

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 aclimação 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.

Objetivos, perguntas e hipótese

O objetivo geral 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. Dessa forma, procuramos responder:

1. Como concentração de cálcio influencia sinalização e resposta ao dano mecânico em espécie de crescimento lento

Hipótese: Espécie de crescimento lento (*Annona emarginata*) consome cálcio com menor velocidade, o que sugere sua reserva e utilização quando necessário. Essa condição, sem fornecimento do íon, deve manter sinalização e defesa, garantindo resistência ao estresse mecânico, embora outras funções exercidas pelo cálcio possam ser prejudicadas.

2. Como concentração de cálcio influencia sinalização e resposta ao dano mecânico em espécie de crescimento rápido

Hipótese: Espécie de crescimento rápido (*Solanum lycopersicum* Micro-Tom) consome cálcio com maior velocidade e na ausência de fornecimento do íon, deverá ocorrer prejuízo de sinalização, defesa e resistência ao estresse mecânico, levando à morte do vegetal

A seguir serão apresentados dois capítulos, a serem publicados em periódicos da área de biodiversidade, conforme orientação que consta da instrução normativa nº 01/2017 – STPG/IBB/UNESP.

Capítulo 1: O artigo “Cálcio no restabelecimento fotossintético após dano mecânico” será submetido ao periódico “Journal of Agricultural Science”, classificado na Área de Avaliação da Capes, como Qualis B1.

Capítulo 2: O artigo “Cálcio e expressão genica na sinalização e aclimatação fotossintética após dano mecânico” foi submetido ao periódico “Environmental and Experimental Botany”, classificado na Área de Avaliação da Capes, como Qualis A1.

Capítulo 1: Cálcio no restabelecimento fotossintético após dano mecânico

Felipe G. Campos, Carmen S. F. Boaro*

Instituto de Biociências, UNESP: Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Botânica, CP. 510, CEP: 18.618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.

*Carmen Sílvia Fernandes Boaro - carmen.boaro@unesp.br - <https://orcid.org/0000-0002-5524-0621>

***corresponding author**

Resumo

O cálcio, elemento essencial com função estrutural na parede celular e membrana plasmática, além de ser mensageiro secundário é responsável pela regulação de processos fisiológicos do desenvolvimento vegetal e respostas a estresses bióticos e abióticos. O estudo investigou a influência da variação de cálcio no restabelecimento fotossintético e peroxidação lipídica da *Annona emarginata* submetida a dano mecânico. Plantas de *Annona emarginata* foram cultivadas com 0, 2 e 4 mM de Ca²⁺, com e sem dano mecânico e cinco épocas de avaliação, realizadas aos 0, 15, 30, 60 e 90 dias após o dano mecânico. Fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas, massa seca total, crescimento quantitativo e peroxidação lipídica foram estudados. Conclui-se 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 da espécie com 2 mM de cálcio na solução nutritiva completa foram suficientes para garantir crescimento e restabelecimento fotossintético do vegetal submetido a dano mecânico.

Abstract

Calcium, an essential element with structural function in the cell wall and plasma membrane, besides being secondary messenger is responsible for the regulation of physiological processes of plant development and responses to biotic and abiotic stresses. The study investigated the influence of calcium variation on the photosynthetic reestablishment and lipid peroxidation of *Annona emarginata* submitted to mechanical damage. *Annona emarginata* plants were cultivated with 0, 2 and 4 mM Ca²⁺, with and without mechanical damage and five evaluation periods, at 0, 15, 30, 60 and 90 days after mechanical damage. Fluorescence of chlorophyll a, gas exchange, total dry mass, quantitative growth and lipid peroxidation were studied. It is concluded that the *Annona emarginata* plants presented greater resistance to mechanical damage in the presence of calcium and were more sensitive in the absence of the mineral. Cultivation of the species with 2 mM Ca²⁺ in complete nutrient solution was enough to ensure restoration of growth and photosynthetic plant subjected to mechanical damage.

Introdução

O cálcio, elemento essencial com função estrutural na parede celular e membrana plasmática, além de ser mensageiro secundário é responsável pela regulação de processos fisiológicos do desenvolvimento vegetal e respostas a estresses bióticos e abióticos (Denness et al., 2011). Sua deficiência pode comprometer o crescimento vegetal (Gao, Nagawa, Wang, & Yang, 2008; S.-L. Yang, Lan, Deng, & Gong, 2016).

Níveis elevados de Ca^{2+} e espécies reativas de oxigênio (ERO) no citoplasma proporcionam ativação de cascata constituída por quinases MPKs, que se ligam a fosfato e calmodulina e regulam o acúmulo de ERO proveniente de estresse (Takahashi, Mizoguchi, Yoshida, Ichimura, & Shinozaki, 2011). Essa cascata coordena respostas intracelulares nas plantas, que possibilitam sinalização de longa distância (Steinhorst & Kudla, 2014).

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, Ferreira, Rodrigues, Boaro, & Macedo, 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).

Annona emarginata submetida a estresse devido à deficiência hídrica revelou aparato fotoquímico tolerante, uma vez que não houve diferença na taxa de transporte de elétrons, extinção fotoquímica e foi elevado o coeficiente de extinção não fotoquímico

(NPQ) em relação às plantas controle (Mantoan, Ferreira, & Boaro, 2015), indicando que nas plantas em déficit houve dissipação de energia excedente na forma de calor (NPQ elevado), não havendo alteração da eficiência fotoquímica após reidratação, sugerindo aclimatação fotossintética nessas condições (Mantoan, Rolim de Almeida, Macedo, Ferreira, & Boaro, 2016).

O araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. Rainer), espécie utilizada como porta-enxerto para atemoia, apresenta crescimento lento e pode consumir cálcio com menor velocidade, o que sugere sua reserva e utilização quando necessário. Essa condição, sem fornecimento do íon, deve manter sinalização e defesa, garantindo resistência ao estresse mecânico, embora outras funções exercidas pelo cálcio possam ser prejudicadas.

Este estudo investigou a influência da variação de cálcio na defesa e restabelecimento fotossintético da *Annona emarginata* submetida a dano mecânico.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu/SP, em casa de vegetação tipo “Paddy Fan” com temperatura mantida em $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa em $52\% \pm 4\%$ e luz ambiental $554 \pm 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, coordenadas geográficas $48^{\circ}24'35''$ O e $22^{\circ}49'10''$ S, a 800 m acima do nível do mar.

Espécie vegetal e cultivo

Mudas de *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. Rainer, com 15 cm de altura, foram adquiridas junto ao Núcleo de Produção de Mudas de São Bento do Sapucaí, CATI (Coordenadoria de Assistência Técnica e Integrada), São Bento do Sapucaí, SP, com coordenadas geográficas $45^{\circ} 44' 11''$ O e $22^{\circ} 41' 18''$ S a 874m acima do nível do mar.

Após 12 meses de cultivo em solução nutritiva completa de Hoagland & Arnon (1950), diluída a 50%, as plantas foram transferidas para a mesma solução nutritiva contendo 4 mM de Ca^{2+} (tratamento controle) e modificada para o fornecimento de níveis de cálcio iguais a 2 e 0 mM, que constituíram os demais tratamentos (Tabela 1), onde as plantas permaneceram até as datas de coleta. Aos 30 dias na solução nutritiva com os três níveis de cálcio, dano mecânico foi realizado por meio de remoção de três ramos da região mediana da parte aérea. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições, em esquema fatorial 6x5, ou seja, seis tratamentos constituídos por 0, 2 e 4 mM de Ca^{2+} , com e sem dano mecânico e cinco épocas de avaliação, realizadas aos 0 (30 min), 15, 30, 60 e 90 dias após o dano mecânico.

Tabela 1. Composição da solução nutritiva nº2 de Hoagland e Arnon e variação de cálcio para cultivo das plantas de *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. Rainer

Concentração de Ca^{+2} (mM)		4	2	0
Macronutrientes	Solução estoque (M)	Solução nutritiva (ml L^{-1})		
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	115,05	1,0	1,0	1,0
KNO_3	101,10	6,0	6,0	6,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236,16	4,0	2,0	0
$\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,50	2,0	2,0	2,0
NH_4NO_3	80,04	0	2,0	4,0
Micronutrientes	Solução estoque (g L^{-1})	1,0	1,0	1,0
H_3BO_3	2,86 g			
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81 g			
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22 g			
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08 g			
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,02 g			
Solução *Fe-EDTA	Solução estoque (g L^{-1})	1,0	1,0	1,0
$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	26,10 g			
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24,90 g			

*Solução catalizada por 265,00 mL NaOH (M)

Fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas, biomassa e índices de crescimento

Em folhas totalmente expandidas, localizadas na região do caule abaixo do dano mecânico e acondicionadas no escuro, durante 30 minutos foram determinadas medidas de fluorescência da clorofila *a* com fluorômetro portátil de pulso de amplitude

modulada (Jr PAM, Walz) sob irradiância saturante 1150 DFFFA, entre 9 e 11 horas. Foram determinados fluorescência mínima adaptada ao escuro (F_o), eficiência quântica potencial (F_v/F_m), definida pela relação entre eficiência variável (F_v) e máxima (F_m), eficiência quântica efetiva do FSII (Φ_{PSII}), coeficiente de extinção não fotoquímico da fluorescência [$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$], ou seja, energia dissipada na forma de calor, e taxa de transporte de elétrons ($ETR = DFFF * \Delta F/F_m' * 0,5 * 0,84$) usado para estimar $NADPH+H^+$.

As avaliações de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* na luz foram realizadas no mesmo horário e em folhas nas mesmas condições, utilizando-se equipamento de sistema aberto de fotossíntese com analisador de CO_2 e vapor d'água por radiação infravermelha, com fluorômetro acoplado (Infra Red Gas Analyser – IRGA, modelo GFS 3000 FL, Walz). Entre as variáveis de fluorescência foram determinados rendimento quântico efetivo ($\Phi_{PSII_{Luz}}$), taxa de transporte de elétrons (ETR_{Luz}), eficiência do fotossistema II ($F_v'/F_m'_{Luz}$), fração de luz absorvida pela antena FSII que é dissipada como calor (D_{Luz}), fração de energia de excitação não dissipada na antena que não pode ser utilizada para fotoquímica ($E_{x_{Luz}}$). Para avaliação das trocas gasosas foram determinadas taxa de assimilação líquida de CO_2 (A , $\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$), taxa de transpiração (E , $mmol$ vapor d'água $m^{-2} s^{-1}$) e condutância estomática (G_s , $mol m^{-2} s^{-1}$). A eficiência instantânea de carboxilação da enzima ribulose 1,5-difosfato carboxilase (Rubisco) foi calculada pela relação da taxa de assimilação líquida de CO_2 e concentração interna de CO_2 na folha (A/C_i) (Zhang, Li, Ma, & Chen, 2001).

A massa seca total foi avaliada e os índices de crescimento, taxa assimilatória líquida (TAL), que reflete a fotossíntese líquida, taxa de crescimento relativo (TCR), que reflete crescimento em relação a material vegetal pré-existente e razão de área foliar (RAF), que reflete área foliar útil para fotossíntese (Portes & De Castro, 1991).

Taxa de crescimento relativo (TCR)

$$TCR (g/g \cdot dia) = d \ln \frac{a \cdot e^{(bt+ct^2)}}{dt}$$

Taxa assimilatória líquida (TAL)

$$TAL (g/dm^2 \cdot dia) = \frac{(b+2ct) \cdot a \cdot e^{(bt+ct^2)}}{a_1 \cdot e^{(b_1+c_1t^2)}}$$

Razão de área foliar (RAF)

$$RAF (dm^2 g^{-1}) = AF/MST$$

Quantificação de peroxidação lipídica

Folhas totalmente expandidas e localizadas na região do caule abaixo do dano mecânico foram coletadas entre 9 e 11h, acondicionados em sacos plásticos, embaladas em papel alumínio e congelados em nitrogênio líquido, para paralisação imediata de todas as reações metabólicas. Essas amostras foram armazenadas em freezer a -20°C e 300 mg da massa fresca foi utilizado para determinação da peroxidação de lipídios, realizada segundo metodologia proposta por Rama Devi e Prasad (1998).

Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise de variância e sua homogeneidade foi testada por Levene. As medias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados

Análise de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e biomassa

As plantas cultivadas sem Ca^{2+} e com dano mecânico não revelaram diferenças expressivas de eficiência quântica potencial (F_v/F_m), embora o coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) tenha sido mais baixo, ao longo do tempo (Figura 1). Na luz, essas plantas apresentaram decréscimo da taxa de transporte de elétrons (ETR) e da eficiência quântica efetiva ($\Phi\text{PSII}_{\text{luz}}$) (Figura 2). Além disso, revelaram baixa assimilação de carbono (A), condutância estomática (G_s), taxa transpiratória (E) e eficiência de carboxilação da rubisco (A/C_i) (Figura 3). De modo geral, a avaliação da massa seca total, taxa assimilatória líquida, razão de área foliar e taxa de crescimento relativo revelaram apenas efeito do dano mecânico (Figuras 4 e 5).

Deve ser destacado que as plantas cultivadas sem Ca^{2+} e sem dano, também apresentaram baixa taxa de transporte de elétrons (ETR). Na luz, ETR e a fração de energia de excitação não dissipada na antena e não utilizada para fotoquímica (E_x) foram mais elevadas aos 30 e 60 dias após o dano mecânico. Taxa de assimilação de carbono, condutância estomática e eficiência da rubisco nessas plantas foram maiores quando comparadas às plantas cultivadas sem Ca^{2+} e com dano mecânico. A massa seca total nas plantas sem cálcio e sem dano mecânico foi mais baixa aos 30 e 60 dias após o dano mecânico. As taxas de crescimento relativo e assimilatória líquida apresentaram menor variação e a razão de área foliar decresceu (Figura 5).

As plantas de *Annona emarginata* cultivadas sem cálcio apresentaram com o passar do tempo morte das gemas apicais (Figura 7)

Não foram identificadas variações expressivas da fluorescência da clorofila *a* e das trocas gasosas nas plantas cultivadas com 2 mM de Ca^{2+} com dano mecânico e as plantas apresentaram menor massa seca total e taxas assimilatória líquida e de crescimento relativo praticamente constantes.

Embora não tenham sido detectadas variações expressivas da fluorescência da clorofila *a* e das trocas gasosas (Fig. 1, 2, 3), as plantas cultivadas com 2 mM de Ca^{2+} sem dano mecânico apresentaram maior massa seca total e taxas assimilatória líquida e de crescimento relativo com maiores decréscimos. (Fig. 4 e 5)

As plantas cultivadas com 4 mM de Ca^{2+} e com dano não apresentaram, no escuro, variação expressiva da eficiência quântica potencial (F_v/F_m), enquanto revelaram decréscimo da taxa de transporte de elétrons (ETR) e da eficiência quântica efetiva (Φ_{PSII}) e aumento do NPQ (Figura 1). Essas plantas na luz apresentaram baixa taxa de transporte de elétrons (ETR) e da eficiência quântica efetiva (Φ_{PSII}) (Figura 2). Apresentaram aumento na taxa de assimilação, condutância estomática, taxa transpiratória e eficiência da rubisco e da massa seca total, com o tempo, embora as taxas assimilatória líquida e de crescimento relativo tenham se mantido constantes (Figuras 4 e 5).

Não foram identificadas variações expressivas da fluorescência da clorofila *a* e das trocas gasosas nas plantas cultivadas com 4 mM de Ca^{2+} sem dano mecânico, que apresentaram elevada massa seca total aos 15 e 60 dias após dano mecânico e decréscimo das taxas assimilatória líquida e de crescimento relativo (Fig. 1, 2 e 3).

Quantificação de peroxidação lipídica

Plantas de *Annona emarginata* cultivadas sem Ca^{2+} , independente de dano mecânico não apresentaram diferenças na peroxidação lipídica, devendo ser destacadas as cultivadas sem Ca^{2+} e com dano mecânico que apresentaram maior nível de peroxidação lipídica, aos 30 dias após o dano mecânico (Fig. 6).

As plantas cultivadas com 2 mM de Ca^{2+} independente dano mecânico apresentaram diferença de peroxidação lipídica aos 60 dias, maior nas plantas com dano.

Essas plantas apresentaram maior peroxidação lipídica em relação às demais nesse tempo (Fig. 6).

As plantas cultivadas com 4 mM de Ca^{2+} independente de dano mecânico não apresentaram variação de peroxidação lipídica (Fig. 6).

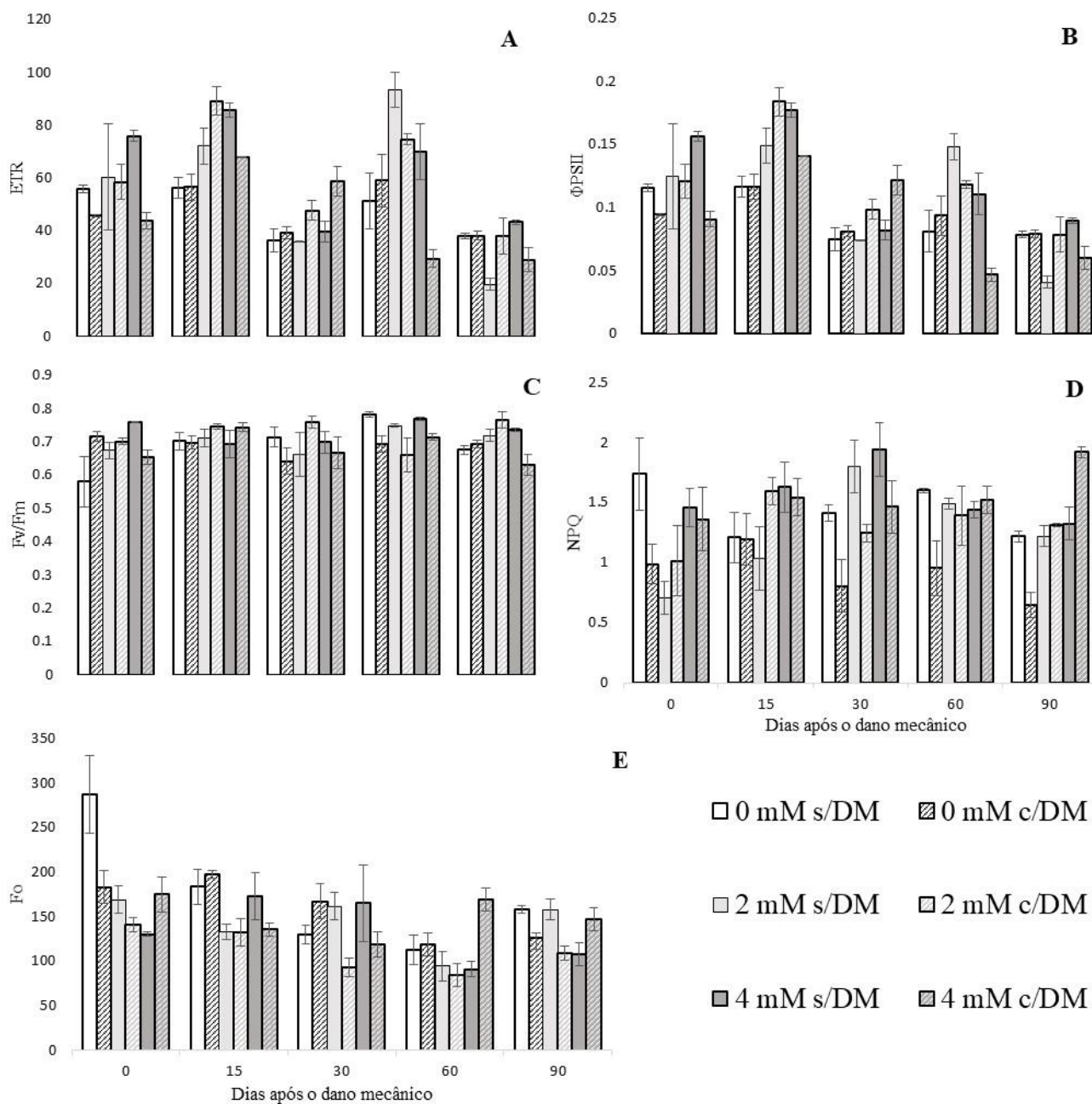


Figura 1: A. Taxa de transporte de elétrons (ETR) $p < 0,001$; B. Rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}) $p < 0,001$; C. Eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m) $p < 0,028$; D. Coeficiente de extinção não fotoquímico da fluorescência (NPQ) $p < 0,036$; E. Fluorescência mínima adaptada ao escuro (F_o) $p < 0,033$, em plantas de *Annona emarginata* com dano mecânico (c/DM) e sem dano mecânico (s/DM) e submetida a variação de cálcio, nos tempos 0 (30 min.) 15, 30, 60 e 90 dias. Valores correspondentes às médias \pm SE ($n = 4$).

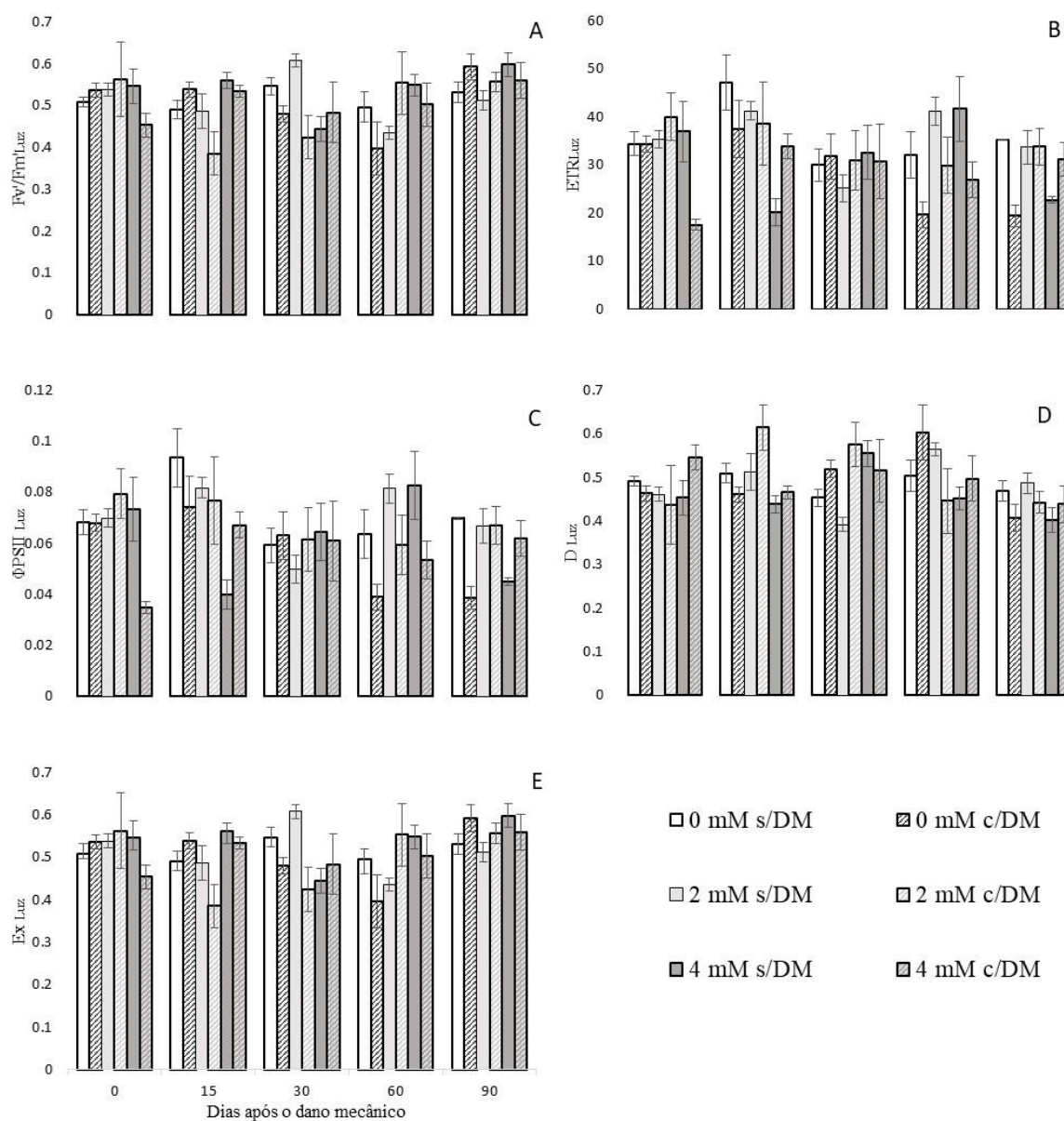


Figura 2: A. Eficiência do fotossistema II ($F_v'/F_m'_{Luz}$) $p < 0,012$; B. Taxa de transporte de elétrons (ETR_{Luz}) $p < 0,003$; C. Rendimento quântico efetivo ($\Phi_{PSII_{Luz}}$) $p < 0,003$; D. Fração de luz absorvida pela antena PSII que é dissipada como calor (D_{Luz}) $p < 0,012$; E. Fração de energia de excitação não dissipada na antena que não pode ser utilizada para fotoquímica (Ex_{Luz}) $p < 0,012$ em plantas de *Annona emarginata* com dano mecânico (c/DM) e sem dano mecânico (s/DM) e submetida a variação de cálcio nos tempos 0 (30 min.) 15, 30, 60 e 90 dias. Valores correspondentes às médias \pm SE ($n = 4$).

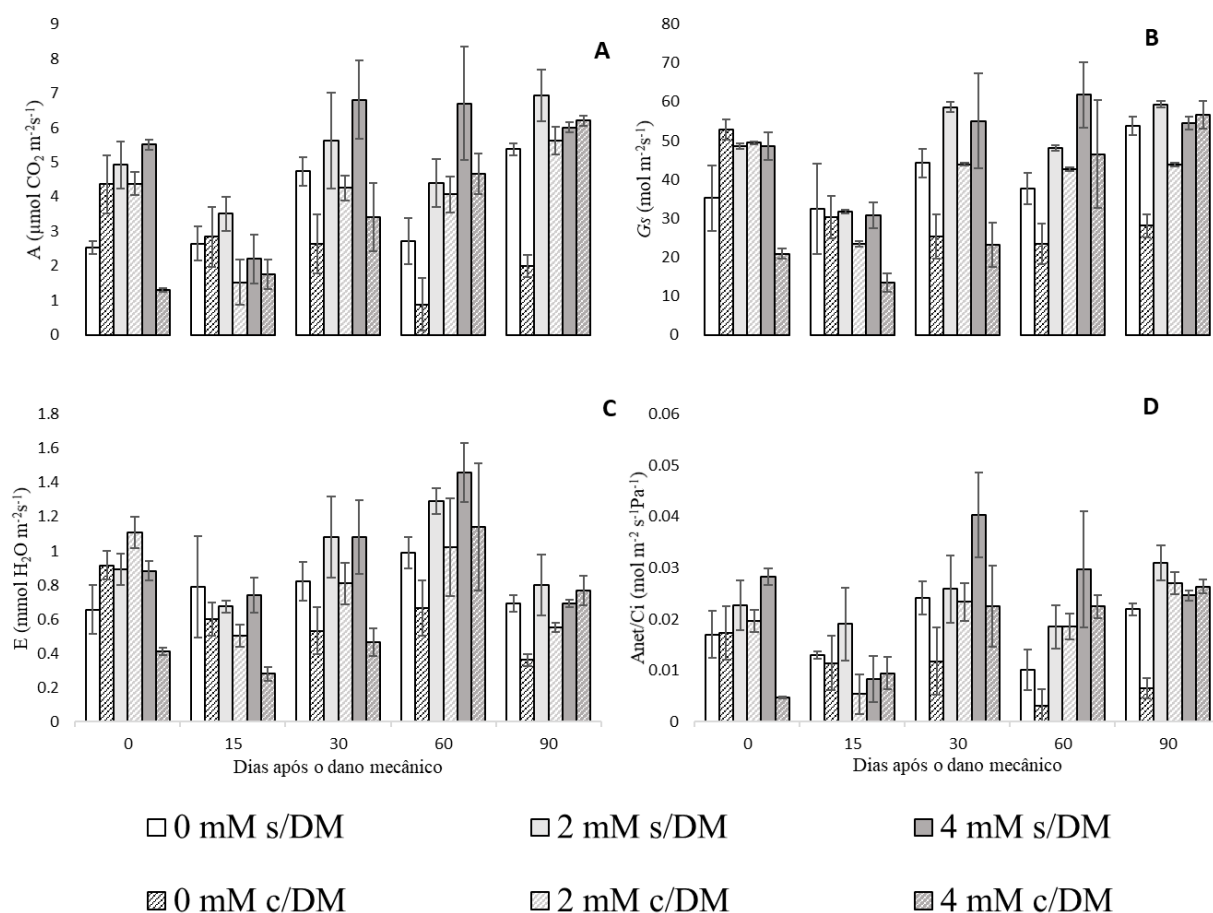


Figura 3: **A.** Taxa de assimilação de carbono (A_{net} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) $p < 0,001$; **B.** Condutância estomática (G_s , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) $p < 0,006$; **C.** Transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) $p < 0,002$; **D.** Eficiência de carboxilação da Rubisco (A_{net}/C_i , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) $p < 0,001$, em plantas de *Annona emarginata* com dano mecânico (c/DM) e sem dano mecânico (s/DM) e submetida a variação de cálcio (mM), nos tempos 0 (30 min.) 15, 30, 60 e 90 dias. Valores correspondentes às médias \pm SE ($n = 4$).

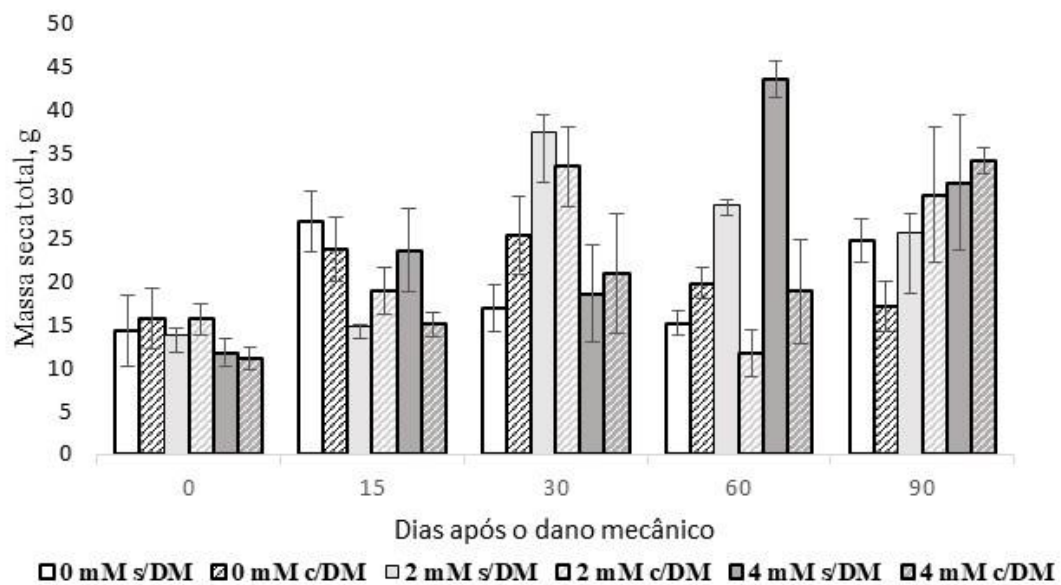


Figura 4: Massa seca total (g) $p < 0,001$ em plantas de *Annona emarginata* com dano mecânico (c/DM) e sem dano mecânico (s/DM) e submetido a variação de cálcio, nos tempos 0 (30 min.) 15, 30, 60 e 90 dias. Valores correspondentes às médias \pm SE ($n = 4$).

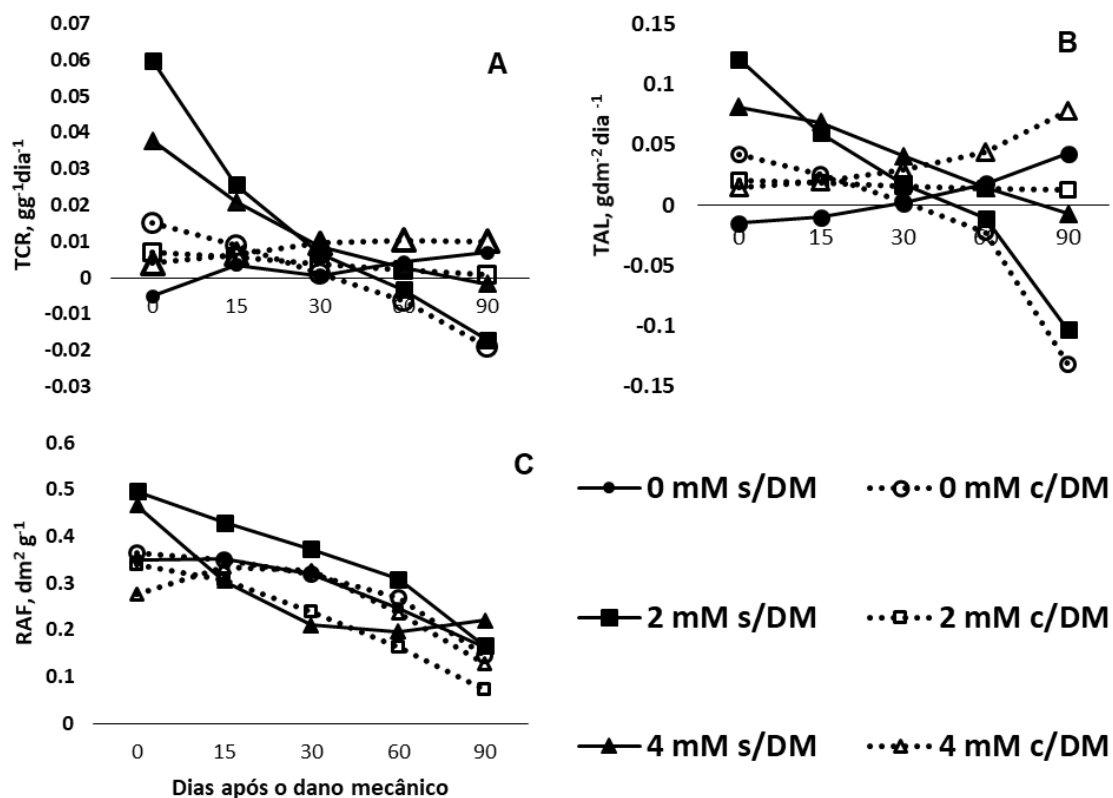


Figura 5: A. Taxa de crescimento relativo (TCR); B. Taxa de assimilação líquida (TAL) e C. Razão de área foliar (RAF) em plantas de *Annona emarginata* com dano mecânico (c/DM) e sem dano mecânico (s/DM) e submetido a variação de cálcio nos tempos 0 (30 min.) 15, 30, 60 e 90 dias.

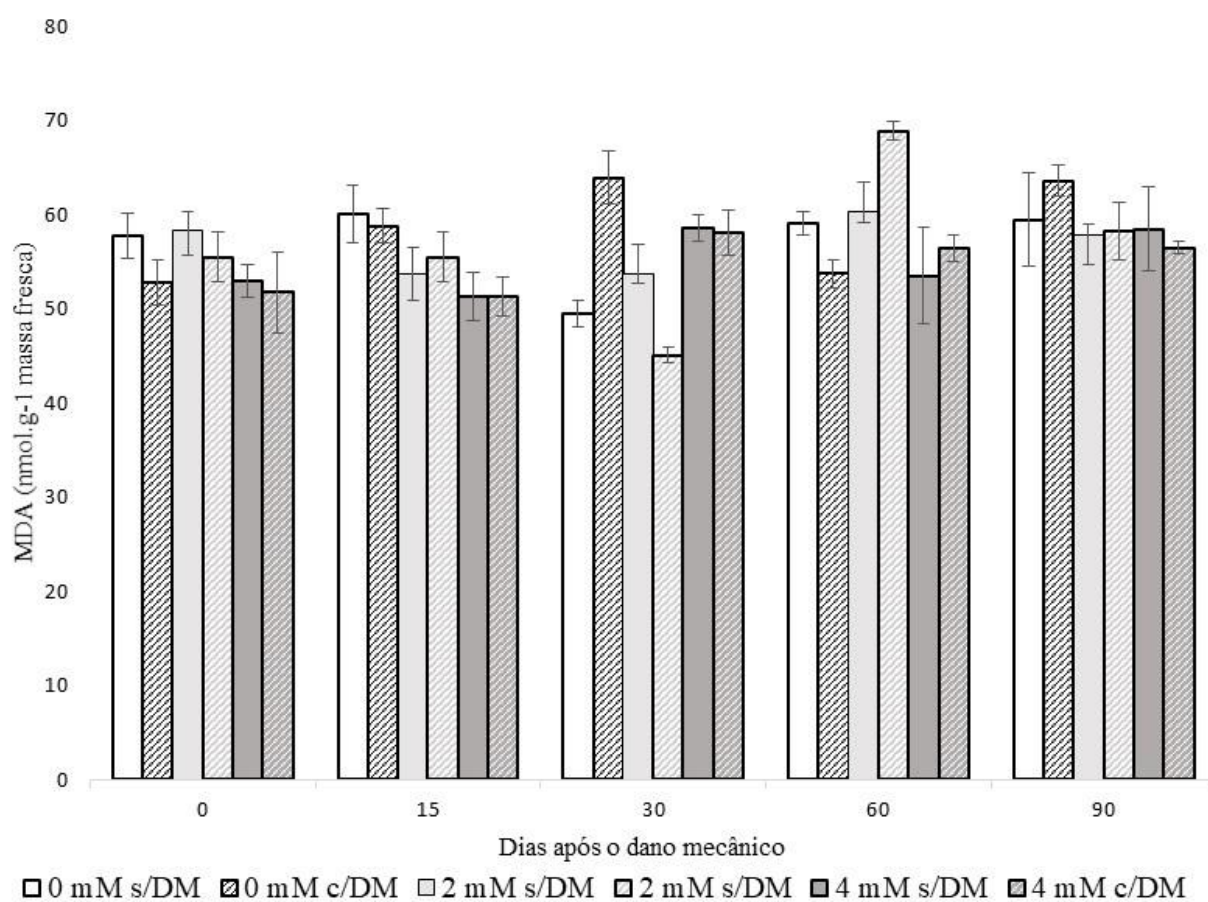


Figura 6: Peroxidação lipídica expresso pela formação de malonaldeído (MDA) em plantas de *Annona emarginata* com dano mecânico (c/DM) e sem dano mecânico (s/DM) submetido a três níveis de cálcio (mM). Valores correspondentes às médias \pm SE ($n = 4$). $p < 0,001$.



Figura 7: *Annona emarginata* cultivada com variação de cálcio, aos 120 dias após dano mecânico. **A.** 2 mM de cálcio sem dano mecânico, **B.** 2 mM de cálcio com dano, **C.** sem cálcio e sem dano; **D.** sem cálcio com dano

Discussão

Annona emarginata, espécie de crescimento lento, apresenta baixa demanda nutricional (Baron et al., 2013) e sinais de deficiência demoram mais tempo para se manifestarem, condição verificada no presente estudo. Com o tempo, as plantas cultivadas com ausência de Ca^{2+} apresentaram morte de gemas apicais, condição agravada naquelas com dano mecânico e nas últimas avaliações.

A dissipação de energia na forma de calor (NPQ) e na forma de fluorescência (F_0), o rendimento quântico efetivo na luz (ΦPSII), e a taxa de transporte de elétrons na luz (ETR) foram baixos em plantas cultivadas sem Ca^{2+} e com dano mecânico, que segundo a literatura pode levar a acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) (F. Minibayeva et al., 2009; Farida Minibayeva, Beckett, & Kranner, 2015). Essas espécies reativas de oxigênio, geradas por baixa dissipação de energia na forma de calor e fluorescência, com menores taxa de transporte de elétrons na luz (ETR) e rendimento quântico efetivo na luz (ΦPSII) podem causar dano aos fotossistemas, condição que está de acordo com os estudos em que espécies reativas de oxigênio foram geradas por interrupção do fluxo de elétrons nos fotossistemas (Hochmal, Schulze, Trompelt, & Hippler, 2015; Selmar & Kleinwächter, 2013). Essa condição, no presente estudo, pode justificar assimilação de carbono, condutância estomática e transpiração baixas nas plantas cultivadas sem Ca^{2+} e com dano mecânico, uma vez que, com a redução da taxa de transporte de elétrons (ETR) ocorre diminuição da síntese de $\text{NADPH}+\text{H}^+$, necessária para redução de CO_2 .

Enquanto alguns estudos demonstram que a presença de ERO induz cascata de sinais, com envolvimento do ABA e quinases, que contribui com o fechamento estomático (Neill et al., 2008), limitando saída de vapor H_2O e entrada de CO_2 , outros revelam que ERO sinalizam processos fisiológicos, que podem acelerar, o crescimento e

desenvolvimento vegetal. (Schmidt & Schippers, 2015). Neste estudo, as ERO devem ter atuado tanto na sinalização para fechamento estomático como no crescimento, uma vez que, mesmo com menor condutância estomática, as plantas cultivadas sem cálcio e com dano mecânico revelaram decréscimo acentuado das taxas assimilatória líquida e de crescimento relativo e da razão de área foliar, condições indicativas de rápido crescimento, que não chegam, no entanto, a aumento de massa seca total.

O F_v/F_m , que indica captação de luz, não variou entre as plantas cultivadas sem e com Ca^{2+} e sem dano e com mecânico.

Nas plantas cultivadas sem Ca^{2+} e sem dano mecânico maior dissipação de energia na forma de calor (NPQ), maior fluorescência mínima adaptada ao escuro (F_o) e menor taxa de transporte de elétrons (ETR) podem indicar que essas plantas apresentaram danos nos fotossistemas, resultados que estão de acordo com a literatura (Silva, Silveira, Ribeiro, & Vieira, 2015).

Além disso, nessas plantas sem Ca^{2+} e sem dano mecânico, menor eficiência quântica (Φ_{PSII}) ao longo das avaliações pode ser indicativo de não geração de agente redutor ($NADPH+H^+$) suficiente para redução do CO_2 , conforme revelam outros estudos (L. Da Silva, Marchiori, Maciel, Machado, & Ribeiro, 2010). Essa condição é confirmada pela baixa assimilação de carbono (A), nas plantas sem Ca^{2+} e sem dano mecânico. Conforme estudos identificados na literatura, a baixa atividade da enzima NAD quinase dependente de CaM (Hochmal et al., 2015), na ausência ou deficiência de cálcio, pode explicar menor assimilação de carbono. A presença de Ca^{2+} também pode ser importante, por se tratar de elemento que atua como cofator no centro de evolução do oxigênio, responsável pela manutenção do fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons no fotossistema II, P680 (Najafpour, Moghaddam, Allakhverdiev, & Govindjee, 2012).

Como consequência as plantas sem Ca^{2+} e sem dano mecânico mantiveram baixa a massa seca total e por tanto, apresentaram paralização de crescimento. Os foto-assimilados foram utilizados para manutenção de alguns processos fisiológicos que evitaram morte do vegetal, apresentando taxas assimilatória líquida e de crescimento relativa praticamente constantes.

As plantas cultivadas com 2 mM de Ca^{2+} e com dano mecânico apresentaram taxas de rendimento quântico efetivo (ΦPSII) e de transporte de elétrons (ETR) semelhantes às apresentadas pelas plantas cultivadas com 4 mM de Ca^{2+} sem dano mecânico, embora tenham revelado elevada dissipação de energia na forma de calor (D_{luz}). Maior dissipação de energia é mecanismo de proteção, o que indica que as plantas com 2 mM de Ca^{2+} , mesmo com dano mecânico, apresentaram eficiente fotoproteção. A mesma comparação pode ser realizada com a taxa de assimilação de carbono das plantas cultivadas com 2 mM de Ca^{2+} e dano mecânico e 4 mM de Ca^{2+} sem dano mecânico (Hochmal et al., 2015; Ribeiro, Machado, Santos, & Oliveira, 2009).

Embora as plantas cultivadas com 2 mM de Ca^{2+} e com dano mecânico tenham apresentado foto-proteção, revelaram menor massa seca total e indicação de que seus foto-assimilados não foram revertidos para o crescimento e desenvolvimento e sim para a superação do dano, uma vez que, as taxas assimilatória líquida e de crescimento relativo se mantiveram praticamente constantes.

As plantas cultivadas com 2 mM de Ca^{2+} sem dano mecânico apresentaram de modo geral baixo coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) e elevado rendimento efetivo quântico, na luz, (ΦPSII), que mede a quantidade de energia disponível para redução do carbono. Essa condição pode ter favorecido elevada assimilação de carbono, indicando que 2 mM de Ca^{2+} foram suficientes para que as plantas sem dano mantivessem sua produtividade quântica (Silva et al., 2015), sem fotoinibição, uma vez que, essas plantas

apresentaram adequada utilização do recuso luminoso para produção de agentes redutores e assimilação de carbono, sem limitação da condutância estomática.

O rápido decréscimo das taxas assimilatória líquida e de crescimento relativo e da razão de área foliar, também indicam boa performance dessas plantas, o que está de acordo com estudos realizados com a mesma espécie (Baron et al., 2013).

Assim, 2 mM de Ca^{2+} são suficientes para garantir crescimento nas plantas sem dano mecânico e restabelecimento ao dano nas plantas de *Annona emarginata* a ele submetidas.

As plantas cultivadas com 4 mM de Ca^{2+} e com dano mecânico apresentaram maior dissipação de energia na forma de calor (NPQ) na última avaliação. Essa dissipação de energia é atribuída a mecanismo de foto-proteção, de modo a evitar dano aos fotossistemas (Hochmal et al., 2015; Ribeiro et al., 2009). Tal proteção pode ter contribuído com a taxa de assimilação de carbono que aumentou ao longo do tempo, tendo sido, no entanto, menor que nas plantas cultivadas com 4 e 2 mM de Ca^{2+} sem dano mecânico. Deste modo, essas plantas direcionaram seus foto-assimilados para superação do dano e restabelecimento do vegetal, o que pode ser confirmado pela ausência de crescimento revelado pelas taxas assimilatória líquida e de crescimento relativo praticamente constantes.

As plantas cultivadas com 4 mM de Ca^{2+} e sem dano mecânico apresentaram elevadas taxa de transporte de elétrons (ETR), rendimento quântico efetivo (ΦPSII), taxa de transporte de elétrons na presença de luz (ETR) e rendimento quântico efetivo na presença de luz (ΦPSII), condições indicativas de adequado funcionamento dos fotossistemas na ausência de dano mecânico, conforme já constatado na literatura (E. N. Silva et al., 2015). Maior rendimento quântico efetivo (ΦPSII) e maior condutância estomática favoreceram maiores taxas de assimilação de carbono, dados já observados em

outros estudos (Yang et al., 2014). Comparadas às plantas com 4 mM de Ca^{2+} com dano mecânico, as plantas com 4 mM de Ca^{2+} sem dano mecânico apresentaram maior crescimento conforme revelam os decréscimos das taxas assimilatória líquida e de crescimento relativo e da razão de área foliar.

De acordo com a literatura, dano mecânico e fotossíntese podem gerar ERO (Minibayeva et al., 2015), que muitas vezes são eficientemente neutralizadas pelo sistema antioxidantes enzimático ou não. Ação desse sistema pode ser confirmada pela avaliação da peroxidação lipídica. No presente estudo a ausência de variação expressiva na concentração de malondialdeído, sugere que *Annona emarginata* possa armazenar cálcio na forma de cristais de oxalato de cálcio utilizado quando necessário (Tooulakou et al., 2016), conforme já verificado para outras espécies de *Annona* (Duarte et al., 2015), sem fornecimento do íon (sem Ca^{2+} com dano), o que pode ter contribuído com a sinalização e defesa, garantindo resistência ao estresse mecânico, embora outras funções exercidas pelo cálcio possam ser prejudicadas, conforme revela estudo em que *Annona emarginata* apresenta estratégias para superação de estresse hídrico (Mantoan et al., 2016).

A maior resistência das plantas de *Annona emarginata* ao dano mecânico pode ser resultado de seu crescimento mais lento, demonstrado pelas taxas de crescimento não tão acentuadas, com sua paralização quando o cálcio foi deficiente e com dano mecânico. Nessa condição, o cálcio foi mais eficiente no restabelecimento vegetal.

Conclusão

Conclui-se que as plantas de *Annona emarginata* apresentaram resistência ao dano mecânico na presença de cálcio e foram mais sensíveis na ausência do mineral.

O cultivo da espécie com 2 mM de cálcio na solução nutritiva completa foi suficiente para garantir crescimento e restabelecimento do vegetal submetido a dano mecânico.

Bibliografia

- Baron, D., Ferreira, G., Rodrigues, J. D., Boaro, C. S. F., & Macedo, A. C. (2013). Gas exchange, physiological indexes and ionic accumulation in *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer seedlings in nutrients solution. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(2), 361–376. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000200005>
- Da Silva, L., Marchiori, P. E. R., Maciel, C. P., Machado, E. C., & Ribeiro, R. V. (2010). Fotossíntese, relações hídricas e crescimento de cafeeiros jovens em relação à disponibilidade de fósforo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(9), 965–972. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010000900005>
- Denness, L., McKenna, J. F., Segonzac, C., Wormit, A., Madhou, P., Bennett, M., ... Hamann, T. (2011). Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156(3), 1364–1374. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175737>
- Devi, S. R., & Prasad, M. N. V. (1998). Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Science*, 138(2), 157–165. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00161-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00161-7)
- Duarte, M. R., Oliveira, R. B., & Souza, D. . (2015). Anatomia foliar e caulinar de duas espécies de *Rollinia* (Annonaceae): *R. rugulosa* E *R. mucosa*. *Visão Acadêmica*, 6(3), 4–21.
- Franceschi, V. R. (1989). Calcium oxalate formation is a rapid and reversible process in *Lemna minor* L. *Protoplasma*, 148(2–3), 130–137. <https://doi.org/10.1007/BF02079332>
- Gao, X., Nagawa, S., Wang, G., & Yang, Z. (2008). Cell polarity signaling: Focus on polar auxin transport. *Molecular Plant*, 1(6), 899–909. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn069>
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347(347), 1–32. <https://doi.org/citeulike-article-id:9455435>
- Hochmal, A. K., Schulze, S., Trompelt, K., & Hippler, M. (2015). *Biochimica et Biophysica Acta Calcium-dependent regulation of photosynthesis* ☆.
- Mantoan, L. P. B., Ferreira, G., & Boaro, C. S. F. (2015). Chlorophyll a fluorescence in *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer plants subjected to water stress and after

- rehydration. *Scientia Horticulturae*, *184*, 23–30.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.019>
- Mantoan, L. P. B., Rolim de Almeida, L. F., Macedo, A. C., Ferreira, G., & Boaro, C. S. F. (2016). Photosynthetic adjustment after rehydration in *Annona emarginata*. *Acta Physiologiae Plantarum*, *38*, 157. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2171-1>
- Minibayeva, F., Beckett, R. P., & Kranner, I. (2015). Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding. *Phytochemistry*, *112*, 122–129.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.06.008>
- Minibayeva, F., Kolesnikov, O., Chasov, a., Beckett, R. P., Lüthje, S., Vylegzhanina, N., ... Böttger, M. (2009). Wound-induced apoplastic peroxidase activities: Their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environment*, *32*(5), 497–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01944.x>
- Najafpour, M. M., Moghaddam, A. N., Allakhverdiev, S. I., & Govindjee. (2012). Biological water oxidation: Lessons from Nature. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1817*(8), 1110–1121. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.04.002>
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., ... Wilson, I. (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, *59*(2), 165–176. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm293>
- Portes, T. de A., & De Castro, L. G. J. (1991). Análise de Crescimento de Plantas: um programa computacional auxiliar. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, *3*, 53–56.
- Ribeiro, R. V., Machado, E. C., Santos, M. G., & Oliveira, R. F. (2009). Seasonal and diurnal changes in photosynthetic limitation of young sweet orange trees. *Environmental and Experimental Botany*, *66*(2), 203–211.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.03.011>
- Schmidt, R., & Schippers, J. H. M. (2015). ROS-mediated redox signaling during cell differentiation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1850*(8), 1497–1508.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.12.020>
- Selmar, D., & Kleinwächter, M. (2013). Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, *42*(1), 558–566. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.020>
- Silva, E. N., Silveira, J. A. G., Ribeiro, R. V., & Vieira, S. A. (2015). Photoprotective function of energy dissipation by thermal processes and photorespiratory mechanisms in *Jatropha curcas* plants during different intensities of drought and after recovery. *Environmental and Experimental Botany*, *110*, 36–45.

- <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.09.008>
- Steinhorst, L., & Kudla, J. (2014). Signaling in cells and organisms — calcium holds the line. *Current Opinion in Plant Biology*, 22, 14–21.
- Takahashi, F., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Ichimura, K., & Shinozaki, K. (2011). Calmodulin-Dependent Activation of MAP Kinase for ROS Homeostasis in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 41(6), 649–660. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.029>
- Tooulakou, G., Giannopoulos, A., Nikolopoulos, D., Bresta, P., Dotsika, E., Orkoulas, M. G., ... Karabourniotis, G. (2016). Alarm Photosynthesis: Calcium Oxalate Crystals as an Internal CO₂ Source in Plants 1. *Plant Physiology*, 171, 2577–2585. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00111>
- Yang, S.-L., Lan, S.-S., Deng, F.-F., & Gong, M. (2016). Effects of Calcium and Calmodulin Antagonists on Chilling Stress-Induced Proline Accumulation in *Jatropha curcas* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(3), 815–826. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9584-3>
- Yang, S., Wang, F., Guo, F., Meng, J. J., Li, X. G., & Wan, S. B. (2014). Calcium contributes to photoprotection and repair of photosystem II in peanut leaves during heat and high irradiance. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57(5), 486–495. <https://doi.org/10.1111/jipb.12249>
- Zhang, S., Li, Q., Ma, K., & Chen, L. (2001). Temperature-Dependent Gas Exchange and Stomatal/Non-Stomatal Limitation to CO₂ Assimilation of *Quercus Liaotungensis* under Midday High Irradiance. *Photosynthesis Research*, 39, 383–388.

Capítulo 2: Cálcio e expressão gênica na sinalização e aclimação fotossintética após dano mecânico

Título curto: Cálcio na sinalização após dano mecânico

Felipe G. Campos^a, Marília C. Sousa^a, Diana P. Seixas^a, Alberto Mongolo-Júnior^a, Karina R. Ducatti^b, Tatiane M. Rodrigues^a, Edvaldo Ap. A. da Silva^b, Carmen S. F. Boaro^{a*}

^a Instituto de Biociências, UNESP: Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Botânica, CP. 510, CEP: 18.618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.

^b Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP: Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal, CEP: 18.610-307, Botucatu, São Paulo, Brazil.

*Carmen Sílvia Fernandes Boaro - carmen.boaro@unesp.br - <https://orcid.org/0000-0002-5524-0621>

***corresponding author**

Resumo

O cálcio é mensageiro secundário e exerce sua função por variação em sua concentração, ou pela interação com outras moléculas, como proteínas quinases, espécies reativas de oxigênio e hormônios. O objetivo deste estudo foi investigar a influência da variação de cálcio na sinalização de defesa do vegetal ao dano mecânico e sua aclimação fotossintética. *Solanum lycopersicum* Micro-Tom cultivada com 0, 2 e 4 mM de Ca²⁺, na presença ou ausência de dano mecânico foi avaliada em diferentes épocas. Expressão de genes de estresses, enzimas antioxidantes, peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica, histoquímica de peróxido de hidrogênio, fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e massa seca dos diferentes órgãos foram avaliados. Os resultados sugerem que peróxido de hidrogênio está envolvido na resposta ao dano mecânico em plantas sem cálcio. 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 da espécie e superação do estresse causado por dano mecânico.

Abstract

Calcium is a secondary messenger and exerts its function by varying its concentration, or by interacting with other molecules, such as protein kinases, reactive species of oxygen and hormones. The objective of this study was to investigate the influence of calcium variation on plant defense signaling to mechanical damage and its photosynthetic acclimatization. *Solanum lycopersicum* Micro-Tom cultured with 0, 2 and 4 mM Ca²⁺, with or without mechanical damage was evaluated at different times. Expression of stress genes, antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, hydrogen peroxide histochemistry, chlorophyll a fluorescence, gas exchange and dry mass of the different organs were evaluated. The results suggest that hydrogen peroxide is involved in the response to mechanical damage in plants without calcium. Presence of calcium was important in the defense and photosynthetic acclimation after mechanical damage and 2 mM of calcium in the nutrient solution were sufficient for defense of the species and overcoming the stress caused by mechanical damage.

Introdução

O cálcio é elemento indispensável para o crescimento das plantas e representa 0,1-5% da massa seca. Embora seja abundante na natureza, a deficiência pode ocorrer nos tecidos que crescem rápido onde são exigidas elevadas concentrações. Na sua ausência ocorrem sinais de deficiência como necrose em folhas jovens e podridão de flor e frutos (Tang and Luan, 2017).

O íon Ca^{2+} é transportado via xilema e sua regulação e distribuição na planta pode ser determinada pelo gradiente de potencial água em resposta às taxas de transpiração e crescimento dos tecidos (Tonetto de Freitas et al., 2014).

O cálcio atua como mensageiro secundário exercendo função por meio da modulação de sua concentração ou pela interação com outras moléculas como proteínas quinases, espécies reativas de oxigênio e hormônios (Baxter et al., 2013; Gilroy et al., 2016; Mittler et al., 2011; Takahashi et al., 2011).

Quando ocorre perturbação no tecido como consequência de dano mecânico, há produção de O_2^- e H_2O_2 , espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas envolvidas em ampla gama de processos biológicos, como crescimento, desenvolvimento e respostas a estímulos bióticos e abióticos (Baxter et al., 2013; Pandey et al., 2017; Suzuki and Mittler, 2012; Viridi et al., 2015).

Aumento de ERO promove abertura de canais de Ca^{2+} resultando em aumento desse elemento no citoplasma (Gilroy et al., 2016, 2014; Takahashi et al., 2011). Cálcio atua na ativação do Respiratory burst oxidase homologs-D (RBOHD), proteína responsável pela formação e propagação de uma onda de ERO do tecido estimulado para o não estimulado durante o estresse (Gilroy et al., 2016; Stael et al., 2015).

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).

Em frutos de tomate, calmodulina dependente da expressão do gene SICaM2, é dependente, entre outros fatores, de dano mecânico. Os genes SICaMs são ativados de forma diferente por JA em folhas e frutos, sendo portanto, sua expressão específica de cada tecido (Peng et al., 2014).

As calmodulinas apresentam importante papel na sinalização e ativação de quinases em resposta ao estresse (Yang and Poovaiah, 2002). Entre as quinases, MAPKs constituem módulos de sinalização conservados em eucariotos, ligando a percepção de estímulos a respostas celulares. Sua sinalização combina pelo menos três proteínas quinases, MAP3K, MAP2K e MAPK, ativadas de modo sequencial e dependente de fosforilação (Colcombet and Hirt, 2008).

Nas plantas, as cascatas MAPK foram caracterizadas principalmente pela detecção de patógenos, mas também foram ativadas por estiagem, salinidade, frio, ferimento, ozônio, ERO e estímulos hormonais, bem como por processos de desenvolvimento, como divisão e diferenciação celular ou abscisão (Danquah et al., 2014; Zelicourt et al., 2016).

Entre as quinases, as MPK1 e MPK2 são ativadas por ABA e estabelecem conexão direta entre ABA e MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases – Proteína quinase ativada por mitógeno). MPK1 e MPK2 em *Arabidopsis*, são ativadas por estresses induzido por ferimento, aplicação de hormônios ABA, JA ou H_2O_2 (Colcombet et al., 2016).

Aumento nos níveis de transcrição de MPK1 e MPK2 em tomate inoculado com vírus do mosaico do tabaco foi induzido em condições de estresse por frio, *paraquat* e seca. Silenciamento do gene RBOH1 reduziu em 70% a expressão dos genes MPK1 e

MPK2, sugerindo que H₂O₂ no apoplasto é essencial para a ativação de MPK1 e MPK2 (Zhou et al., 2014).

Aplicação de cálcio ativa calmodulina (Yang and Poovaiah, 2002) que proporciona melhor coordenação e ativação de enzimas antioxidantes e reduz peroxidação lipídica, o que permite a tolerância ao estresse, como induzido por níquel (Siddiqui et al., 2012, 2011; L. Xu et al., 2013). O cálcio sinaliza a transdução de sinal para expressão gênica e ativação de respostas bioquímicas, o que permite a neutralização das espécies reativas de oxigênio pelas enzimas antioxidantes de forma mais rápida e eficiente, protegendo os fotossistemas e mantendo a taxa fotossintética elevada (Yang et al., 2014).

Em *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum, cálcio exógeno minimizou a fotoinibição da FSII, pois restaurou os tecidos com clorofila, manteve elevada a expressão da proteína D1 e regulou a glutamina-S-transferase (Erinle et al., 2016).

Deficiência de cálcio em milho e tomate interferiu com o fluxo de elétrons, uma vez que desestabilizou o complexo de evolução do oxigênio e ocasionou maior dissipação de energia (Kalaji et al., 2014).

O Micro-Tom (MT) é planta modelo para estudos de expressão genica em processos fisiológicos (Aoki et al., 2010). Essa espécie de crescimento rápido pode ser utilizada para investigar expressão genica na sinalização, restabelecimento e aclimação fotossintética do vegetal após dano mecânico.

O objetivo deste estudo foi investigar a influência da variação de cálcio na sinalização de defesa ao dano mecânico e aclimação fotossintética.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu/SP, em casa de vegetação tipo “Paddy Fan”

com temperatura mantida em $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, coordenadas geográficas $48^{\circ}24'35''$ O e $22^{\circ}49'10''$ S, a 800 m acima do nível do mar.

Espécie vegetal e cultivo

Sementes de *Solanum lycopersicum* “cv Micro–Tom”, cedidas pelo professor Dr. Lázaro E. P. Peres, foram germinadas em bandejas conforme manual de cultivo (Pino and Peres, 2010).

Plantas jovens de tomate Micro–Tom, com 5 cm de altura, foram cultivadas em solução nutritiva, contendo 4 mM de Ca^{2+} (tratamento controle) e solução nutritiva modificada para fornecimento de concentrações iguais a 2 e 0 mM de Ca^{2+} (Tabela 1). Sete dias depois as plantas foram submetidas a dano mecânico por meio de secções realizadas com tesoura nos limbos foliares sem remoção das folhas (Figura 1). A partir da realização do dano mecânico as plantas foram mantidas nas mesmas soluções e avaliadas imediatamente, minutos, horas e dias depois. A expressão genica foi avaliada aos 30 minutos, 3, 6 e 24 horas após realização do dano mecânico. Determinações bioquímicas foram realizadas aos 0, 7, 14 e 21 dias. Avaliações de massa seca foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias e de histoquímica aos 30 minutos e 21 dias após realização do dano mecânico. As avaliações fotossintéticas foram realizadas aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias após realização do dano mecânico.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições, em esquema fatorial $3 \times 2 \times 5$, ou seja, 0, 2 e 4 mM de Ca^{2+} , presença e ausência de dano mecânico e épocas de avaliação que variaram, quando as plantas morreram como resultado do tratamento, segundo as determinações realizadas.

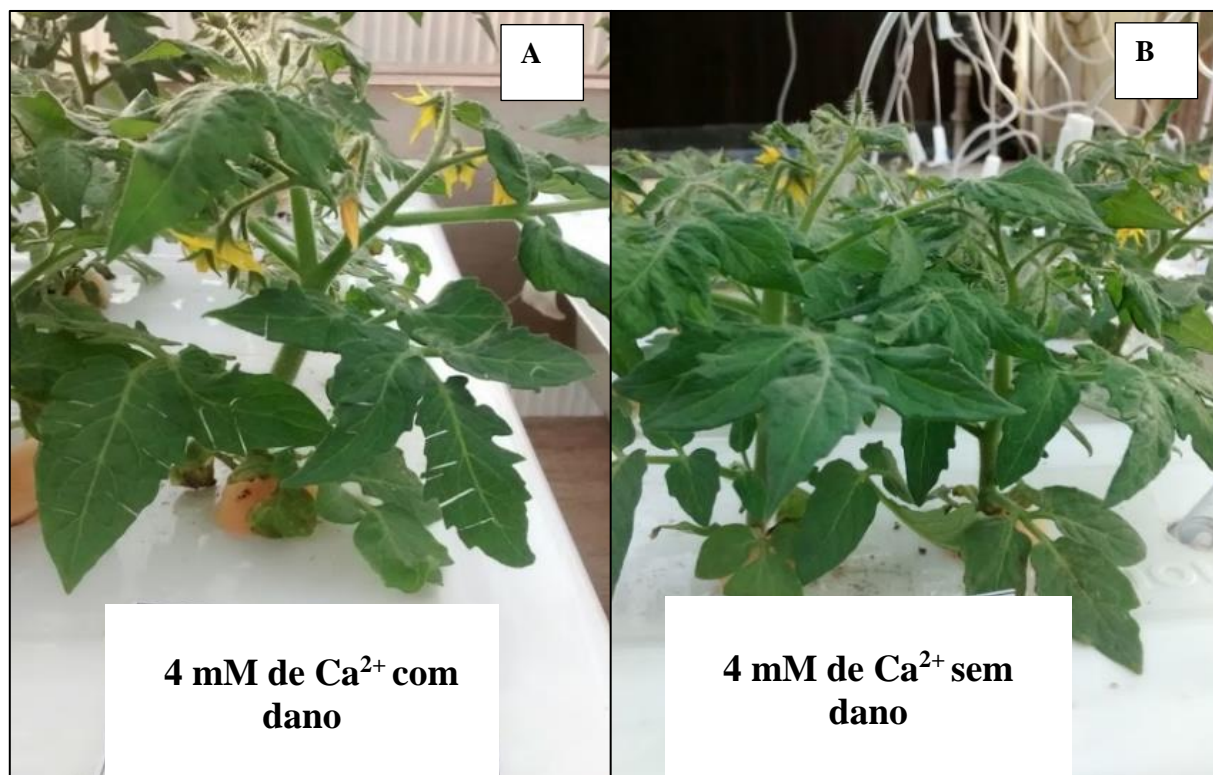


Figura 1: *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” cultivado com 4 mM de Ca^{2+} com (A) e sem (B) dano mecânico.

Tabela 1. Composição da solução nutritiva nº2 de Hoagland e Arnon e variação de cálcio para cultivo das plantas de *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. Rainer

Concentração de Ca^{+2} (mM)		4	2	0
Macronutrientes	Solução estoque (M)	Solução nutritiva (ml L^{-1})		
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	115,05	1,0	1,0	1,0
KNO_3	101,10	6,0	6,0	6,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236,16	4,0	2,0	0
$\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,50	2,0	2,0	2,0
NH_4NO_3	80,04	0	2,0	4,0
Micronutrientes	Solução estoque (g L^{-1})	1,0	1,0	1,0
H_3BO_3	2,86 g			
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81 g			
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22 g			
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08 g			
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,02 g			
Solução *Fe-EDTA	Solução estoque (g L^{-1})	1,0	1,0	1,0
$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	26,10 g			
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24,90 g			

*Solução catalizada por 265,00 mL NaOH (M)

Expressão gênica

A expressão dos genes *RBOH1* (*respiratory burst oxidase homolog 1*), *MPK1* (*encoding mitogen-activated protein kinase 1*), *MPK2* (*encoding mitogen-activated protein kinase 2*) e *Solanum lycopersicum calmodulina 2* (*SlCaM2*) (Tabela 2.) foi avaliada aos 30 minutos, 3, 6 e 24 horas após a realização do dano mecânico nas plantas cultivadas sem cálcio e com 2 mM Ca^{+2} com e sem dano mecânico. Para tanto, folhas foram coletadas às 9 horas, acondicionadas em sacos plásticos, embaladas em papel alumínio e congeladas em nitrogênio líquido, para paralisação imediata de todas as reações metabólicas. Essas amostras foram armazenadas em ultra freezer a -80°C e até as avaliações.

O estudo da expressão gênica foi realizado por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. O RNA extraído foi utilizado para confecção de cDNA, por transcrição reversa. A transcrição reversa foi realizada utilizando-se kits (Promega®) de extração, de conversão de RNAm em cDNA e syber para PCR. A técnica Real Time - PCR utilizou mistura de cDNA, *primer forward* e *primer reverse*, desenhados especificamente para os genes de interesse, *RBOH*, *MPK1*, *MPK2* e *SlCaM2* (Peng et al., 2014; Zhou et al., 2014), e iQ SYBR *Green supermix* (produto fluorescente). O protocolo de amplificação, que passou por ajustes para melhor desempenho dos *primers*, foi de 3 min a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C , seguido por 1 min a 95°C e 1 min a 55°C . A presença ou ausência de transcrito (mRNA) foi determinada pela reação de PCR em tempo real com detector de fluorescência acoplado a termociclador e a computador, com *software* específico. O método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ foi utilizado para o cálculo do nível de expressão gênica (mRNA) dos genes selecionados. Genes, já descritos na literatura, que têm expressão constitutiva foi utilizado como normalizador gene *Actin* – 185 pb. Três repetições biológicas para cada tratamento e três repetições técnicas para cada repetição biológica foram utilizadas.

Tabela 2. Primers usados na quantificação em tempo real (qRT-PCR).

Gene	Oligonucleotides	Gene ID	Referência	
<i>RBOH1 F</i>	5'-GGAGCTCCAGCACAAAGATTA-3'	SI08g081690	(Zhou et al., 2014)	
<i>RBOH1 R</i>	5'-CTTGTTGCAGCACTCATGTC-3'			
<i>MPK1 F</i>	5'- GCTGACAGATTGTTGCAGGT -3'	SI12g019460		
<i>MPK1 R</i>	5'- TCCACCCATAAAGATACATCA -3'			
<i>MPK2 F</i>	5'- TACTCGCTCGTTTGCTGTTG -3'	SI08g014420		
<i>MPK2 R</i>	5'- TTGGAGTACAGGAAAACAATGG -3'			
<i>SICaM2- F</i>	5'- TCTGAGGAGGAGTTGAAAGAGG- 3'	Solyc10g081170		(Peng et al., 2014)
<i>SICaM2- R</i>	5'-TCAACATCAGCTTCCCTAATCA-3'			
<i>Actin F</i>	5'-GGGATGATATGGAGAAGATATGG-3'	Actina -185 pb		(González et al., 2011)
<i>Actin R</i>	5'-AAGCACAGCCTGGATAGC-3'			

Atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, peroxidase, catalase e ascorbato peroxidase e quantificação de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica

As folhas foram coletadas, entre 9 e 11 horas, acondicionadas em sacos plásticos, embaladas em papel alumínio e congeladas em nitrogênio líquido, para paralisação imediata de todas as reações metabólicas e armazenadas em freezer a -20°C até a avaliação.

A extração das enzimas antioxidantes e proteínas foi realizada de acordo com metodologia proposta por Kar e Mishra (1976). O extrato obtido foi separado em microtubos e armazenado a -20°C para posterior determinação. Foram determinadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) (Misra and Gupta, 2006); peroxidase total (POD, EC 1.11.1.7) (c), catalase (CAT, EC: 1.11.1.6) (Peixoto et al., 1999) e ascorbato peroxidase (APX, EC: 1.11.1.1) (Nakano and Asada, 1981). Proteínas totais foram quantificadas segundo Bradford (1976), peroxidação lipídica, de acordo com Rama Devi e Prasad (1998) e peróxido de hidrogênio conforme Alexieva et al. (2001).

Análise histoquímica do peróxido de hidrogênio

Teste histoquímico foi realizado em secções anatômicas para localização de peróxido de hidrogênio com 3,3'- diaminobenzidina (DAB), segundo técnica descrita por (Thordal-Christensen et al., 1997).

Fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e biomassa vegetal

Em folhas totalmente expandidas, localizadas próximas ao dano mecânico e acondicionadas no escuro, durante 30 minutos foram determinadas medidas de fluorescência da clorofila *a* com fluorômetro portátil de pulso de amplitude modulada (Jr PAM, Walz) sob irradiância saturante 1150 DFFFA, entre 9 e 11 horas.

Foram determinados fluorescência mínima adaptada ao escuro (F_0), eficiência quântica potencial (F_v/F_m) definida pela relação entre eficiência variável (F_v) e máxima (F_m) e eficiência quântica efetiva do FSII (Φ_{PSII}), coeficiente de extinção não fotoquímico da fluorescência [$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$] ou seja, energia dissipada na forma de calor, taxa de transporte de elétrons ($ETR = DFFF * \Delta F / F_m' * 0,5 * 0,84$), coeficiente de extinção fotoquímico da fluorescência (q_L), fração de luz absorvida pela antena FSII que é dissipada como calor (D) e fração de energia de excitação não dissipada na antena, que não pode ser utilizada para a fase fotoquímica (Ex).

As avaliações de fluorescência da clorofila *a* na luz e de trocas gasosas foram realizadas no mesmo horário e em folhas nas mesmas condições, utilizando-se equipamento de sistema aberto de fotossíntese com analisador de CO_2 e vapor d'água por radiação infravermelha, com fluorômetro acoplado (Infra Red Gas Analyser – IRGA, modelo GFS 3000 FL, Walz). Entre as variáveis de fluorescência foram determinados rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}), taxa de transporte de elétrons (ETR), eficiência do

fotossistema II (F_v'/F_m'), fração de luz absorvida pela antena FSII que é dissipada como calor (D), fração de energia de excitação não dissipada na antena que não pode ser utilizada para a fase fotoquímica (Ex), *quenching* fotoquímico, dissipação fotoquímica (qL). Entre as variáveis de trocas gasosas, taxa de assimilação líquida de CO_2 (A , $\mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa de transpiração (E , $\text{mmol vapor d'água m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e condutância estomática (G_s , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foram avaliadas. A eficiência do uso da água (EUA , $\mu\text{mol } CO_2 (\text{mmol } H_2O)^{-1}$) foi determinada pela relação entre a taxa de assimilação líquida de CO_2 e a taxa de transpiração (A/E) e a eficiência instantânea de carboxilação da enzima ribulose 1,5-difosfato carboxilase (Rubisco) foi calculada pela relação da taxa de assimilação líquida de CO_2 e concentração interna de CO_2 na folha (A/C_i) (Zhang et al., 2001).

A massa seca total e dos diferentes órgãos do vegetal foram avaliadas, além da determinação da área das lâminas foliares.

Análise estatística

A homogeneidade das variáveis foi testada utilizando-se o teste de Levene. Foi realizado ajuste em modelo misto, para diluir o efeito das parcelas perdidas, seguido de análise de variância (Anova de três fatores) para peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio, utilizando-se função `lme` do pacote `nlme` (R 3.5.1 Core Team). As demais variáveis foram submetidas a análise de variância (Anova três fatores) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade (SigmaPlot 12.0).

Resultado

Expressão dos genes *RBOH1*, *MPK1*, *MPK2* e *SICaM2*

Esses genes apresentaram maior expressão 6 horas após o dano mecânico.

As plantas cultivadas sem Ca^{2+} e com dano mecânico apresentaram maior expressão do gene *RBOH1* (*respiratory burst oxidase homolog 1*), na maioria das avaliações. Ausência de cálcio e dano aumentou a expressão de *RBOH1* (Fig. 2).

Seis horas após o dano mecânico, o gene *MPK1* apresentou maior expressão nas plantas cultivadas com e sem Ca^{2+} e com dano mecânico. Dano mecânico aumentou a expressão de *MPK1* (*encoding mitogen-activated protein kinase 1*) (Fig. 2).

O gene *MPK2* revelou-se com maior expressão 6 horas após o dano mecânico nas plantas cultivadas com Ca^{2+} e com dano mecânico e 24 horas após o dano mecânico nas plantas cultivadas sem Ca^{2+} e com dano mecânico. Cálcio adiantou a expressão de *MPK2* (Fig. 2).

O gene *SlCaM2* apresentou maior expressão nas plantas com Ca^{2+} e com dano mecânico, 6 horas após o dano. Cálcio e dano mecânico contribuíram com aumento de *SlCaM2* (Fig. 2).

Atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, peroxidase, catalase e ascorbato peroxidase e quantificação de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica

As plantas cultivadas sem Ca^{2+} (0 mM de Ca^{2+}) apresentaram maiores atividades das enzimas SOD, POD e APx, de maneira geral, maiores quando submetidas a dano mecânico. Com 2 e 4 mM de Ca^{2+} independente do dano, de modo geral, não houve variação da atividade dessas enzimas (Fig. 3).

As maiores atividade da enzima CAT foram identificadas em plantas cultivadas sem cálcio e com 4 mM de Ca^{2+} com e sem dano (Fig. 3).

As plantas cultivadas com 2 e 4 mM de Ca^{2+} independente do dano mecânico não apresentaram variação na concentração de peróxido de hidrogênio e revelaram as

menores concentrações. Já as cultivadas sem Ca^{2+} e com dano mecânico apresentaram maior concentração de peróxido de hidrogênio imediatamente após o dano, que se revelou menor ou não variou nas demais avaliações (Fig. 4).

A peroxidação lipídica foi maior nas plantas cultivadas sem cálcio, em especial naquelas sem dano. Entre as plantas cultivadas na presença de cálcio a lipoperoxidação foi maior naquelas com 4 mM e dano mecânico (Fig. 5).

Deve se salientar que entre as plantas cultivadas na ausência de cálcio e com dano mecânico resistiram mais tempo à deficiência (Fig. 6 e 7).

Análise histoquímica do peróxido de hidrogênio

Trinta minutos após a realização do dano mecânico, as plantas cultivadas sem cálcio, com e sem dano, apresentaram marcações discretas pelo reativo 3,3'-diaminobenzidina (DAB), sendo restritas às paredes de células parenquimáticas da endoderme na face abaxial do limbo, das células do floema e dos elementos de vasos da nervura principal e nas nervuras de menor calibre (Fig. 8 a-d). Nessas condições não foi observada marcação nas células do mesofilo.

Nas plantas cultivadas com 2 mM de Ca^{2+} e sem dano mecânico, ocorreu marcação no interior de algumas células do parênquima paliçádico e do parênquima lacunoso (Fig. 8 e). A marcação por DAB foi intensa nas paredes celulares dos elementos de vasos da nervura principal (Fig. 8 f) e das de menor calibre.

Plantas cultivadas com 2 mM de Ca^{2+} e com dano mecânico, revelaram marcação de peróxido de hidrogênio no interior de algumas células do parênquima paliçádico e lacunoso (Fig. 8 g) e das células da cabeça de tricomas glandulares (Fig. 8 h). Marcações na parede dos elementos de vasos da nervura principal (Fig. 8 h) e nas de menor

calibre foram observadas. Nesse tratamento as marcações com DAB se mostraram mais intensas que nos tratamentos anteriores.

Aos 21 dias, as plantas cultivadas sem Ca^{2+} e sem dano mecânico apresentaram marcação sutil para peróxido de hidrogênio no interior de algumas células do parênquima paliçádico (Fig. 9 a) e nas paredes dos elementos de vaso da nervura principal (Fig. 9 b) e nas de menor calibre.

As plantas cultivadas sem Ca^{2+} e com dano mecânico apresentaram marcação nas paredes dos elementos de vaso das nervuras de menor calibre (Fig. 9 c) e da nervura principal (Fig. 9 d). Marcação foi detectada no interior das células da cabeça dos tricomas glandulares (Fig. 9 d).

Plantas cultivadas com 2 mM de Ca^{2+} e sem dano mecânico apresentaram marcações intensas para peróxido de hidrogênio nas paredes celulares dos elementos de vasos da nervura principal (Fig. 9 f) e nas de menor calibre. Não foram observadas células parenquimáticas marcadas no mesofilo (Fig. 9 e).

Nas plantas com 2 mM de Ca^{2+} e com dano mecânico, as marcações do peróxido de hidrogênio por DAB foram mais intensas e generalizadas. As marcações foram evidentes nas células da cabeça dos tricomas glandulares (Fig. 9 g), no interior das células do parênquima paliçádico e lacunoso (Fig. 9 g) e nas paredes dos elementos de vaso da nervura principal (Fig. 9 h) e das nervuras de menor calibre.

Secções transversais da região do mesofilo (Fig. 10 a) e da nervura principal (Fig. 10 b) do limbo foliar de *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” sem tratamento por DAB.

Fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e biomassa vegetal

Plantas de tomate cultivadas com 0 de Ca^{2+} com e sem dano mecânico apresentaram o mesmo desempenho da fluorescência da clorofila *a*.

As plantas cultivadas com 2 e 4 mM de Ca^{2+} com e sem dano mecânico apresentaram o mesmo desempenho da fluorescência da clorofila *a*. (Fig. 11 e 12).

Plantas de *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom cultivadas sem Ca^{2+} (0 mM Ca^{2+}), com e sem dano mecânico, em relação às demais, apresentaram, no escuro, decréscimos das eficiência quântica efetiva (ΦPSII), taxa de transporte de elétrons (ETR), eficiência quântica potencial (F_v/F_m) e eficiência do FSII (F_v'/F_m') ao longo do tempo, sendo elevada a fração de luz absorvida pela antena FSII e dissipada como calor (*D*) (Fig. 11). Na presença de luz, as plantas sem Ca^{2+} (0 mM Ca^{2+}), com e sem dano mecânico revelaram eficiência do FSII (F_v'/F_m'), *quenching* fotoquímico (qL), taxa de transporte de elétrons (ETR), eficiência quântica efetiva (ΦPSII), fração de energia de excitação não dissipada na antena e não utilizada na fotoquímica (*Ex*) mais baixos, sendo a fração de luz absorvida pela antena FSII e dissipada como calor (*D*) mais elevada (Fig. 12). Plantas de tomate cultivadas com 2 e 4 mM de Ca^{2+} com e sem dano mecânico apresentaram coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) elevado, ao longo das avaliações (Fig. 11).

As plantas cultivadas sem Ca^{2+} (0 mM Ca^{2+}), com e sem dano mecânico, em relação às demais, apresentaram baixas assimilação de carbono (*A*), condutância estomática (*G_s*), transpiração (*E*), eficiência do uso da água (EUA) e eficiência de carboxilação da rubisco (*A/C_i*) e elevada concentração de carbono intracelular (*C_i*) (Fig. 13), condições que contribuíram para menor área foliar e menores massas secas de raiz, caule, folha, flor, fruto e total nessas plantas (Fig. 6, 7 e 14).

Cultivadas com 2 e 4 mM de Ca^{2+} e sem dano mecânico, as plantas apresentaram taxa de assimilação de carbono, eficiência de carboxilação da rubisco e eficiência do uso da água semelhantes e revelaram, ao final das avaliações, resultados de massas secas de fruto, caule e total também semelhantes (Fig. 13 e 14). A massa seca de folha e raiz foi maior nas plantas cultivadas com 4 mM de Ca^{2+} (Fig. 14).

Plantas com 2 e 4 mM de Ca^{2+} e com dano mecânico apresentaram taxa de assimilação de carbono, eficiência de carboxilação da rubisco e eficiência do uso da água baixos em relação às plantas sem dano mecânico, tendo sido baixas as massas secas de caule, fruto e total (Fig. 13 e 14).

Dessa forma, os resultados demonstram que as plantas com dano mecânico na ausência de cálcio apresentaram desempenho fotossintético diferente daquelas com dano mecânico na presença do cálcio, sendo o Ex , na luz, das plantas com 0 mM Ca^{2+} e com dano mecânico baixo e nas plantas com 4mM de Ca^{2+} e com dano mecânico elevado aos 0 e 21 dias após realização do dano mecânico. Já o A/Ci das plantas com 0 mM Ca^{2+} e com dano mecânico foi maior que o das plantas com 0 mM Ca^{2+} e sem dano mecânico aos 7 dias após o dano mecânico. Essa variável nas plantas com 2 e 4 mM Ca^{2+} e com dano mecânico foi menor quando comparado ao das plantas com mesma concentração de cálcio e sem dano mecânico, aos 14, 21 e 28 dias após o dano mecânico.

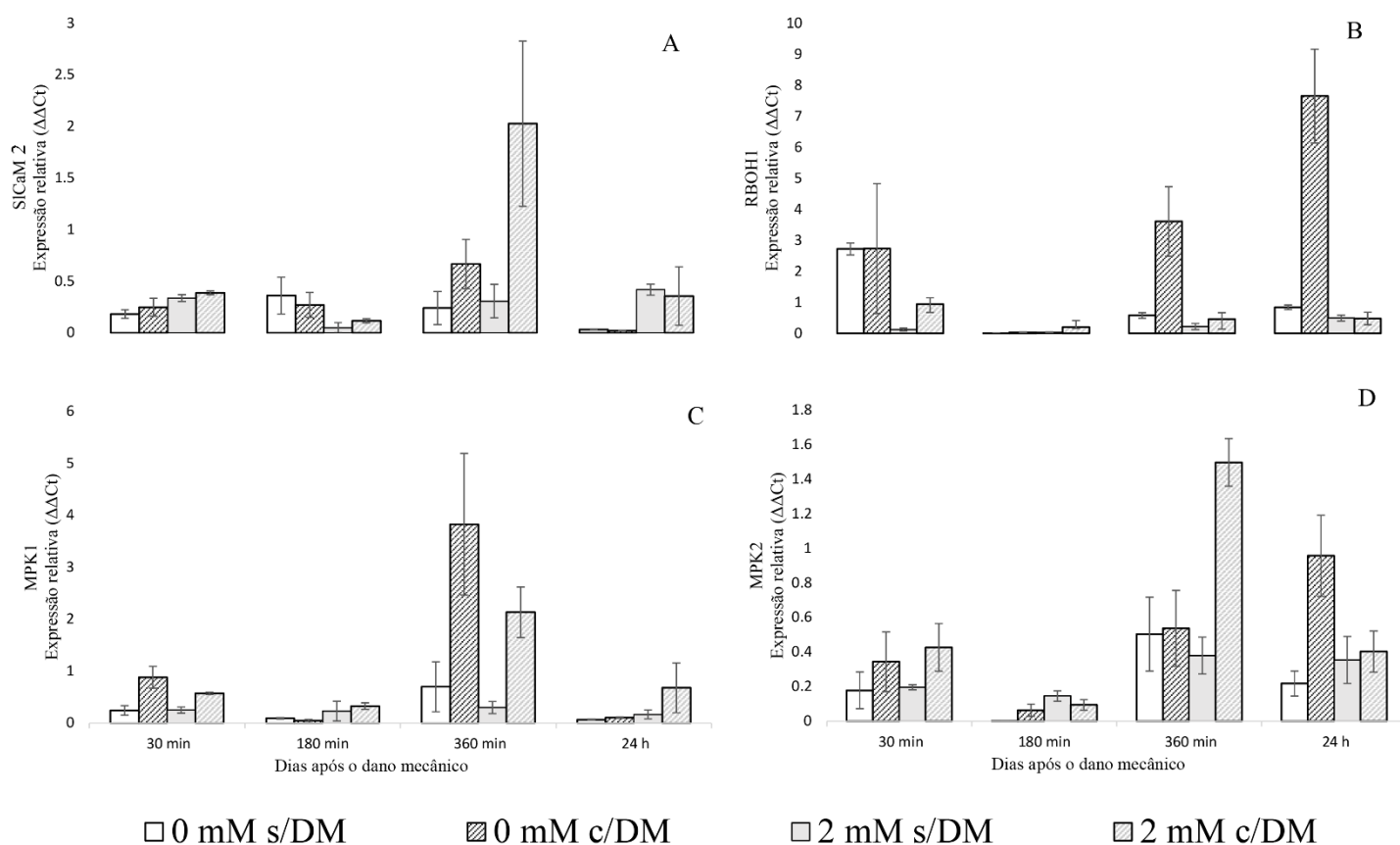


Figura 2: Expressão dos genes, **A.** *SlCaM 2* cálcio $p < 0,044$ e dano $p < 0,029$, **B.** *RBOH1* cálcio $p < 0,006$ e dano $p < 0,040$, *MPK1* Coleta : dano $< 0,001$ e *MPK2* Coleta : dano : cálcio $p < 0,002$ em plantas de *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” cultivadas com variação de cálcio (mM) e com (c/DM) ou sem dano mecânico (s/DM). Valores correspondentes às médias \pm SE ($n = 3$).

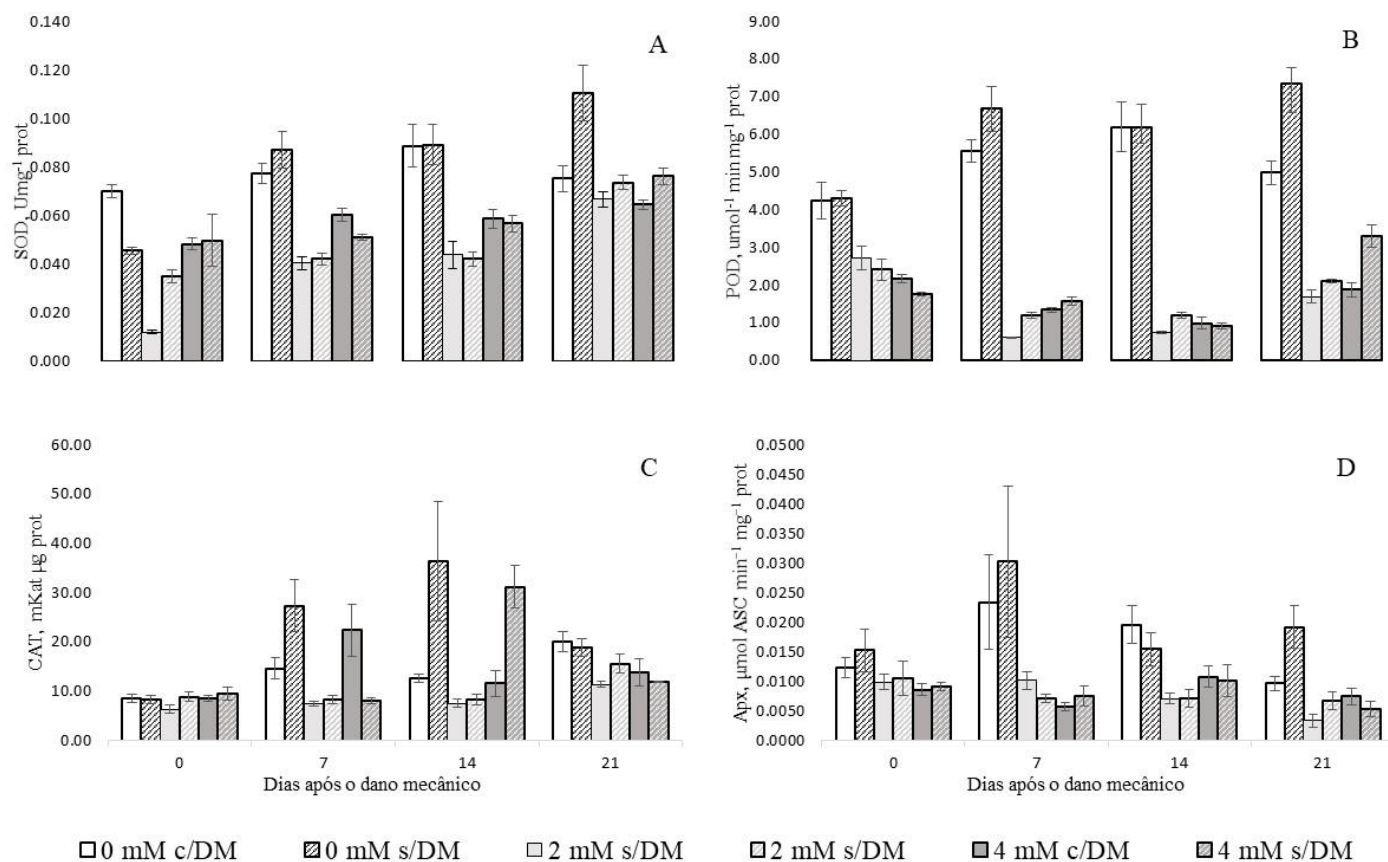


Figura 3: Atividade das enzimas antioxidantes, **A.** Superóxido dismutase (SOD) Coleta : dano : cálcio $p < 0,001$, **B.** Catalase (CAT) coleta : dano : cálcio $p < 0,033$, **C.** Peroxidase (POD) coleta : cálcio $p < 0,002$ e coleta : dano $p < 0,001$ e **D.** Ascorbato peroxidase (APx) coleta : cálcio $p < 0,001$, em plantas de *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” cultivadas com variação de cálcio (mM) e com (c/DM) ou sem dano mecânico (s/DM), nos tempos 0 (30 min), 7, 14 e 21 dias. Valores correspondentes às médias \pm SE (n = 4).

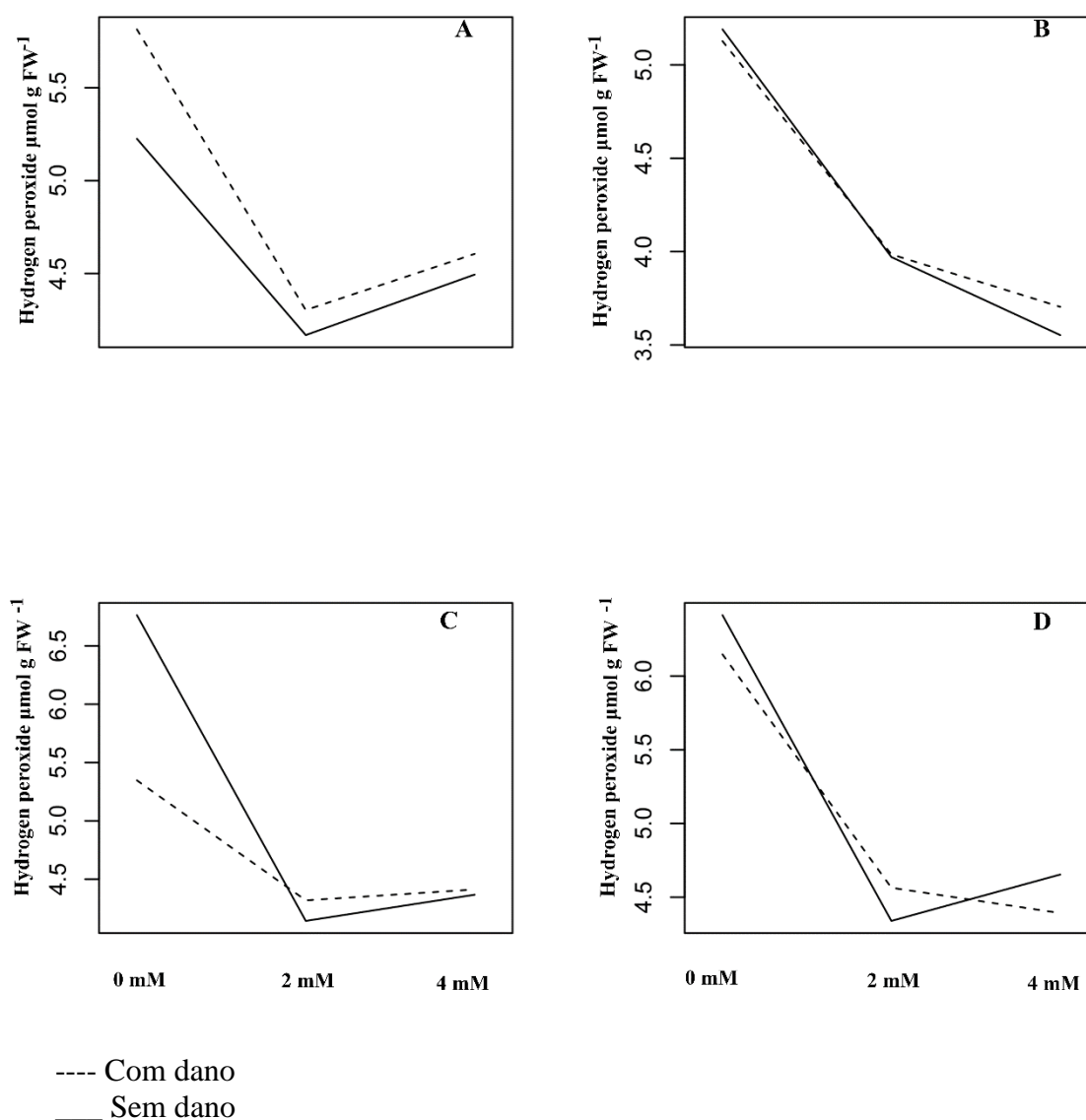
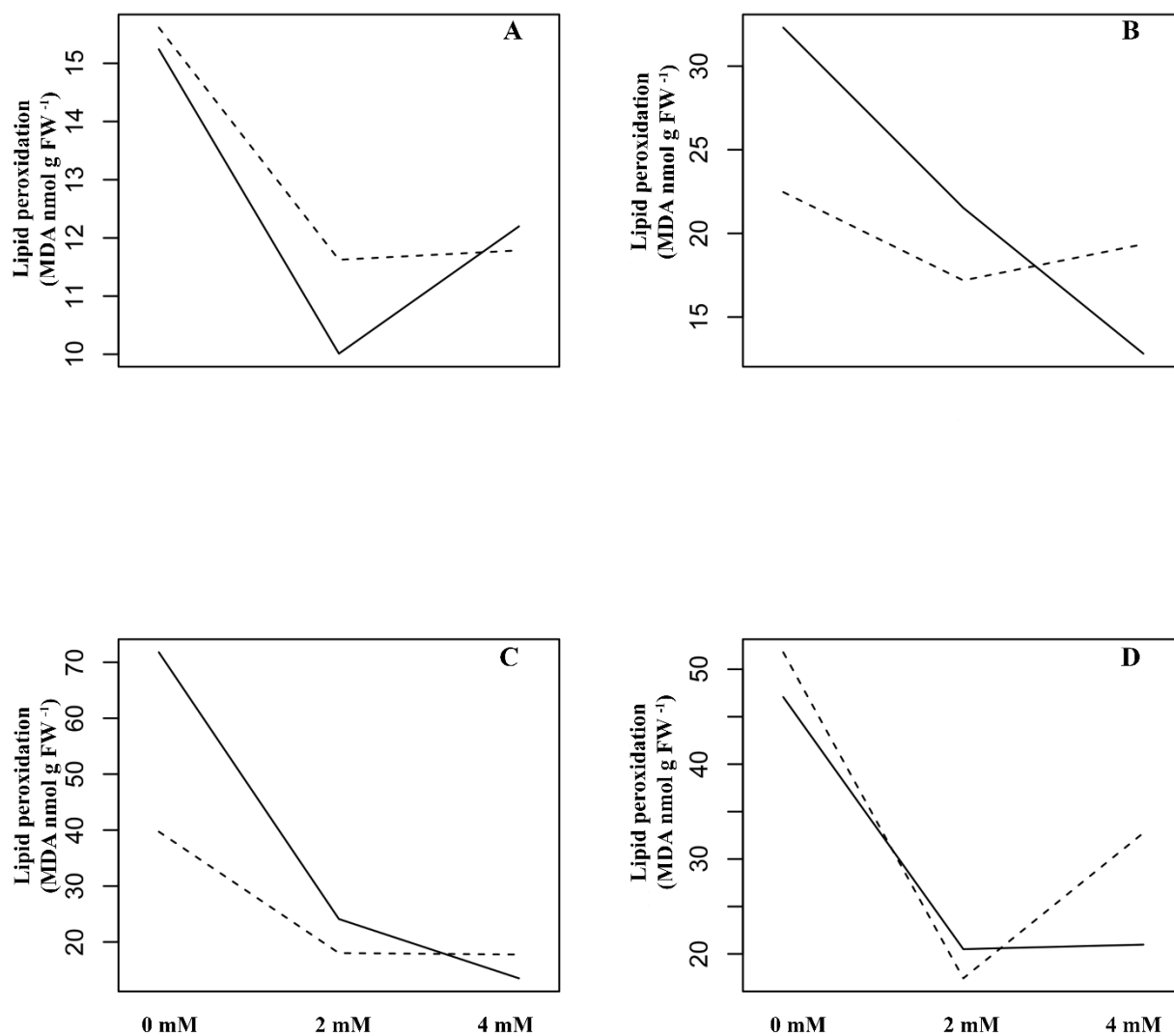


Figura 4: Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). **A.** coleta no tempo 0 (30 minutos após o dano mecânico), **B.** coleta aos 7 dias após o dano mecânico, **C.** coleta aos 14 dias após o dano mecânico e **D.** coleta aos 21 dias após o dano mecânico em plantas de *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” cultivadas com variação de cálcio (mM) e com (c/DM) ou sem dano mecânico (s/DM). Coleta: dano: cálcio $p < 0,0005$



---- Com dano

___ Sem dano

Figura 5: Peroxidação lipídica (expresso pela formação de malonaldeído). **A.** coleta no tempo 0 (30 minutos após o dano mecânico), **B.** coleta aos 7 dias após o dano mecânico, **C.** coleta aos 14 dias após o dano mecânico e **D.** coleta aos 21 dias após o dano mecânico em plantas de *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” cultivadas com variação de cálcio (mM) e com (c/DM) ou sem dano mecânico (s/DM). Coleta: cálcio $p < 0,0001$; dano:cálcio $p < 0,0220$.

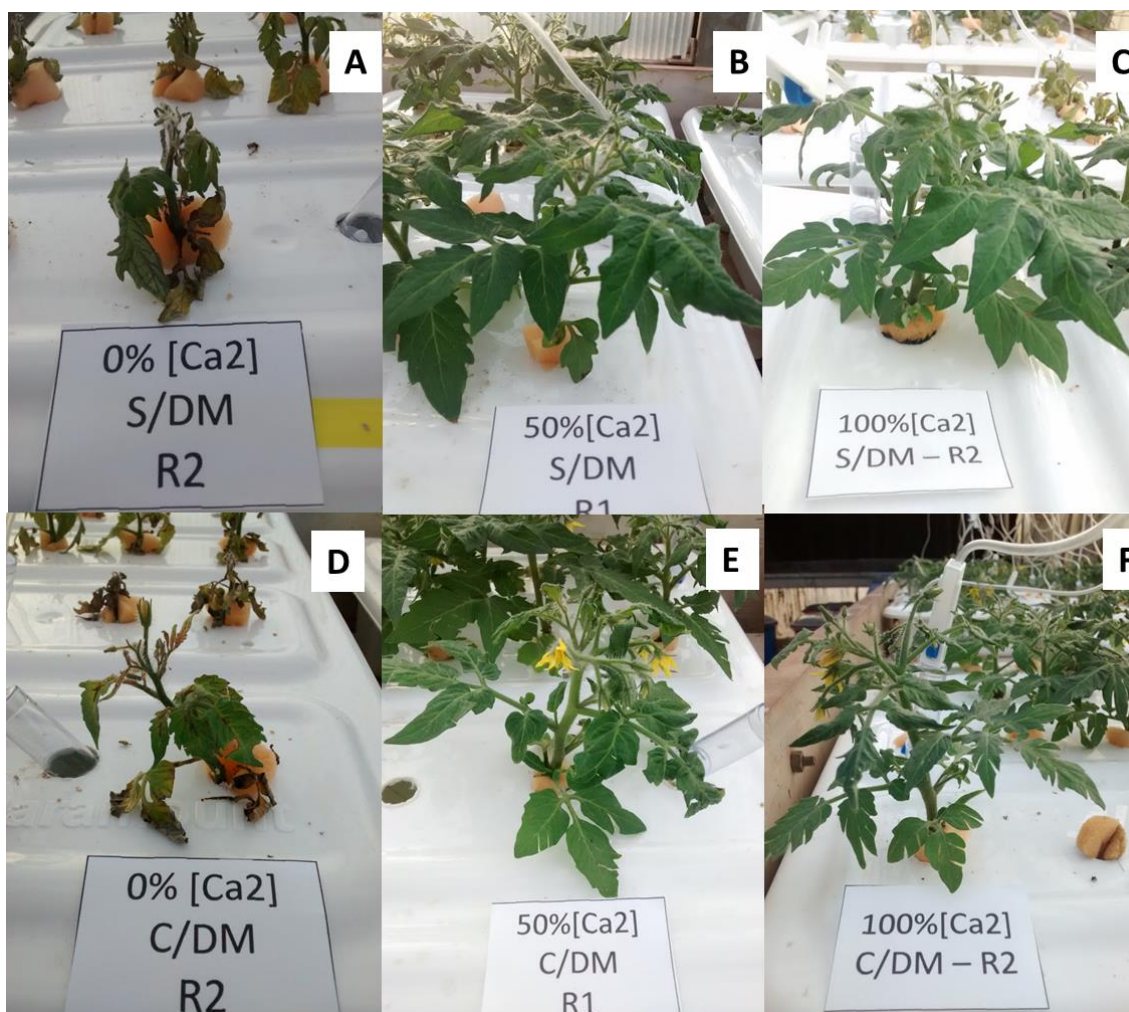


Figura 6: A-C. *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” com variação de cálcio sem dano mecânico D-F. *S. lycopersicum* “cv Micro-Tom” com variação de cálcio e dano mecânico 14 dias após sua realização

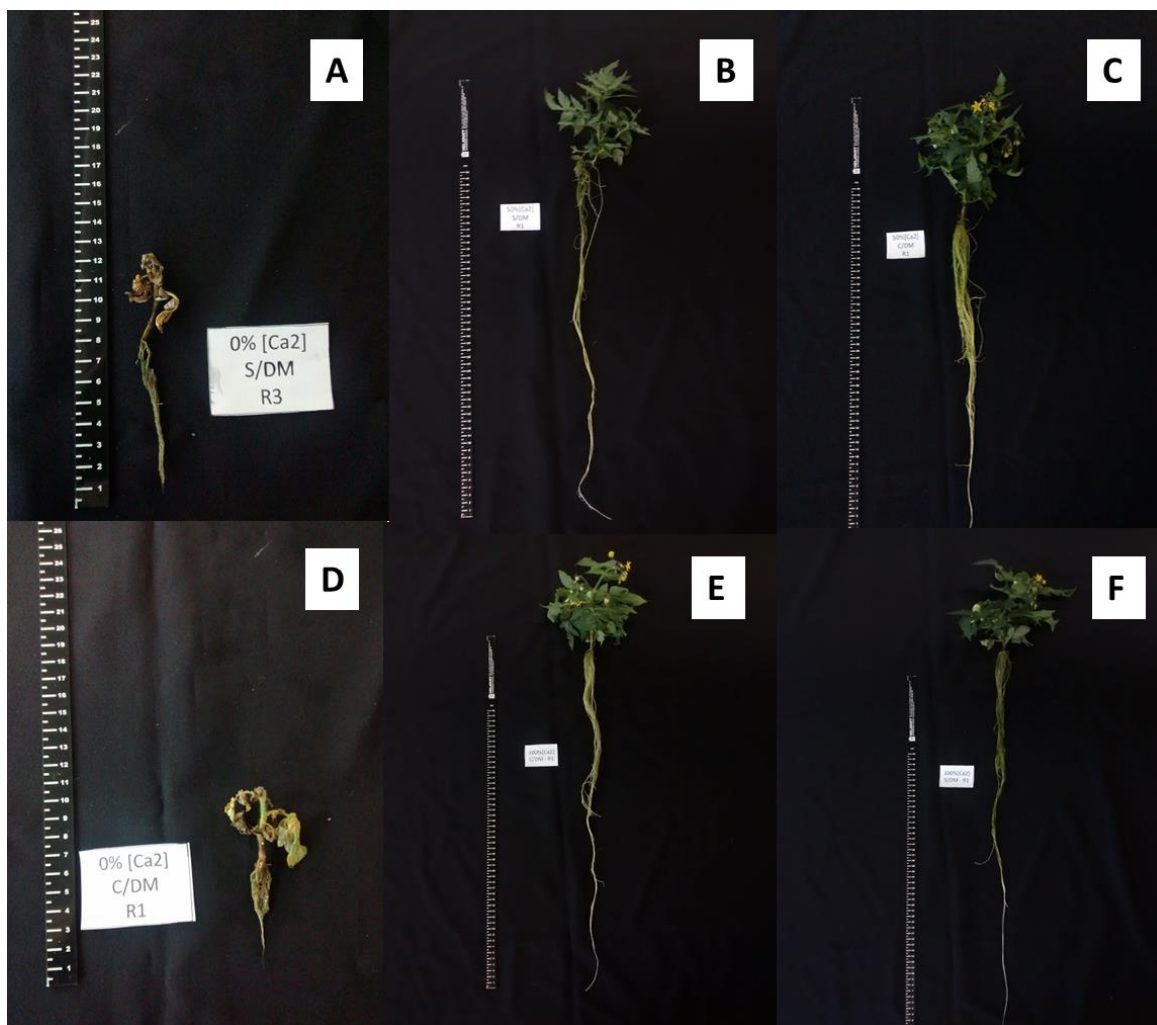


Figura 7: *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” cultivadas com variação de cálcio, aos 21 dias após dano mecânico. **A.** sem cálcio sem dano, **B.** 2 mM de cálcio sem dano, **C.** 4 mM de cálcio sem dano mecânico (s/DM); **D.** 0 mM de cálcio com dano, **E.** 2 mM de cálcio com dano e **F.** 4 mM de cálcio com dano mecânico (c/DM)

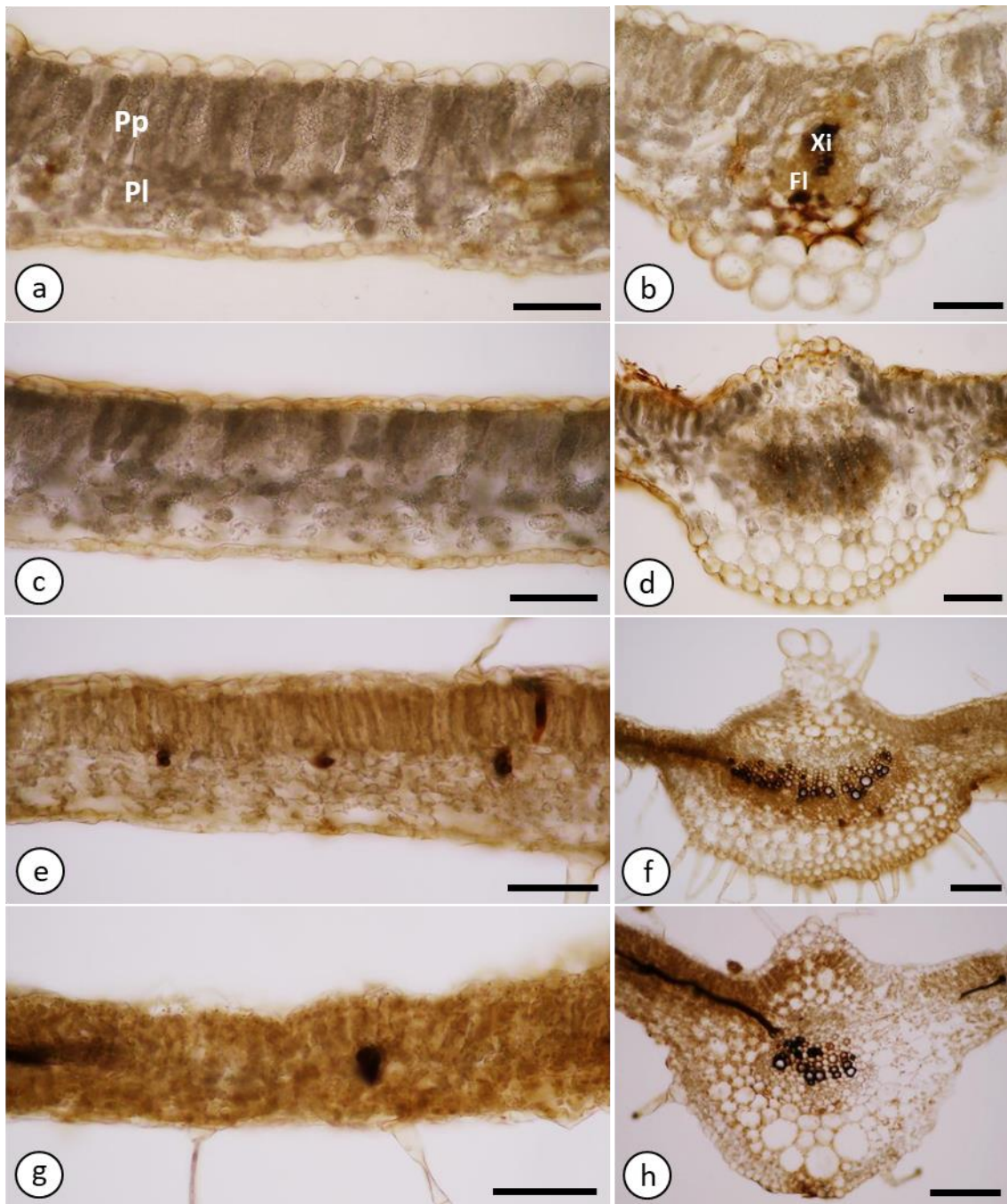


Figura 8. Fotomicrografias de seções transversais do limbo foliar de *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” tratadas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) aos 30 minutos após aplicação do dano mecânico. a-b. ausência de Ca^{2+} sem dano mecânico. c-d. ausência de Ca^{2+} com dano mecânico. e-f. 2 mM de Ca^{2+} sem dano mecânico. g-h. 2 mM de Ca^{2+} com dano mecânico. a, c, e, g. região do mesofilo. b, d, f, h. nervura principal. Pp – Parênquima Paliçádico; Pl- Parênquima lacunoso; En- endoderme; Xi – Xilema; Fl – Floema. Barras: (a, b, c, e, g = 100 μm); (d, f, h = 150 μm).

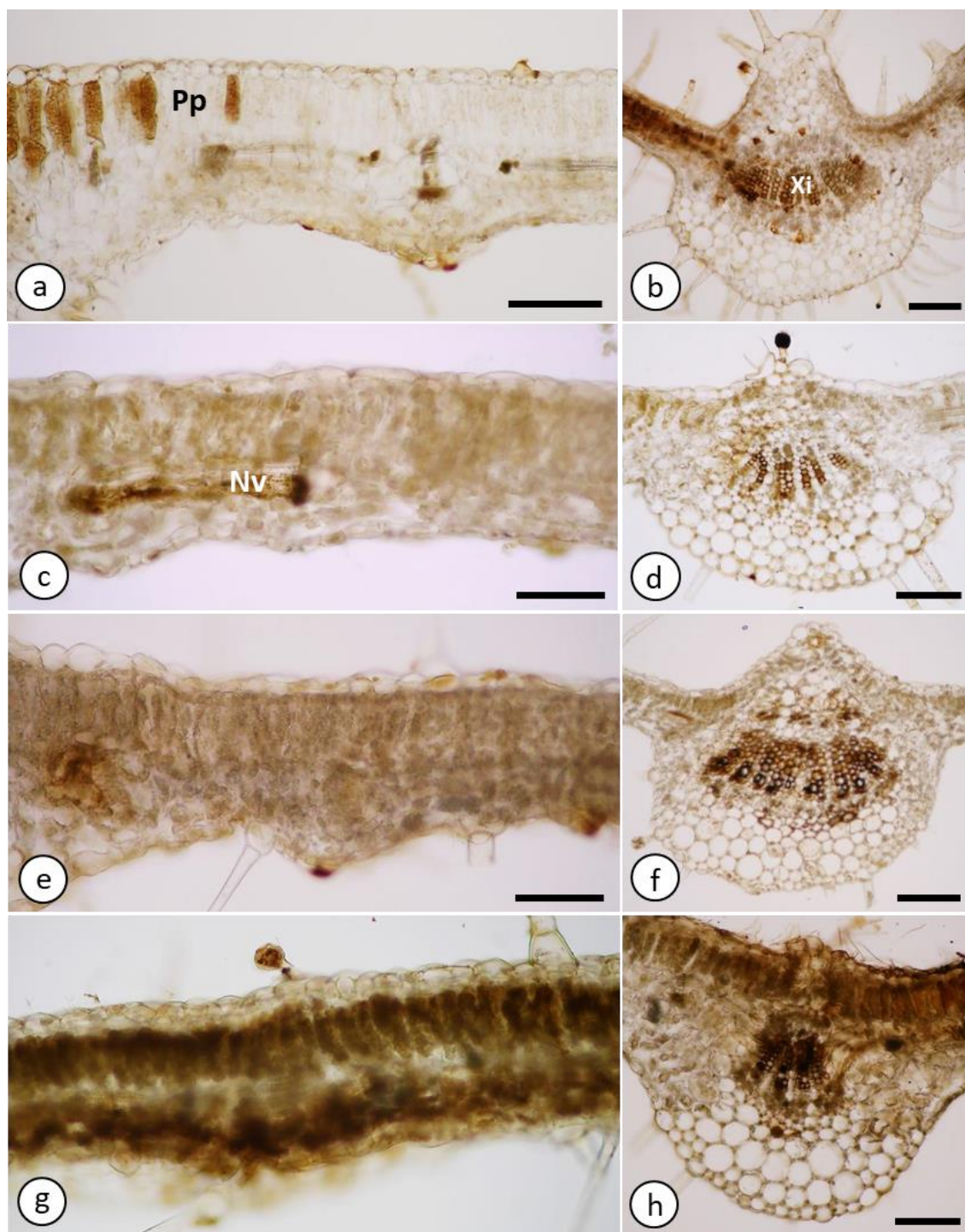


Figura 9. Fotomicrografias de secções transversais do limbo foliar de *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” tratadas com 3,3'- diaminobenzidina (DAB) aos 21 dias após aplicação do dano mecânico. a-b. ausência de Ca^{2+} sem dano mecânico. c-d. ausência de Ca^{2+} com dano mecânico. e-f. 2 mM de Ca^{2+} sem dano mecânico. g-h. 2 mM de Ca^{2+} com dano mecânico. a, c, e, g. região do mesofilo. b, d, f, h. nervura principal. Pp – Parênquima Paliçádico; Pl- parênquima lacunoso; Xi – Xilema; Fl-

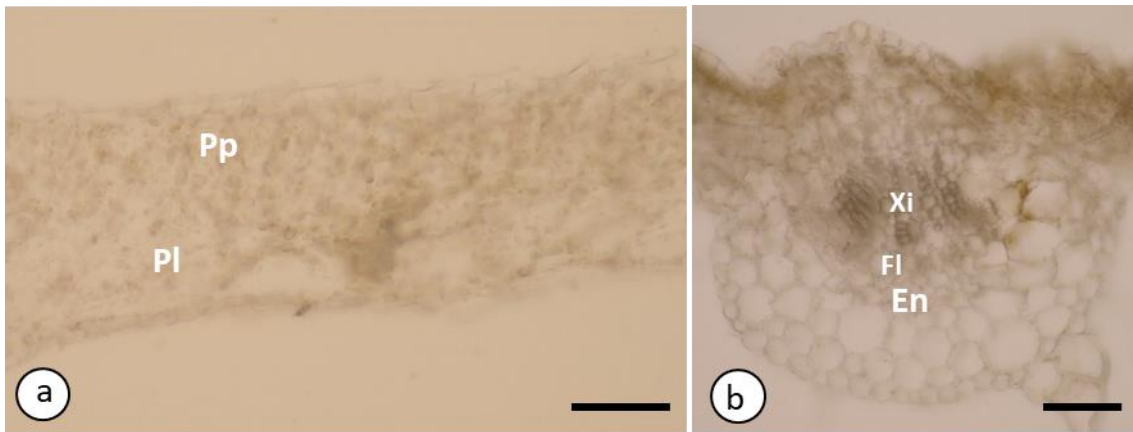


Figura 10. Fotomicrografias de secções transversais do limbo foliar de *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” sem aplicação de 3,3'- diaminobenzidina (DAB). a. região do mesofilo. b. nervura principal. Pp – Parênquima Paliçádico; Pl- parênquima lacunoso; Xi – Xilema; Fl- floema. Barras: (a = 100 μm); (b = 150 μm)

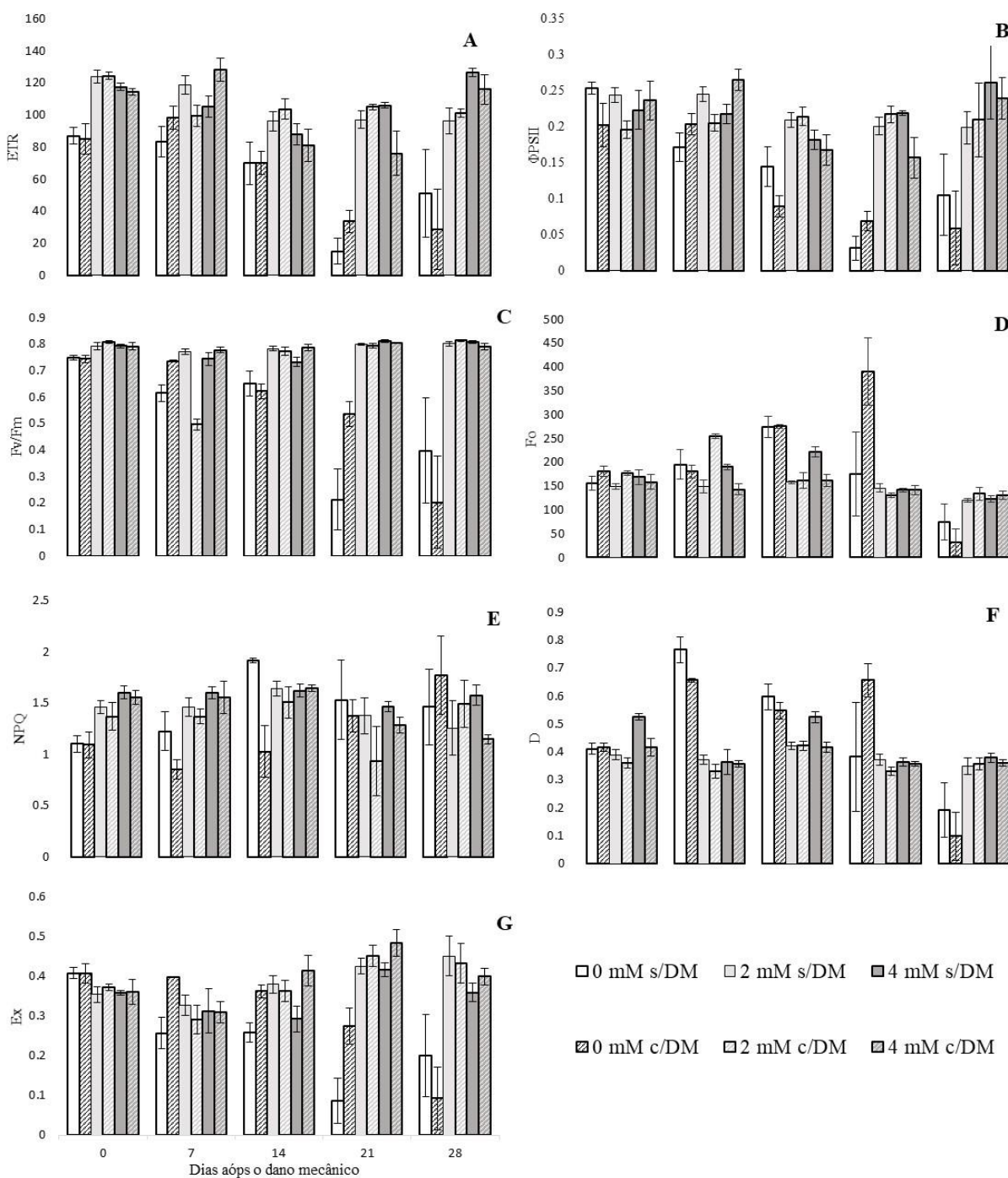


Figura 11: **A.** Taxa de transporte de elétrons (ETR) coleta : dano : cálcio $p < 0,008$; **B.** Rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}) cálcio: dano $< 0,005$, coleta : cálcio $p < 0,001$ e Coleta : dano $p < 0,040$; **C.** Eficiência quântica efetiva do PSII (F_v'/F_m') coleta : dano : cálcio $p < 0,001$; **D.** Eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m) coleta : dano : cálcio $p < 0,007$; **E.** Fluorescência mínima adaptada ao escuro (F_o) coleta : cálcio $p < 0,028$ e coleta : dano $p < 0,001$; **F.** Coeficiente de extinção não fotoquímica da fluorescência (NPQ) coleta : dano : cálcio $p < 0,033$; **G.** Fração de luz absorvida pela antena PSII que é dissipada como calor (D) coleta : dano : cálcio $p < 0,047$; **H.** Fração de energia de excitação não dissipada na antena que não pode ser utilizada para fotoquímica (Ex) coleta : cálcio $p < 0,001$ de plantas de *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” cultivadas com variação de cálcio e com (c/DM) ou sem dano mecânico (s/DM), acondicionadas no escuro, nos tempos 0 (30 min), 7, 14 e 21 dias. Valores correspondentes às médias \pm SE ($n = 4$).

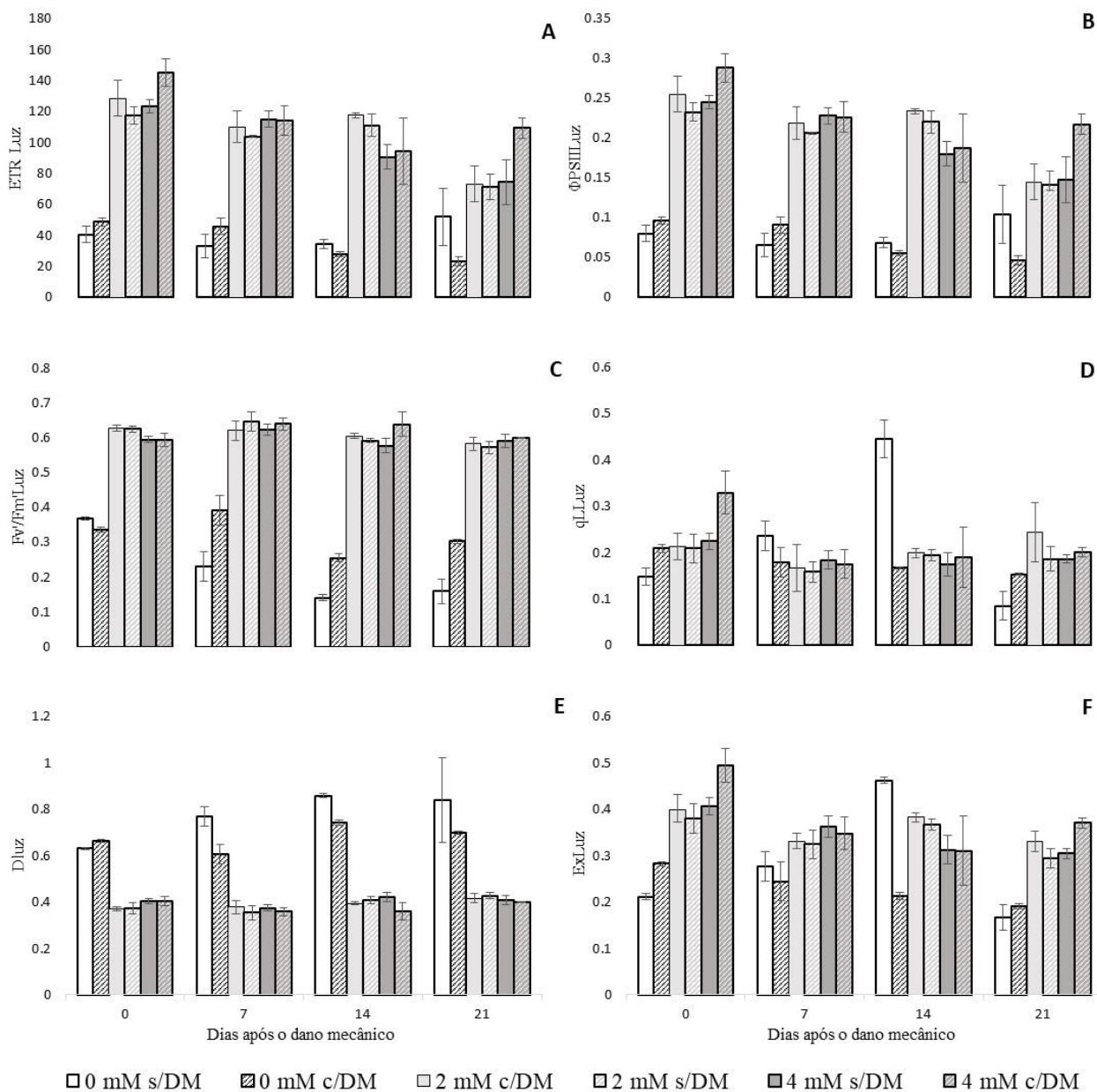


Figura 12: **A.** Eficiência do fotossistema II (F_v/F_m') cálcio: dano < 0,001, coleta : cálcio $p < 0,001$ e Coleta : dano $p < 0,017$; **B.** Taxa de transporte de elétrons (ETR) coleta : cálcio $p < 0,008$; **C.** Rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}) coleta : cálcio $p < 0,008$; coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência (qL) coleta : cálcio $p < 0,007$ e Coleta : dano $p < 0,025$; **E.** Fração de luz absorvida pela antena PSII e dissipada como calor (D) cálcio $p < 0,001$; **F.** Fração de energia de excitação não dissipada na antena não utilizada para fotoquímica (Ex) cálcio: dano < 0,005, coleta : cálcio $p < 0,001$ e coleta : dano $p < 0,040$ de plantas de *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” cultivadas com variação de cálcio e com (c/DM) ou sem dano mecânico (s/DM), na luz, nos tempos 0 (30 min), 7, 14 e 21 dias. Valores correspondentes às médias \pm SE ($n = 4$).

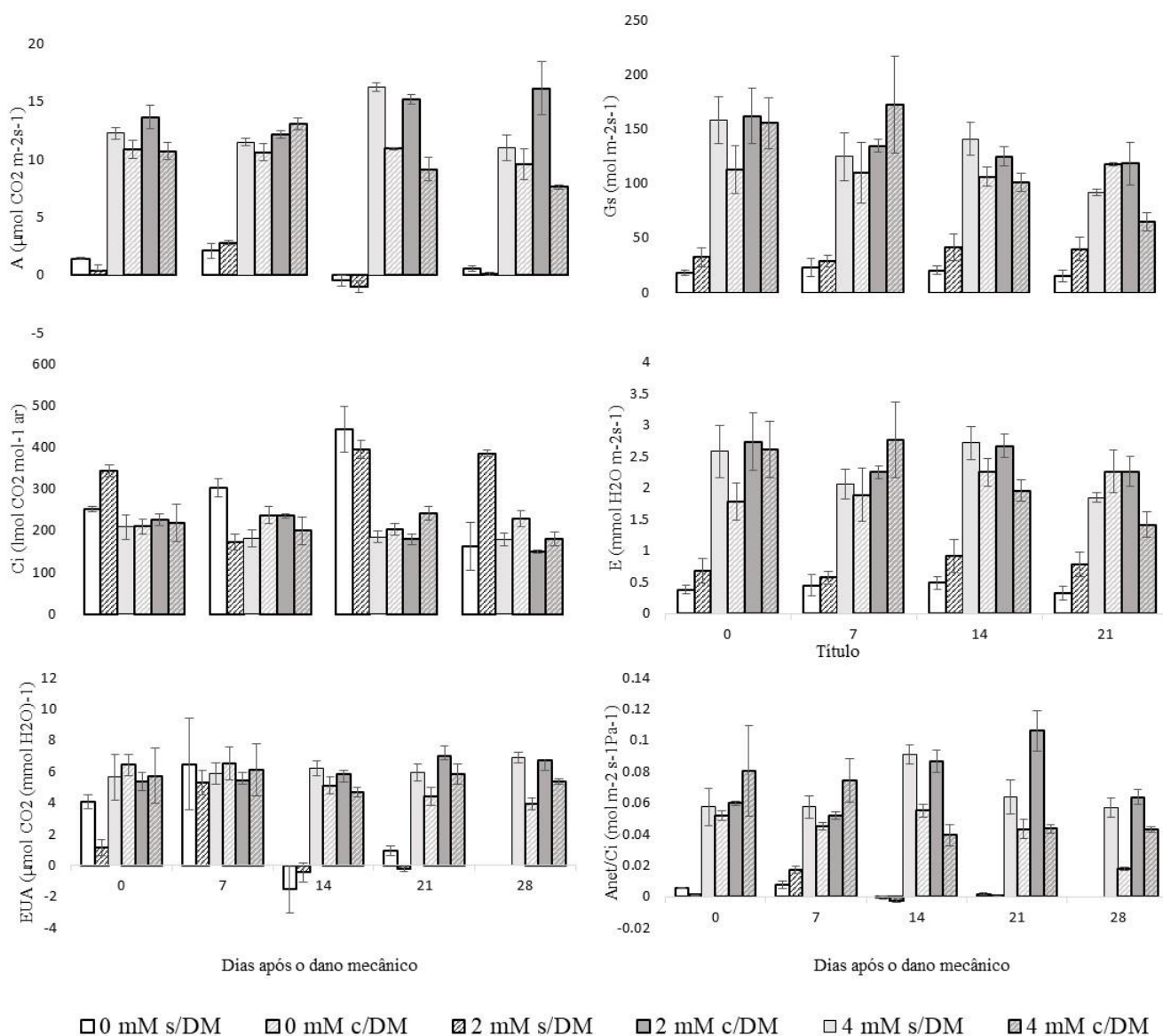


Figura 13 A. Taxa de assimilação de carbono (A) Coleta: dano: cálcio $p < 0,005$; **B.** Condutância estomática (G_s) cálcio $p < 0,001$; **C.** Carbono intracelular (C_i) Coleta: dano: cálcio $p < 0,001$; **D.** Transpiração (E) cálcio $p < 0,001$; **E.** Eficiência do uso da água (EUA) coleta : cálcio $p < 0,001$; **F.** Eficiência de carboxilação da Rubisco (A_{net}/C_i) Coleta : dano : cálcio $p < 0,016$ de plantas de *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” cultivadas com variação de cálcio e com (c/DM) ou sem dano mecânico (s/DM), nos tempos 0 (30 min), 7, 14 e 21 dias. Valores correspondentes às médias \pm SE ($n = 4$).

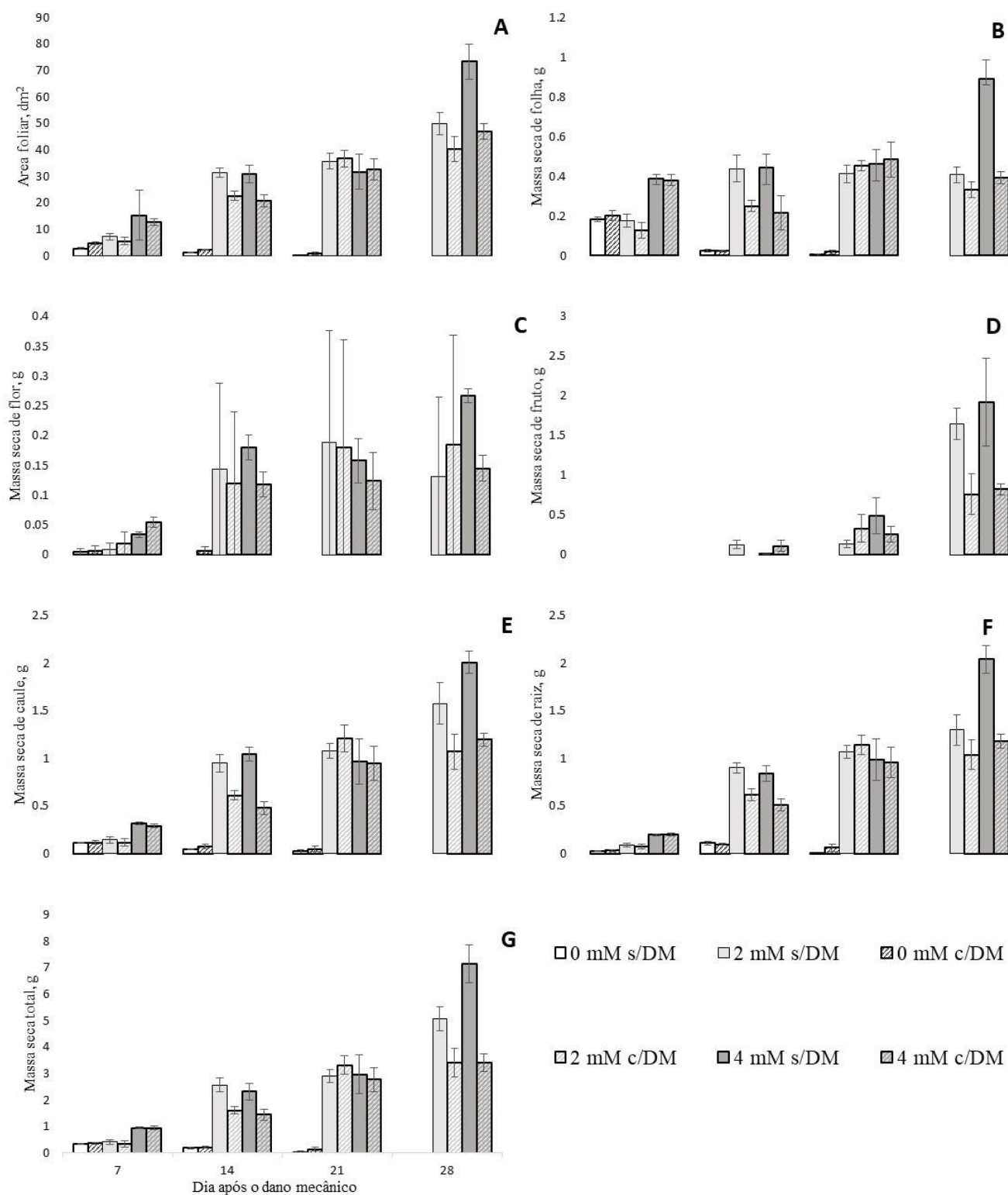


Figura 14 **A.** Área foliar (dm²) cálcio $p < 0,001$; **B.** Massa seca foliar (g) coleta : cálcio $p < 0,001$ e coleta : dano $p < 0,010$; **C.** Massa seca de flor (g) coleta : cálcio $p < 0,001$; **D.** Massa seca de fruto (g) coleta : cálcio $p < 0,037$; **E.** Massa seca de caule (g) coleta : cálcio $p < 0,001$ e coleta : dano $p < 0,015$; **F.** Massa seca de raiz (g) coleta : cálcio $p < 0,001$ e **G.** Massa seca total (g) Coleta : cálcio $p < 0,001$ de plantas de *Solanum lycopersicum* “cv Micro-Tom” cultivadas com variação de cálcio e com (c/DM) ou sem dano mecânico (s/DM). Valores correspondentes às médias \pm SE (n = 4).

Discussão

Plantas de *Solanum lycopersicum* “cv Micro–Tom” na ausência de Ca^{2+} apresentaram sinais de deficiência nutricional, revelaram necrose foliar e morte de gemas apicais, conforme bem documentado em estudos anteriores em que deficiência de cálcio ocorrendo em tecidos de crescimento rápido, onde são exigidas elevadas concentrações desse elemento, podem levar a necrose em folhas jovens e podridão de flores e frutos (Tang and Luan, 2017).

As plantas cultivadas sem Ca^{2+} e com dano mecânico apresentaram maior expressão do gene *RBOH1* aos 6 e 24 horas após o dano mecânico. Estudos encontrados na literatura revelam que esse gene é ativado pelo cálcio e a proteína que ele expressa é responsável pela produção e controle das espécies reativas de oxigênio envolvidas com a sinalização e propagação do sinal na planta (Li et al., 2015). Esses estudos sugerem que *RBOH1* está envolvido com sinal sistêmico, rápido, de célula a célula induzido pelo ferimento. Esse sinal acompanhado e dependente da produção e acumulação de H_2O_2 nos espaços extracelulares (Suzuki and Mittler, 2012) pode ser convertido em sinal radial, propagado entre células do xilema, pela liberação do Ca^{2+} , a partir do transportador GLRs (*glutamate receptor-like channels*), mecanismo que pode interligar sinais gerados pelo Ca^{2+} e ERO (Steinhorst and Kudla, 2014).

Além disso, a resposta da marcação de H_2O_2 por 3,3'- diaminobenzidina (DAB) sugere propagação do sinal via xilema, em plantas sem cálcio e com dano mecânico, condição que permite sugerir que ativação do gene *RBOH1* e propagação de sinal pode depender e estar ligada à presença de espécies reativas de oxigênio, na ausência de cálcio.

Nessas mesmas plantas, maior concentração de H_2O_2 contribuiu com a sinalização de mecanismos de defesa, com expressão de *MPK1* e *MPK2*, genes relatados na literatura com envolvimento no reconhecimento e superação do estresse (Danquah et

al., 2014; Zelicourt et al., 2016). Esses genes transcrevem quinases MPK1 e MPK2 envolvidas com ativação de enzimas antioxidantes, o que pode explicar maior atividade das enzimas antioxidantes nas plantas cultivadas sem cálcio e com dano mecânico. Silenciamento de *MPK1* e *MPK2*, resultou na diminuição dos níveis de transcrição de *Cu/Zn-SOD*, *cAPX*, *GRI* e *CATI* (Zhou et al., 2014).

Maior atividade da SOD, POD e Apx aos 21 dias após o dano mecânico pode explicar o maior tempo de sobrevivência das plantas submetidas ao dano mecânico mesmo sem Ca^{2+} .

Considerando, portanto, as plantas cultivadas sem cálcio e submetidas à dano mecânico, conclui-se que a ausência do mineral pode ter influenciado na ativação da calmodulina necessária para a ativação da MPK2 e de catalase, com baixa atividade nessas plantas, logo após o dano mecânico, e a primeira a neutralizar H_2O_2 . Mesmo tendo aumentado ao longo das avaliações, a catalase não controlou a concentração de H_2O_2 nessas plantas, confirmada pela presença de peróxido de hidrogênio no tecido vegetal marcado com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), que pode ter sido responsável pelo acúmulo de malondialdeído, resultado da peroxidação lipídica. Estudos já demonstraram a necessidade da ativação da calmodulina na coordenação da resposta ao dano mecânico, ativando as quinases MAPKs e enzimas antioxidantes envolvidas com a regulação dos níveis de H_2O_2 (Yang and Poovaiah, 2002).

Justificado talvez pela maior atividade da catalase nas plantas com dano mecânico, a marcação de peróxido de hidrogênio por DAB nas plantas cultivadas sem cálcio e com dano mecânico foi menos intensa quando comparada àquela das plantas sem cálcio e sem dano. A marcação sugere ainda necessidade do íon na ativação de peroxidases que neutralizam H_2O_2 presentes na parede celular das nervuras principais. Estudos

verificados na literatura referem que aplicação de cálcio estimula atividade de peroxidases de parede celular (Mika et al., 2008; Minibayeva et al., 2015; Plieth and Vollbehr, 2012).

As plantas cultivadas sem Ca^{2+} e sem dano mecânico não apresentaram os mecanismos de respostas ao estresse avaliados neste estudo, não sendo verificada expressão dos genes alvos. Nessas plantas a concentração de H_2O_2 , que aumentou com o tempo, mas foi menor que nas plantas sem cálcio e com dano logo após a realização do dano, não foi suficiente para percepção do estresse e ativação dos genes (*RBOH1*, *SlCaM2*, *MPK1* e *MPK2*), necessários na ativação da CAT para neutralização do H_2O_2 podendo ocorrer danos estruturais com acúmulo de malodealdeído.

A deficiência de cálcio também interferiu com o processo fotossintético e acúmulo de massa seca. As plantas de *Solanum lycopersicum* cultivadas sem Ca^{2+} , independente do dano mecânico, apresentaram prejuízo do funcionamento dos fotossistemas, revelando decréscimos de rendimento quântico potencial (F_v/F_m), eficiência do fotossistema II na luz (F_v'/F_m') e *quenching* fotoquímico na luz (qL), resultados indicativos de dificuldade na captação de luz, que sugere deficiência de cálcio para a estabilidade dos fotossistemas (Amao et al., 2010; Ramalho et al., 1995).

Além disso, nessas plantas, baixos rendimento quântico efetivo na luz (ΦPSII) e taxa de transporte de elétrons na luz (ETR) sugerem deficiência de cálcio no transporte de elétrons, influenciando produtividade quântica responsável pelo direcionamento da energia para redução do carbono. Sugere-se a importância do cálcio na estabilidade do complexo de evolução do oxigênio, que inativo interrompe o fluxo de elétrons nos fotossistemas (Hochmal et al., 2015; Kalaji et al., 2014), o que justifica a maior dissipação de energia na forma de calor na luz (*D*) e a maior energia não dissipada nem utilizada na fase fotoquímica na luz (*Ex*) no presente estudo.

A energia não dissipada (E_x) nas plantas cultivadas sem cálcio e sem dano mecânico pode ter sido responsável pela produção de H_2O_2 no cloroplasto, conforme já observado na literatura (Taylor et al., 2014) e que pode justificar células do parênquima paliádico dessas plantas marcadas por DAB.

Nestas plantas, sem cálcio e sem dano, a menor energia produzida na fase fotoquímica, com menor produção de agentes redutores pode explicar as baixas taxas de assimilação (A) e de eficiência de carboxilação da rubisco (A/C_i) e maior acúmulo de carbono interno. Estudos anteriores já revelaram esse efeito quando as plantas foram submetidas à estresse hídrico (Da Silva et al., 2010; Ribeiro et al., 2009). Menores condutância estomática (G_s), transpiração (E) e eficiência do uso da água (EUA) talvez encontrem explicação pelo fato da abertura estomática demandar sinalização com rápida oscilação de cálcio conforme já abordado por outros autores (Buchanan et al., 2015; Evans et al., 2001).

Ainda quanto às funções do cálcio, sua importância na formação da flor e do tubo-polínico para fecundação do óvulo e do intumescimento das paredes do ovário para formação do fruto (Himschoot et al., 2015), talvez justifique o fato das plantas cultivadas sem cálcio, independente do dano mecânico, terem revelado menores área foliar, massas secas de raiz, caule e folha e não terem produzido flores e frutos.

Plantas cultivadas com Ca^{2+} e com dano mecânico apresentaram maior expressão do gene *SlCaM 2* (gene de Calmodulina) aos 6 horas após o dano mecânico, o que sugere que a ativação desse gene depende da interação do Ca^{2+} com espécies reativas de oxigênio em nível mais baixo. Dessa forma, a calmodulina pode estar envolvida com a coordenação da ação das quinases e enzimas antioxidantes, de modo a tornar mais eficiente e rápida a resposta da planta ao dano, conforme dados da literatura que demonstram que CaM2 atua

na coordenação das quinases e enzimas antioxidantes (Yang et al., 2016; Yang and Poovaiah, 2002).

A baixa expressão dos genes *RBOH1*, *MPK1* e *MPK2* nas plantas cultivadas com Ca^{2+} e com dano mecânico sugere que essa concentração do íon possibilitou ajustes moleculares de modo que, apresentassem baixa atividade das enzimas antioxidantes e baixos níveis de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica, o que pode resultar em superação do estresse ao dano mecânico.

Plantas cultivadas com Ca^{2+} apresentaram reação com DAB sugerindo que presença de cálcio pode ter melhorado a atividade da peroxidase, marcada por esse reativo nos tecidos (Thordal-Christensen et al., 1997; Zhou et al., 2014). Nas plantas sem dano mecânico as nervuras principais e tricomas glandulares foram marcados, enquanto nas submetidas a dano mecânico, a nervura principal, xilema, parênquima paliçádico e tricoma glandular foram marcados. A marcação dos tricomas e do parênquima paliçádico pode ser explicada pela elevada atividade metabólica, conforme apresentada em estudos anteriores (Balcke et al., 2017) e nesse caso, pode ocorrer maior atividade das peroxidases.

Quanto ao processo fotossintético, as plantas cultivadas com 2 e 4 mM de Ca^{2+} , com e sem dano mecânico, apresentaram baixa fluorescência mínima adaptada ao escuro (F_0), elevada capacidade para absorver luz (F_v'/F_m'), baixa fração de luz absorvida pela antena FSII dissipada como calor no escuro (D) e baixa fração de energia de excitação não dissipada na antena e não utilizada para fotoquímica na luz (Ex), variáveis indicativas de que a presença de cálcio permitiu, na luz, fluxo normal de elétrons (ETR) e elevada produtividade quântica (Φ_{PSII}), o que pode indicar produção de agentes redutores para a redução do carbono (Neill et al., 2008). Essas plantas também revelaram baixa dissipação

de energia (Ex e D), conforme já observado em estudos com estresse por diferentes causas, entre elas, por cádmio (Amao et al., 2010; Drazkiewicz and Baszyński, 2008; Hochmal et al., 2015). Sugere-se que, conforme a literatura consultada, o cálcio tenha desencadeado sinalização das vias de defesa de modo a prevenir os danos do fotossistema (Yang et al., 2014). Essas condições contribuíram para elevada taxa de assimilação de carbono, atividade da rubisco e melhor controle da abertura estomática, com elevada eficiência do uso da água, conforme já referido por outros pesquisadores (Buchanan et al., 2015; Evans et al., 2001), condição não verificada nas plantas cultivadas na ausência de cálcio.

Considerando as trocas gasosas quando se comparam as plantas com e sem dano mecânico, com de 2 e 4 mM de Ca^{2+} houve decréscimo das eficiências do uso da água e da atividade da rubisco, nas com dano. Esse resultado sugere que dano mecânico aumentou espécies reativas de oxigênio (Pospíšil and Prasad, 2014), gerando sinal para ativação de vias de defesas, com direcionamento dos recursos fotossintéticos para reversão do estresse. A atividade da rubisco e a menor produção de massas secas confirmam esse direcionamento. Deve ser ressaltado que as plantas cultivadas com cálcio e submetidas ao dano mecânico, embora não tenham apresentado os melhores resultados se recuperaram, o que está de acordo com outros estudos (Erinle et al., 2016; Yang et al., 2014).

Com base nos resultados e estudos registados na literatura (Minibayeva et al., 2015; Zhou et al., 2014), dano pode ser tão importante quanto cálcio para ativação de mecanismos de respostas ao estresse. Dessa forma aplicação de cálcio em plantas com dano mecânico melhorou as respostas de defesa.

Além disso, parte da sinalização ao dano mecânico deve ter sido realizada por espécies reativas de oxigênio, uma vez que elevados níveis de H_2O_2 e expressão de genes de quinases e RBOH1 foram observados nas plantas sem cálcio, cuja presença também é necessária para resposta eficiente ao estresse.

Conclusão

Conclui-se que peróxido de hidrogênio está envolvido na resposta ao dano mecânico em plantas sem cálcio.

Presença de cálcio foi importante na defesa e aclimatação fotossintética após dano mecânico.

O cultivo da espécie com metade da concentração de cálcio aplicado na solução nutritiva foi suficiente para defesa, superando o estresse por dano mecânico.

Bibliografia

- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell Environ.* 24, 1337–1344. doi:10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x
- Amao, Y., Takai, K., Ohashi, A., 2010. Effect of manganese and calcium ions on the photoinduced water oxidation with photosynthesis organ grana from green plant. *Appl. Catal. B Environ.* 97, 36–40. doi:10.1016/j.apcatb.2010.03.018
- Aoki, K., Yano, K., Suzuki, A., Kawamura, S., Sakurai, N., Suda, K., Kurabayashi, A., Suzuki, T., Tsugane, T., Watanabe, M., Ooga, K., Torii, M., Narita, T., Shin-i, T., Kohara, Y., Yamamoto, N., Takahashi, H., Watanabe, Y., Egusa, M., Kodama, M., Ichinose, Y., Kikuchi, M., Fukushima, S., Okabe, A., Arie, T., Sato, Y., Yazawa, K., Satoh, S., Omura, T., Ezura, H., Shibata, D., 2010. Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. *BMC Genomics* 11, 2–6. doi:10.1186/1471-2164-11-210
- Balcke, G.U., Bennewitz, S., Bergau, N., Athmer, B., Henning, A., Majovsky, P., Jiménez-Gómez, J.M., Hoehenwarter, W., Tissier, A., 2017. Multi-Omics of Tomato Glandular Trichomes Reveals Distinct Features of Central Carbon Metabolism Supporting High Productivity of Specialized Metabolites OPEN. *Plant Cell* 29, 960–983. doi:10.1105/tpc.17.00060
- Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N., 2013. ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Bot.* 65, 1229–1240. doi:10.1093/jxb/ert375
- Bouché, N., Scharlat, A., Snedden, W., Bouchez, D., Fromm, H., 2002. A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms. *J. Biol. Chem.* 277, 21851–21861. doi:10.1074/jbc.M200268200
- Bradford, M.M., 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. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L., 2015. *BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS*, John Wiley. ed. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex.
- Colcombet, J., Hirt, H., 2008. Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem. J.* 413, 217–26. doi:10.1042/BJ20080625
- Colcombet, J., Sözen, C., Hirt, H., 2016. Convergence of Multiple MAP3Ks on MKK3

- Identifies a Set of Novel Stress MAPK Modules. *Front. Plant Sci.* 07, 1941. doi:10.3389/fpls.2016.01941
- Da Silva, L., Marchiori, P.E.R., Maciel, C.P., Machado, E.C., Ribeiro, R.V., 2010. Fotossíntese, relações hídricas e crescimento de cafeeiros jovens em relação à disponibilidade de fósforo. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 45, 965–972. doi:10.1590/S0100-204X2010000900005
- Danquah, A., de Zelicourt, A., Colcombet, J., Hirt, H., 2014. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol. Adv.* 32, 40–52. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.09.006
- Devi, S.R., Prasad, M.N. V, 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Sci.* 138, 157–165. doi:10.1016/S0168-9452(98)00161-7
- Drazkiewicz, M., Baszyński, T., 2008. Calcium protection of PS2 complex of *Phaseolus coccineus* from cadmium toxicity: In vitro study. *Environ. Exp. Bot.* 64, 8–14. doi:10.1016/j.envexpbot.2007.12.010
- Erinle, K.O., Jiang, Z., Ma, B., Li, J., Chen, Y., Ur-Rehman, K., Shahla, A., Zhang, Y., 2016. Exogenous calcium induces tolerance to atrazine stress in *Pennisetum* seedlings and promotes photosynthetic activity, antioxidant enzymes and psbA gene transcripts. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 403–412. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.06.035
- Evans, N.H., McAinsh, M.R., Hetherington, A.M., 2001. Calcium oscillations in higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 415–420. doi:10.1016/S1369-5266(00)00194-1
- Gilroy, S., Bia, M., Suzuki, N., Górecka, M., Devireddy, A.R., Mittler, R., 2016. Update on Reactive Oxygen Species and Systemic Signaling ROS , Calcium , and Electric Signals : Key Mediators of Rapid Systemic Signaling in Plants. *Plant Physiol.* 171, 1606–1615. doi:10.1104/pp.16.00434
- Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W., Toyota, M., Devireddy, A.R., Mittler, R., 2014. A tidal wave of signals : calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends Plant Sci.* 19, 5–7.
- González, R.M., Ricardi, M.M., Iusem, N.D., 2011. Atypical epigenetic mark in an atypical location: cytosine methylation at asymmetric (CNN) sites within the body of a non-repetitive tomato gene. *BMC Plant Biol.* 11, 94. doi:10.1186/1471-2229-11-94
- Himschoot, E., Beeckman, T., Friml, J., Vanneste, S., 2015. Calcium is an organizer of cell polarity in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 2168–72. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.02.017

- Hochmal, A.K., Schulze, S., Trompelt, K., Hippler, M., 2015. Calcium-dependent regulation of photosynthesis ☆. *Biochim. Biophys. Acta*.
- Kalaji, H., Oukarroum, A., Alexandrov, V., Kouzmanova, M., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I. a., Cetner, M.D., Allakhverdiev, S.I., Goltsev, V., 2014. Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements. *Plant Physiol. Biochem.* 81, 16–25. doi:10.1016/j.plaphy.2014.03.029
- Li, X., Zhang, H., Tian, L., Huang, L., Liu, S., Li, D., Song, F., 2015. Tomato SIRbohB, a member of the NADPH oxidase family, is required for disease resistance against *Botrytis cinerea* and tolerance to drought stress. *Front. Plant Sci.* 6, 1–14. doi:10.3389/fpls.2015.00463
- Mika, A., Buck, F., Lüthje, S., 2008. Membrane-bound class III peroxidases: Identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots. *J. Proteomics* 71, 412–424. doi:10.1016/j.jprot.2008.06.006
- Minibayeva, F., Beckett, R.P., Kranner, I., 2015. Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding. *Phytochemistry* 112, 122–129. doi:10.1016/j.phytochem.2014.06.008
- Misra, N., Gupta, A.K., 2006. Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. *J. Plant Physiol.* 163, 11–18. doi:10.1016/j.jplph.2005.02.011
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F., 2011. ROS signaling: The new wave? *Trends Plant Sci.* 16, 300–309. doi:10.1016/j.tplants.2011.03.007
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Physiol.* 22, 867–80. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., Wilson, I., 2008. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 59, 165–176. doi:10.1093/jxb/erm293
- Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T., Negi, Y.K., Arora, S., Reddy, M.K., 2017. Abiotic Stress Tolerance in Plants: Myriad Roles of Ascorbate Peroxidase. *Front. Plant Sci.* 8, 581. doi:10.3389/fpls.2017.00581
- Peixoto, H.P.P., Cambraia, J., Sant, A.R., Mosquim, R., Moreira, M.A., 1999. Aluminum Effects on Lipid Peroxidation and on the Activities of Enzymes of Oxidative

- Metabolism in Sorghum 1. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 11, 137–143.
- Peng, H., Yang, T., II, W., 2014. Calmodulin Gene Expression in Response to Mechanical Wounding and *Botrytis cinerea* Infection in Tomato Fruit. *Plants* 3, 427–441. doi:10.3390/plants3030427
- Pino, L.E., Peres, L.E.P., 2010. MANUAL DO MODELO VEGETAL MICRO-TOM CAPÍTULO 1: ESPECIFICAÇÕES DA CASA DE VEGETAÇÃO.
- Plieth, C., Vollbehr, S., 2012. Calcium promotes activity and confers heat stability on plant peroxidases. *Plant Signal. Behav.* 7, 650–660. doi:10.4161/psb.20065
- Pospíšil, P., Prasad, A., 2014. Formation of singlet oxygen and protection against its oxidative damage in Photosystem II under abiotic stress. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 30. doi:10.1104/pp.109.138859
- Ramalho, J.C., Rebelo, M.C., Santos, M.E., Antunes, M.L., Nunes, M.A., 1995. Effects of calcium deficiency on *Coffea arabica*. Nutrient changes and correlation of calcium levels with some photosynthetic parameters. *Plant Soil* 172, 87–96.
- Ribeiro, R.V., Machado, E.C., Santos, M.G., Oliveira, R.F., 2009. Seasonal and diurnal changes in photosynthetic limitation of young sweet orange trees. *Environ. Exp. Bot.* 66, 203–211. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.03.011
- Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Basalah, M.O., 2011. Interactive effect of calcium and gibberellin on nickel tolerance in relation to antioxidant systems in *Triticum aestivum* L. *Protoplasma* 248, 503–511. doi:10.1007/s00709-010-0197-6
- Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Sakran, A.M., Basalah, M.O., Ali, H.M., 2012. Effect of calcium and potassium on antioxidant system of *Vicia faba* L. under cadmium stress. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 6604–6619. doi:10.3390/ijms13066604
- Stael, S., Kmieciak, P., Willems, P., Van Der Kelen, K., Coll, N.S., Teige, M., Van Breusegem, F., 2015. Plant innate immunity – sunny side up? *Trends Plant Sci.* 20, 3–11. doi:10.1016/j.tplants.2014.10.002
- Steinhorst, L., Kudla, J., 2014. Signaling in cells and organisms — calcium holds the line. *Curr. Opin. Plant Biol.* 22, 14–21.
- Suzuki, N., Mittler, R., 2012. Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 2269–2276. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.538
- Takahashi, F., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., 2011. Calmodulin-Dependent Activation of MAP Kinase for ROS Homeostasis in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 41, 649–660. doi:10.1016/j.molcel.2011.02.029

- Tang, R.J., Luan, S., 2017. Regulation of calcium and magnesium homeostasis in plants: from transporters to signaling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 39, 97–105. doi:10.1016/j.pbi.2017.06.009
- Taylor, P., Street, M., Wt, L., Signaling, P., Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., Panda, S.K., 2014. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal. Behav.* 8, 37–41. doi:10.4161/psb.23681
- Teisseire, H., Guy, V., 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Sci.* 153, 65–72.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B., 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* doi:10.1046/j.1365-313X.1997.11061187.x
- Tonetto de Freitas, S., McElrone, A.J., Shackel, K.A., Mitcham, E.J., 2014. Calcium partitioning and allocation and blossom-end rot development in tomato plants in response to whole-plant and fruit-specific abscisic acid treatments. *J. Exp. Bot.* 65, 235–247. doi:10.1093/jxb/ert364
- Virdi, A.S., Singh, S., Singh, P., 2015. Abiotic stress responses in plants: roles of calmodulin-regulated proteins. *Front. Plant Sci.* 6, 809. doi:10.3389/fpls.2015.00809
- Xu, L., Yu, J., Han, L., Huang, B., 2013. Photosynthetic enzyme activities and gene expression associated with drought tolerance and post-drought recovery in Kentucky bluegrass. *Environ. Exp. Bot.* 89. doi:10.1016/j.envexpbot.2012.12.001
- Yang, S.-L., Lan, S.-S., Deng, F.-F., Gong, M., 2016. Effects of Calcium and Calmodulin Antagonists on Chilling Stress-Induced Proline Accumulation in *Jatropha curcas* L. *J. Plant Growth Regul.* 35, 815–826. doi:10.1007/s00344-016-9584-3
- Yang, S., Wang, F., Guo, F., Meng, J.J., Li, X.G., Wan, S.B., 2014. Calcium contributes to photoprotection and repair of photosystem II in peanut leaves during heat and high irradiance. *J. Integr. Plant Biol.* 57, 486–495. doi:10.1111/jipb.12249
- Yang, T., Poovaiah, B.W., 2002. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 4097–102. doi:10.1073/pnas.052564899
- Zelicourt, A., Colcombet, J., Hirt, H., 2016. The Role of MAPK Modules and ABA during Abiotic Stress Signaling. *Trends Plant Sci.* 21, 677–685. doi:10.1016/J.TPLANTS.2016.04.004
- Zhang, S., Li, Q., Ma, K., Chen, L., 2001. Temperature-Dependent Gas Exchange and

Stomatal/Non-Stomatal Limitation to CO₂ Assimilation of *Quercus Liaotungensis* under Midday High Irradiance. *Photosynth. Res.* 39, 383–388.

Zhou, J., Xia, X.-J., Zhou, Y.-H., Shi, K., Chen, Z., Yu, J.-Q., 2014. RBOH1-dependent H₂O₂ production and subsequent activation of MPK1/2 play an important role in acclimation-induced cross-tolerance in tomato. *J. Exp. Bot.* 65, 595–607. doi:10.1093/jxb/ert404

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.

Anexo

26/01/2019 Gmail - Successfully received: submission Calcium and gene expression in photosynthetic signaling and acclimatization after mech...



Felipe Giroto Campos <felipegttbio@gmail.com>

Successfully received: submission Calcium and gene expression in photosynthetic signaling and acclimatization after mechanical damage for Environmental and Experimental Botany

1 mensagem

Environmental and Experimental Botany <EvisSupport@elsevier.com>

26 de janeiro de 2019 22:43

Responder a: EEB@elsevier.com

Para: felipegttbio@gmail.com

This message was sent automatically.

Ref: EEB_2019_121

Title: Calcium and gene expression in photosynthetic signaling and acclimatization after mechanical damage

Journal: Environmental and Experimental Botany

Dear Ms. Campos,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Environmental and Experimental Botany. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=EEB and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Environmental and Experimental Botany

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

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.1365-3113X.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.