. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/ert364>>. Acesso em: 3 jan. 2018.

TOOULAKOU, G.; GIANNOPOULOS, A.; NIKOLOPOULOS, D.; BRESTA, P.; DOTSIKA, E.; ORKOULA, M. G.; KONTOYANNIS, C. G.; FASSEAS, C.; LIAKOPOULOS, G.; KLAPA, M. I.; KARABOURNIOTIS, G. Alarm Photosynthesis: Calcium Oxalate Crystals as an Internal CO₂ Source in Plants 1. **Plant Physiology**, v. 171, p. 2577–2585, 2016. Disponível em: <www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.16.00111>. Acesso em: 17 nov. 2018.

UGGLA, C.; MORITZ, T.; SANDBERG, G.; SUNDBERG, B. Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 17, p. 9282–9286, 1996.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Calcium in Plants. **Annals of Botany**, v. 92, p. 487--511, 2003.

XU, C.; LI, X.; ZHANG, L. The Effect of Calcium Chloride on Growth, Photosynthesis, and Antioxidant Responses of *Zoysia japonica* under Drought Conditions. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–10, 2013.

XU, J.; ZHANG, S. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 1, 2015.

XU, L.; YU, J.; HAN, L.; HUANG, B. Photosynthetic enzyme activities and gene expression associated with drought tolerance and post-drought recovery in Kentucky bluegrass. **Environmental and Experimental Botany**, v. 89, 2013.

YANG, S.; WANG, F.; GUO, F.; MENG, J. J.; LI, X. G.; WAN, S. B. Calcium contributes to photoprotection and repair of photosystem II in peanut leaves during heat and high irradiance. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 57, n. 5, p. 486–495, 2014.

ZHAO, Q.; NAKASHIMA, J.; CHEN, F.; YIN, Y.; FU, C.; YUN, J.; SHAO, H.; WANG, Z.; DIXON, R. a. LACCASE Is Necessary and Nonredundant with PEROXIDASE for Lignin Polymerization during Vascular Development in *Arabidopsis* © American Society of Plant Biologists LACCASE Is Necessary and Nonredundant with PEROXIDASE for Lignin Polymerization during Vascul. **Plant Physiology**, v. 25, n. October, p. 3976–3987, 2013.

ZHOU, J.; XIA, X.-J.; ZHOU, Y.-H.; SHI, K.; CHEN, Z.; YU, J.-Q. RBOH1-dependent H₂O₂ production and subsequent activation of MPK1/2 play an important role in acclimation-induced cross-tolerance in tomato. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 2, p. 595–607, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24323505>>. Acesso em: 30 jan. 2018.

ZHOU, X. Y.; SONG, L.; XUE, H. W. Brassinosteroids regulate the differential growth of *arabidopsis* hypocotyls through auxin signaling components IAA19 and ARF7. **Molecular Plant**, v. 6, n. 3, p. 887–904, 2013.