

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

MAGDA DOS SANTOS ROSSI

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DO MARACUJAZEIRO (*Passiflora edulis* SIMS)
AO ALAGAMENTO**

VITÓRIA-ES

2011

MAGDA DOS SANTOS ROSSI

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DO MARACUJAZEIRO (*Passiflora edulis* SIMS)
AO ALAGAMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal, Área de Concentração: Fisiologia Vegetal.
Orientador: Prof^a Diolina Moura Silva
Co-orientador: Prof. Antelmo Ralph Falqueto

VITÓRIA – ES

2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

R833r Rossi, Magda dos Santos, 1983-
Respostas fisiológicas do maracujazeiro (*Passiflora edulis*
SIMS) ao alagamento / Magda dos Santos Rossi. – 2011.
47 f. : il.

Orientadora: Diolina Moura Silva.
Co-Orientador: Antelmo Ralph Falqueto.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.

1. Maracujá. 2. Frutas - Cultivo. 3. Fluorescência. 4.
Clorofila. I. Silva, Diolina Moura. II. Falqueto, Antelmo Ralph. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

MAGDA DOS SANTOS ROSSI

“RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DO MARACUJAZEIRO (*Passiflora edulis* SIMS) AO ALAGAMENTO”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 21 de Fevereiro de 2011.

COMISSÃO EXAMINADORA



Profª Drª Diolina Moura Silva

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal-UFES

Orientadora



Profº Drº Antelmo Ralph Falqueto

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - UFES


Co-orientador



Profª Drª Adelaide de Fatima Santana da Costa

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - UFES

Examinador Externo



Profº Drº Marcos Antonio Bacarin

Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Examinador Externo

*Dedico este trabalho aos meus pais Liana e
Aguinaldo, meus irmãos e ao meu namorado.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, paciência e sabedoria para a realização desse trabalho;

Aos meus pais e irmãos pela ajuda, apoio e compreensão durante todos esses anos dedicados aos estudos;

Ao meu namorado Lucas, pelo carinho, amor, dedicação e por me ajudar diversas vezes com meus experimentos;

À minha Orientadora Prof^a. Diolina Moura Silva, pela oportunidade de ter sido sua aluna, pelos ensinamentos e orientação;

Ao Prof. Antelmo Ralph Falqueto, pela co-orientação muito valiosa;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal e funcionários da Botânica pela colaboração nesta jornada de estudos;

À Professora Maria Do Carmo Pimentel Batitucci pela boa vontade em ajudar os alunos do PPGBV e pela disponibilização de seu laboratório para a realização de minhas análises;

Ao Professor Fábio Murilo DaMata e aos seus alunos pela ajuda na realização de algumas análises;

À Professora Renata Venturim Fontes pela disposição em ajudar e pela receptividade em sua sala;

Ao Professor Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol pela utilização de equipamentos de seu laboratório;

Aos membros da banca examinadora, Prof. Marcos Antonio Bacarin e Dr^a. Adelaide de Fátima Santana Costa;

Ao CNPq pela bolsa de estudo fornecida para a realização deste trabalho;

Aos meus amigos e companheiros de mestrado da turma 2009 por tornar esses dois anos mais alegres, Larissa Bassani de Oliveira, Natália Nati, Diego Guimarães Pinto, Raiany Gusso Machado, Priscilla Nobres dos Santos, Marcos Thiago Gomes, Anny Carolyne da Luz, Stéfano Zorzal, Jéssica de Almeida Roger, Inayá Castiglioni, Adriano Goldner, Levi Pompermayer;

Aos amigos do Núcleo de Estudos da Fotossíntese, em especial aqueles que me ajudaram na realização deste trabalho: Priscilla, Maísa, Vinícius, Leonardo e Joilton;

Aos amigos Anny Carlyne, Marcos Thiago, e Irany pela constante ajuda nos meus experimentos;

As minhas amigas pelas palavras de amizade, pela alegria e pela torcida. Em especial: Luana, Rogéria, Cristina, Monique, Bruna, Vanessa, Carni e Taiane;

À Universidade Federal do Espírito Santo, pelo conhecimento adquirido nessa instituição;

Aos meus colegas de trabalhos da Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Marechal Floriano.

RESUMO

O Estado do Espírito Santo possui condições edafoclimáticas propícias para a cultura do maracujazeiro, porém, as médias pluviométricas não se apresentam constantes, ocasionando grandes períodos de estiagem e períodos de chuvas torrenciais. Portanto, avaliar as respostas fisiológicas de plantas do maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims), cultivares FB 200 e FB 300 submetidas ao estresse hídrico por alagamento do solo é o principal caminho a ser seguido para identificar e caracterizar os efeitos da duração do estresse e selecionar materiais genéticos com alto grau de tolerância. Plantas do maracujazeiro foram cultivadas em casa de vegetação e mantidas em solo bem drenado até o início dos tratamentos. Foram empregados três tratamentos experimentais: 1. Plantas não alagadas; 2. Plantas alagadas por três dias e 3. Plantas alagadas por sete dias. Em todos os tratamentos as plantas tiveram um período de recuperação (com drenagem no solo) de sete dias. O alagamento ocasionou decréscimo do potencial hídrico, da condutância estomática e da taxa de assimilação líquida de CO₂ nas duas cultivares, no decorrer do alagamento. Já a razão entre a concentração interna e ambiente de CO₂ aumentou a partir do quinto dia de alagamento nas duas cultivares devido ao aumento do carbono interno. As fases O-J, e J-I da curva OJIP, apresentaram maiores alterações no decorrer do alagamento indicando a redução do lado acceptor do FSII (Q_A e Q_B) e a progressiva redução do *pool* de plastoquinona, respectivamente. O estresse por alagamento resultou também em uma diminuição da conectividade das unidades do FSII (com bandas L positivas) e inativação do complexo de evolução do oxigênio (Banda K). A atividade da catalase e da peroxidase aumentaram significativamente na cultivar FB200 no decorrer do estresse. Após sete dias de recuperação as cultivares recuperam a atividade fotossintética quando submetidas a curtos períodos de alagamento (três dias). Entretanto, quando o período de alagamento foi prolongado (sete dias) o estresse torna-se mais severo a ponto de não ocorrer recuperação da atividade fotossintética.

ABSTRACT

Physiological responses of passion fruit tree (*Passiflora edulis* SIMS) to flooding

Espírito Santo state has edaphoclimatic conditions propitious to the cultivation of passion fruit tree, however, the average rainfall does not pose constant, resulting in extended periods of drought and periods of torrential rain. Therefore, assessing the physiological responses of plants of passion fruit tree (*Passiflora edulis* Sims) FB 200 and FB 300 cultivars submitted to water stress by flooding is the main way to identify and characterize the effects of duration of stress and select genetic material with a high degree of tolerance. Passion fruit tree plants were grown in a greenhouse and kept in well-drained soil until the start of treatment. Ultimately we used FB 200 and FB 300 cultivars employing three experimental treatments: 1. Unflooded plants, 2. Plants flooded for 3 days, 3. Plants flooded for seven days. In all treatments the plants had a recovery period (with soil drainage) of seven days. The flooding caused a decrease in water potential, stomatal conductance, and CO₂ liquid assimilation rate on both cultivars during the flooding. Yet the reason between the internal and environmental concentration of CO₂ (C_i/C_a) increased from the fifth day of flooding in both cultivars due to increased internal carbon. The phases O-J and J-I of the OJIP curve, presented greater changes during the flooding indicating the reduction of the PSII acceptor side (Q_A and Q_B) and the progressive reduction of the plastoquinone pool, respectively. The stress by flooding also resulted in the decrease of connectivity of units of PSII (with L-band positive) and inactivation of oxygen evolution complex (K-Band). The catalase and peroxidase activity increased significantly in cultivar FB 200 during the stress. After seven days of recovery the cultivars recovered the photosynthetic activity when submitted to short periods of flooding (three days). However, when the period of flooding was prolonged (seven days) the stress became more severe to a point of not having recovery of the photosynthetic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Vista geral das duas cultivares de maracujazeiro utilizadas no experimento.....	20
Figura 2 -	Taxa de assimilação de CO ₂ , condutância estomática e razão entre a concentração interna e ambiente de CO ₂ de folhas de maracujazeiro, <i>Passiflora edulis</i> SIMS cvs. FB200 e FB300 não alagadas e alagadas por um período de 3 dias.....	26
Figura 3 -	Taxa de assimilação de CO ₂ , condutância estomática e razão entre a concentração interna e ambiente de CO ₂ de plantas de maracujazeiro, <i>Passiflora edulis</i> SIMS cvs. FB200 e FB300 não alagadas e alagadas por um período de 7 dias.....	27
Figura 4 -	Cinética da fluorescência da clorofila <i>a</i> plotadas em escala logarítmica de tempo, obtida em folhas de plantas de maracujazeiro <i>Passiflora edulis</i> SIMS, cvs. FB 200 e FB 300, submetidas a zero dia, 1 dia, 3 dias, 5 dias, 7 dias de alagamento.....	29
Figura 5 -	Cinética OJIP da fluorescência da clorofila <i>a</i> de folhas adaptadas ao escuro de plantas de <i>Passiflora edulis</i> SIMS, cvs FB 200 e FB 300; A e B: ΔV_{OK} revelando a banda L; C e D: ΔV_{OJ} revelando a banda K.....	30
Figura 6–	Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> , deduzidos pelo teste JIP, em plantas de maracujazeiro, <i>Passiflora edulis</i> SIMS, cv. FB 200. Comportamento das plantas submetidas a 1 dia, 3 dias, 5 dias, 7 dias de alagamento e recuperação por 7 dias.....	32
Figura 7 -	Parâmetros da fluorescência OJIP deduzidos pelo teste JIP em maracujazeiros <i>Passiflora edulis</i> SIMS cv. FB 300. Comportamento das plantas submetidas de 1 dia, 3 dias, 5 dias, 7 dias de alagamento e 7 dias.....	33
Figura 8 -	Índice de desempenho total ($PI_{ABS,total}$) obtido em folhas de maracujazeiro, <i>Passiflora edulis</i> SIMS, cvs. FB 200 e FB 300 não alagadas e alagadas por um período de 3 dias.....	34
Figura 9 -	Índice de desempenho total ($PI_{ABS,total}$) obtido em folhas de maracujazeiro, <i>Passiflora edulis</i> SIMS, cvs. FB 200 e FB 300 não alagadas e alagadas por um período de 7 dias.....	34

Figura 10 - Atividade específica das enzimas Catalase (CAT) e Peroxidase do Ascorbato (APX) de folhas de maracujazeiro <i>Passiflora edulis</i> SIMS cvs. FB 200 e FB 300 não alagadas e alagadas por um período de 3 dias e recuperação.....	36
Figura 11 - Atividade específica das enzimas Catalase (CAT) e Peroxidase do Ascorbato (APX) de folhas de maracujazeiro <i>Passiflora edulis</i> SIMS, cvs. FB 200 e FB 300 não alagadas e alagadas por um período de 7 dias e recuperação.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Taxa de assimilação líquida de carbono
ABS/RC	Fluxo de energia radiante absorvidos por centro de reação
APX	Peroxidase do ascorbato
ASA	Ácido ascórbico
CAT	Catalase
CEO	Complexo de evolução do oxigênio
C_i/C_a	Razão entre a concentração interna e externa de carbono
DI_0/RC	Fluxo específico de energia dissipada
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET_0/RC	Fluxo de energia para o transporte de elétron para além de Q_A^- por centro de reação.
Fe	Ferro
$F_I = F_{30ms}$	Intensidade da fluorescência no ponto I (30ms) da curva OJIP
$F_J = F_{2ms}$	Intensidade da fluorescência no ponto J (2ms) da curva OJIP
$F_K = F_{300\mu s}$	Intensidade da fluorescência no ponto K (300 μ s) da curva OJIP
F_M	Fluorescência máxima quando todos centro de reação do FSII estão fechados
$F_P \cong F_{300ms}$	Intensidade da fluorescência no ponto P (\cong 300ms) da curva OJIP
FSI	Fotossistema I
FSII	Fotossistema II
F_t	Fluorescência no tempo t após o início da iluminação actínica
$F_V = F_M - F_0$	Fluorescência variável máxima
$F_0 = F_O \cong F_{50\mu s}$	Fluorescência mínima, registrada em 50 μ s (assume-se que todos os centros de reação do FSII estão abertos)

g_s	Condutância estomática
IRGA	Analisador de gás infravermelho portátil
MPa	Megapascal
1O_2	Oxigênio singleto
$O_2^{\bullet-}$	Radical superóxido
OH^{\bullet}	Radical hidroxil
$PI_{ABS,total}$	Índice de desempenho para a conservação de energia, desde a absorção de fótons pela antena do FSII até a redução dos aceptores do FSI
Q_A	Quinona <i>A</i>
Q_B	Quinona <i>B</i>
RC	Centro de reação
RC/ABS	Densidade de centros de reação ativos
SOD	Superóxido dismutase
TR_0/RC	Fluxo de energia capturada (conduzida a Q_A) por centro de reação
V_{OJ}	Fluorescência variável relativa entre os pontos O (50 μ s) e J(2ms)
V_{OK}	Fluorescência variável relativa entre os pontos O (50 μ s) e K(300 μ s)
V_t	Fluorescência variável relativa ao tempo <i>t</i>
$\Phi_{P0}/(1-\Phi_{P0})$	Fluxo máximo de energia que chega aos centros de reação do Fotossistema (FSII)
$\delta_{R0}/(1-\delta_{R0})$	Reações de oxi-redução no lado acceptor do Fotossistema I (FSI)
$\Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$	Eficiência de transporte de elétrons no início da iluminação.
Ψ_w	Potencial hídrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	METODOLOGIA	19
2.1	MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO	19
2.2	ANÁLISES FOTOSSINTÉTICAS	20
2.2.1	Cinética de emissão da fluorescência transiente (OJIP).....	20
2.2.2	Trocas gasosas.....	21
2.3	POTENCIAL HÍDRICO DOS TECIDOS FOLIARES	21
2.4	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	21
2.4.1	Obtenção do extrato enzimático bruto.....	22
2.4.2	Determinação de proteínas totais.....	22
2.4.3	Dosagem da atividade da Peroxidase do Ascorbato (APX, E.C. 1.11.1.11).....	22
2.4.4	Dosagem da atividade da Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6).....	22
2.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS ...	23
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
5	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* reúne cerca de 400 espécies de maracujá, na sua maioria originária da região Neotropical (América), sendo, aproximadamente, 120 espécies nativas do Brasil (BERNACCI et al., 2003). Embora exista uma grande variabilidade genética, representando a biodiversidade nativa nos pomares comerciais do Brasil, uma única espécie, *Passiflora edulis* SIMS (maracujá azedo), predomina como preferência dos consumidores (BERNACCI et al., 2008). Essa espécie representa 95% dos pomares, em função da qualidade dos seus frutos, vigor, produtividade e rendimento em suco (MELETTI; BRÜCKNER, 2001). A preferência da fruta amarelada é evidenciada pelo número de estados brasileiros onde ela é cultivada, fazendo do Brasil o maior produtor de maracujá do mundo.

No Estado do Espírito Santo estão estabelecidos dois Pólos Potenciais de Produção de Maracujazeiro: um no Norte e o outro no Sul do Estado. Esses pólos visam maior eficiência da comercialização concentrando a produção em regiões próximas as agroindústrias no norte e no sul do estado (COSTA et al., 2008).

As médias pluviométricas do Estado durante o período seco (maio a setembro) e chuvoso (outubro a abril), não se apresentam constantes, ocasionando grandes períodos de estiagem em algumas ocasiões, enquanto em outras, chuvas torrenciais. O excesso de chuva é bastante prejudicial ao desenvolvimento da cultura do maracujazeiro. Segundo Costa et al. (2008), a ocorrência de chuvas acima dos níveis adequados no período de floração pode provocar rompimento dos grãos de pólen, reduzindo a formação de frutos e, portanto, prejudicando a produtividade da cultura.

Na região norte do Estado do Espírito Santo, a cultura é desenvolvida em solos dos Tabuleiros Costeiros. Estes solos apresentam características muito particulares, dentre elas, a presença de horizonte subsuperficial coeso. Estudos da utilização agrícola em solos coesos evidenciam suas limitações, resultando em baixas produções e alta relação custo/benefício, pois as culturas apresentam redução no crescimento e na produção devido, principalmente, a redução do volume do sistema radicular em função da reduzida capacidade de armazenamento de água desses solos nos períodos de estiagem. No período chuvoso o solo denso, retém o

fluxo de água permanecendo encharcado por muito tempo (DUARTE et al., 2000; PORTELA et al., 2001; CINTRA et al., 2004; MARTINS et al., 2010).

Em solos bem drenados, a concentração de oxigênio existente nos poros é geralmente semelhante à do ar úmido, sendo suficientes para a respiração das raízes e dos microrganismos (TAIZ, 2008). No entanto, solos com altos níveis de compactação, drenagem deficiente e sujeitos a alto regime pluvial ou a sistemas de irrigação inadequados apresentam problemas de aeração, que resultam em condições de hipoxia (baixa pressão de oxigênio) ou anoxia (ausência de oxigênio) no ambiente radicular (ALVES et al., 2002). O estresse por hipoxia é considerado um dos fatores ambientais limitantes do crescimento de plantas e da produtividade em todo o mundo, especialmente em regiões de alta precipitação (LI et al., 2010). Além das limitações à difusão dos gases e redução dos nutrientes no solo, o encharcamento conduz a um aumento na suscetibilidade das plantas a diversas doenças (SINGH et al. 2001). Estudos sobre as respostas fisiológicas e bioquímicas do maracujazeiro ao excesso de chuvas e alagamento do solo são ainda escassos.

A susceptibilidade das plantas ao encharcamento pode ser refletida em mudanças nos processos fisiológicos das plantas. Geralmente, reduções na condutância radicular (resultando em murchamento da planta), no fechamento estomático, da absorção de água e da taxa de fotossíntese estão entre as primeiras respostas fisiológicas ao encharcamento (BARUCH, 1994). Rehem et al. (2009) ao trabalhar com genótipos clonais de cacauzeiro submetidos ao alagamento do substrato, observaram sintomas de estresse por hipoxia, como clorose de folhas maduras, decréscimo na formação de folhas e senescência foliar. Já Carvalho e Ishida (2002) notaram redução na condutância estomática em plantas jovens de pupunheiras (*Bactris gasipaes* Kunth) submetidas ao alagamento.

A atividade dos fotossistemas também pode ser afetada pelo alagamento. Oliveira (2007) observou redução do rendimento quântico efetivo do Fotossistema II (FSII) e do transporte de elétrons em plantas de *Calophyllum brasiliense* Camb. alagadas por 15 (quinze) dias, sugerindo um possível dano ao aparato fotossintético ocasionado pelo estresse hídrico.

A eficiência fotossintética de uma planta pode ser medida por vários métodos. A fluorescência da clorofila *a* é um desses métodos, não invasivo, rápido e confiável,

pois fornece informações sobre a relação entre estrutura e função do FSII. Durante o primeiro segundo de iluminação após adaptação ao escuro as folhas apresentam um aumento polifásico da fluorescência da clorofila. As diferentes fases são rotuladas em ordem alfabética e ordenadas da parte mais lenta à mais rápida como O, J, I e P. O é o nível de fluorescência inicial (F_0), J (2 ms) e I (30 ms) são os níveis intermediários, e P (~300 ms) é o nível do pico máximo alcançado (OUKARROUM et al., 2007). Diversos parâmetros podem ser extraídos do aumento da fluorescência da clorofila polifásica OJIP. Um modelo, o teste JIP, foi proposto para a análise da origem polifásica OJIP e seu uso tem mostrado ser esta uma ferramenta valiosa no acompanhamento da “vitalidade” das plantas (OUKARROUM, 2009). A expressão “vitalidade” sugerida em 1988 por Strasser e colaboradores, não está rigorosamente definida. Para plantas, ela combina as noções de atividade, estabilidade, sensibilidade e tolerância aos estresses (STRASSER et al., 2010).

Em condições de hipoxia, sinais que influenciam a expressão gênica nuclear são produzidos e provocam alterações no estado redox do cloroplasto, além de acúmulo de tetrapirróis e de espécies reativas de oxigênio (EROs) (FERNÁNDEZ; STRAND, 2008). Mitocôndrias, cloroplastos ou peroxissomos com alta atividade oxidativa ou intensa taxa de fluxo de elétrons são as principais fontes de EROs (GILL; TUTEJA, 2010). Dentre tais EROs destacam-se o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (OH^{\bullet}) e oxigênio singleto (1O_2) (YU; RANGEL, 1999).

O oxigênio singleto é o primeiro estado excitado do O_2 , sendo formado quando a dissipação de energia durante a fotossíntese é insuficiente (GILL; TUTEJA, 2010). Durante a fase fotoquímica o oxigênio pode aceitar elétrons que passam pelos fotossistemas o que resulta na formação dos $O_2^{\bullet-}$ (radical superóxido) (GILL; TUTEJA, 2010). Em condições de sobrecarga, uma parte do fluxo de elétrons é desviada para a ferredoxina reduzindo o O_2 a $O_2^{\bullet-}$ via reação de Mehler (WISE; NAYLOR, 1987; ELSTNER, 1991). O excesso de H_2O_2 , produzido pela redução do $O_2^{\bullet-}$ nas células de plantas gera o estresse oxidativo (GILL; TUTEJA, 2010). O radical hidroxil (OH^{\bullet}) é considerado um EROs altamente reativa, na presença de metais de transição, especialmente o Fe, o OH^{\bullet} pode ser produzido a partir do $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (GILL; TUTEJA, 2010).

Acúmulos de EROs em respostas a estresses ambientais é uma das principais causas de perdas de safras e da produtividade em todo o mundo (MITTLER, 2002; GILL; TUTEJA, 2010). É importante ressaltar que a atuação das espécies reativas de oxigênio (EROs) como fatores prejudiciais, proteção ou sinalização depende do equilíbrio entre a produção de EROs e sua eliminação em local e tempo apropriado (GRATAO et al., 2005). Nos estresses por hipoxia ou anoxia as EROs podem atuar como sinalizadores celulares, causar prejuízos ao metabolismo celular pela oxidação de proteínas e lipídeos, ou, ainda gerar mutações e problemas reprodutivos pela oxidação do DNA (MOLLER et al., 2007; VALKO, 2006; MITTLER, 2002).

Para a proteção das membranas celulares e organelas dos efeitos danosos das EROs, as células possuem um sistema de defesa antioxidante, formado por componentes enzimáticos e não enzimáticos que, normalmente, mantêm um balanço de EROs dentro das células (FOYER et al., 1994; ASADA, 1999). O mecanismo de defesa do sistema antioxidante inclui enzimas tais como, a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), a peroxidase do ascorbato (APX, E.C. 1.11.1.11) e a catalase (CAT, EC 1.11.1.6), bem como agentes antioxidantes de baixo peso molecular, como o ácido ascórbico (ASA) e a glutatona (NOCTOR; FOYER, 1998; FELIPE et al.; 2009).

As enzimas das classes das peroxidases, do ciclo do ascorbato e a catalase são importantes na preservação das propriedades fisiológicas das plantas sobre estresse por alagamento (MOLLER et al., 2007). A catalase tem o potencial de transformar o H_2O_2 em H_2O e O_2 , indispensável à eliminação de EROs em condições de estresse por alagamento (GARG; MANCHANDA, 2009) enquanto que a peroxidase do ascorbato está envolvida na eliminação de H_2O_2 nos ciclos Água-Água e Ácido ascórbico – Glutaciona e utiliza o Ácido ascórbico como doador de elétrons ($H_2O_2 + \text{ácido ascórbico} \rightarrow 2H_2O + \text{dehidroascorbato}$). (MITTLER, 2002; GILL; TUTEJA, 2010).

Assim, estudos que abordem diferentes tipos de estresses que o maracujazeiro pode ser submetido, assumem especial importância na fruticultura do Estado do Espírito Santo. As chances de sucesso no cultivo de variedades com grau de tolerância pré-estabelecida dependem da ampliação do conhecimento. Dessa

forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar as respostas fisiológicas de duas cultivares do maracujazeiro submetidas ao alagamento do substrato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Sementes de maracujazeiro (*Passiflora edulis* SIMS), cultivares FB 200 (Yellow Master) e FB 300 (Araguari) oriundas do Viveiro Flora Brasil, Araguari, Minas Gerais, foram postas para germinar em bandejas plásticas contendo areia lavada e terra vegetal na proporção 2:1.

As variedades de maracujazeiro utilizadas neste trabalho são amplamente cultivadas no Estado do Espírito Santo. A cultivar FB 200 é destinada ao mercado de frutas frescas por possui frutos com maior uniformidade de tamanho, formato e cor. Já a cultivar FB 300 é destinada, principalmente a indústria, sendo mais rústica, de boa estabilidade produtiva, frutos desuniformes em tamanho, formato e cor. De acordo com Silva (2011) a cultivar FB 200 foi produzida a partir do cruzamento de duas variedades de maracujá amarelo com características diferentes de formato e tolerância, depois retrocruzado com o parental ovalado. Ainda de acordo com o mesmo autor a cultivar FB 300 foi produzido a partir do cruzamento de uma variedade amarelo com uma população roxa, seguido de dois retrocruzamentos para o amarelo.

Após a germinação, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 8 litros, contendo terra, areia e terra vegetal na proporção 3:2:1. No momento do transplântio as plantas receberam aproximadamente 4 g de adubo de liberação lenta (Osmocote[®]) com proporção de NPK de 19:6:10, produto recomendado pelos produtores de maracujá do Estado do Espírito Santo.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação no Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Município de Vitória, ES (latitude 40°18'20.76" e longitude 20°16'29.08").

Todas as fases do experimento foram desenvolvidas sob temperatura média anual de 27±2°C e fotoperíodo natural de 11:00±1:00 horas.

Quando as plantas atingiram oitenta dias ocorreu o início dos tratamentos. Foram empregados três tratamentos experimentais: (1) *Plantas não alagadas*

(Controle) regadas diariamente e mantidas próximo a capacidade de campo, (2) *Plantas alagadas por três dias* e (3) *Plantas alagadas por sete dias*.

Para a imposição do alagamento os vasos foram colocados dentro de baldes plásticos de 12 litros, enchidos com água até manter-se uma lâmina de água de 2-4 cm acima do nível do solo (Figura 01).



Figura 01 – Vista geral das duas cultivares de maracujazeiro utilizadas no experimento. A figura a esquerda mostra o crescimento das mudas e figura a direita mostra as plantas submetidas aos tratamentos.

Quando necessário, os níveis de água foram devidamente repostos. Nos dois últimos tratamentos as plantas tiveram um período de recuperação de sete dias. A recuperação consistiu na retirada dos vasos de dentro dos baldes para a drenagem do solo. Neste período as plantas em recuperação não foram regadas.

2.2 ANÁLISES FOTOSSINTÉTICAS

2.2.1 Cinética de emissão da fluorescência transiente (OJIP)

As medidas da cinética da emissão da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas sempre uma hora após o nascer do sol (6:30 - 7:30 h) na 4ª folha jovem totalmente expandida (contando do ápice para a base da planta) utilizando-se um fluorômetro portátil (HandyPEA, Hanstech, King's Lynn, Norfolk, UK). As folhas foram previamente adaptadas ao escuro por um período de 30 minutos e submetidas a um flash de luz saturante de $3000 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As medidas tiveram uma duração de 1 segundo. A cinética de fluorescência transiente (da fluorescência Inicial, F_0 , até a fluorescência máxima, F_M) foi registrada de $10 \mu\text{s}$ até 1 s. A intensidade de fluorescência aos $50 \mu\text{s}$ foi considerada como F_0 (STRASSER;

STRASSER, 1995). As intensidades de fluorescência foram utilizadas para calcular os parâmetros estabelecidos pelo teste JIP (STRASSER et al., 2004) usando o software Biolyzer, versão 3.06 HP, 2002 (Laboratório de Bioenergética, Universidade de Genebra, Suíça). As curvas da fluorescência OJIP foram normalizadas como: a) fluorescência variável relativa entre os pontos O e P [$V_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$]; b) fluorescência variável relativa entre os pontos O (50 μ s) e K (\pm 300 μ s) [$V_{OK} = (F_t - F_0) / (F_K - F_0)$]; c) fluorescência variável relativa entre os pontos O (50 μ s) e J (2 ms) [$V_{OJ} = (F_t - F_0) / (F_J - F_0)$]. Obtida a fluorescência variável (V_t , V_{OK} e V_{OJ}) calculou-se as diferenças cinéticas entre as plantas submetidas aos estresses e as plantas controle ($\Delta V = V_{\text{tratamento}} - V_{\text{controle}}$), sendo possível identificar nestas curvas as bandas L (aproximadamente em 150 μ s) e K (aproximadamente em 300 μ s).

2.2.2 Trocas Gasosas

Os parâmetros da fotossíntese foram determinados nas mesmas folhas utilizadas para a análise da fluorescência da clorofila *a*, utilizando-se um analisador de gás infravermelho portátil - IRGA (LCIpro+, ADC BioScientific Ltd.).

Foram avaliadas as seguintes variáveis: Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a razão entre a concentração interna e ambiente de CO₂ (C_i/C_a) sob luz saturante de 1400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentrações de CO₂ ambiente.

2.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HÍDRICO DOS TECIDOS FOLIARES

O potencial hídrico das folhas (ψ_w) foi aferido imediatamente após as medidas de fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas, utilizando-se uma câmara de pressão tipo Scholander (SCHOLANDER et al., 1965), modelo 3000 (Soil Moisture Equipment Corp, Santa Bárbara, Califórnia-USA).

2.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A coleta das folhas de *Passiflora edulis* SIMS, cultivares FB 200 e FB 300, para as análises bioquímicas foi realizada pela manhã, após a aferição do potencial hídrico. As folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C para análises posteriores.

2.4.1 Obtenção do extrato enzimático bruto

Para obtenção do extrato enzimático, duzentos miligramas de tecido foliar foram macerados em N₂ líquido com polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) e homogeneizado em 4 mL de solução de extração contendo tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 6,8), EDTA 10 mM e ácido ascórbico 100 mM. O homogeneizado foi centrifugação a 13.000 g por 12 minutos, a 4°C (PEIXOTO et al., 1999). O sobrenadante foi utilizado para a atividade das enzimas antioxidantes e quantificação das proteínas.

2.4.2 Determinação de Proteínas Totais

O conteúdo protéico do extrato bruto foi determinado pelo método fotocolorimétrico de acordo com Bradford (1976), utilizando como padrão soro albumina bovina (1 mg mL⁻¹).

2.4.3 Dosagem da atividade da Peroxidase do Ascorbato (APX, E.C. 1.11.1.11)

A atividade da enzima peroxidase do ascorbato (E.C. 1.11.1.11) foi determinada pela adição de 0,05 mL de extrato enzimático bruto a 3,95 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 200 mM, pH 7,0, ácido ascórbico 10 mM e H₂O₂ 0,1 mM (NAKANO; ASADA,1981, modificado por KOSHIBA, 1993). O decréscimo na absorvância em 290 nm foi monitorado no primeiro minuto, em meio de reação incubado a 28 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mmol⁻¹ L cm⁻¹ (NAKANO; ASADA,1981) e expressa em μmol de ácido ascórbico min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.4.4 Dosagem da atividade da Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6)

A atividade da enzima catalase (E.C. 1.11.1.6) foi determinada pela adição de 0,025 mL de extrato enzimático bruto a 3,975 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 200 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 250 mM (HAVIR; MCHALE, 1989). A atividade foi monitorada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm durante o primeiro minuto, em meio de reação incubado a 28°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 mmol⁻¹ L cm⁻¹ (ANDERSON et al., 1995) e expressa em μmol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Cada unidade experimental foi composta por uma planta. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial hídrico foliar (ψ_w) médio das plantas de maracujazeiro no início do experimento foi de $-0,31$ MPa para a cultivar FB 200 e $-0,38$ MPa para a cultivar FB 300 (Tabela 1). Após 3 dias de alagamento os valores de potencial hídrico decresceram, no entanto, não houve diferença estatística entre as plantas alagadas e não alagadas neste período.

Tabela 1 - Potencial hídrico (ψ_w) de folhas de maracujazeiro, *Passiflora edulis* SIMS cvs. FB200 e FB300, não alagadas e alagadas por um período de 3 dias, seguidas por 7 dias de recuperação. Médias seguidas de letras minúsculas na coluna não diferem entre si dentro de cada cultivar (Tukey, $P \leq 0,05$) (n=5).

Potencial Hídrico ψ_w (MPa)				
Cultivares		0 dias	3 dias	Recuperação de 7 dias
FB 200	Não alagadas	-0,31a	-0,30a	-0,43a
	Alagadas	-0,31a	-0,43a	-0,44a
FB 300	Não alagadas	-0,38a	-0,28a	-0,35a
	Alagadas	-0,38a	-0,46a	-0,50a

No sétimo dia de alagamento, o ψ_w decresceu significativamente para $-1,01$ e $-1,04$ MPa em FB 200 e FB 300, respectivamente (Tabela 2). Ao final do período de recuperação não foi observado aumento significativo nos valores de ψ_w para as duas cultivares.

De modo semelhante, Gonçalves et al. (2009), trabalhando com alagamento em plantas jovens de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl) observaram uma redução significativa do potencial hídrico em plantas alagadas pelo período de 21 dias. Os autores sugerem que o decréscimo na disponibilidade hídrica ocasionada pela queda no potencial de água nas folhas levou à perda de turgescência e, conseqüentemente, à redução da condutância estomática observado nas plantas jovens de andiroba.

Tabela 2 - Potencial hídrico (ψ_w) de folhas de maracujazeiro, *Passiflora edulis* SIMS cvs. FB200 e FB300, não alagadas e alagadas por um período de 7 dias. Médias seguidas de letras minúsculas na coluna não diferem entre si dentro de cada cultivar (Tukey, $P \leq 0,05$) (n=5).

Potencial Hídrico ψ_w (MPa)				
Cultivares		0 dias	7 dias	Recuperação de 7 dias
FB 200	Não alagadas	-0,31a	-0,32a	-0,38a
	Alagadas	-0,31a	-1,01b	-0,75b
FB 300	Não alagadas	-0,38a	-0,38a	-0,37a
	Alagadas	-0,38a	-1,04b	-0,61b

A taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) e a condutância estomática (g_s) reduziu significativamente em ambas as cultivares no terceiro dia de alagamento (Figura 2 A-D). A redução na taxa de assimilação CO_2 acompanhada pela diminuição de g_s pode ter sido ocasionada pelo fechamento estomático. Segundo Pezeshki (1994), a assimilação líquida de CO_2 é conhecida por ser drasticamente reduzida em plantas sensíveis à inundação corroborando com os dados observados neste experimento. Costa et al. (2008) afirmam que o maracujazeiro é uma espécie exigente quanto as condições hídricas, sendo o excesso de chuva prejudicial a cultura.

Quando submeteu-se as plantas de maracujazeiro a sete dias de alagamento notou-se que na cultivar FB 200 a A e g_s reduziram seus níveis a zero cinco e sete dias após o início do tratamento, respectivamente (Figura 3A-D), momento no qual observou-se uma redução significativa do potencial hídrico. Por outro lado, reduções em A foram observadas somente após sete dias de alagamento em FB 300 e em g_s somente no terceiro dia após o início da recuperação das plantas, muito embora tenha sido registrado uma redução significativa em ψ_w no sétimo dia de alagamento (Tabela 2). Estes resultados indicam maior susceptibilidade da cultivar FB 200 ao excesso de água no solo.

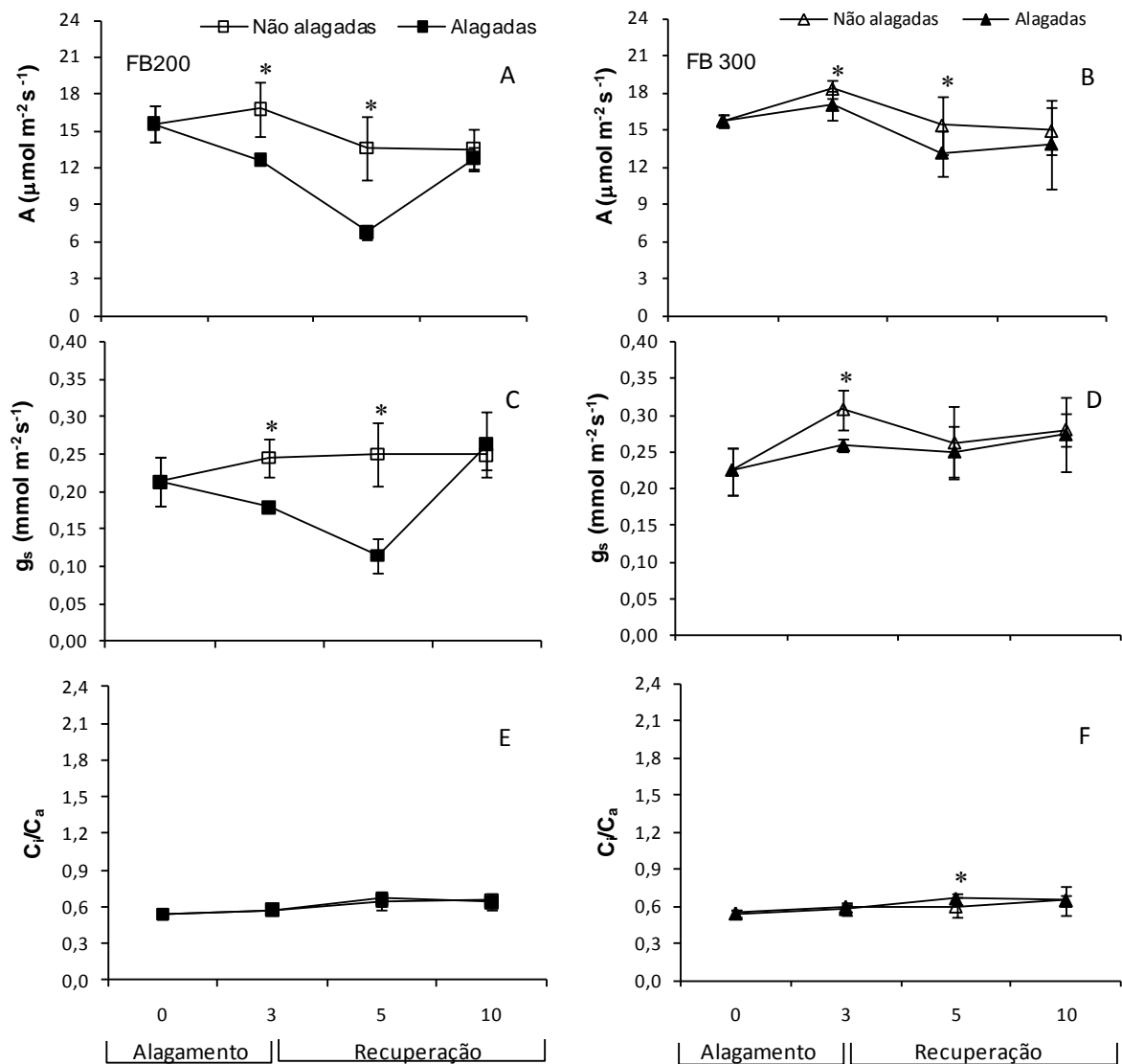


Figura 2 - Taxa de assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (g_s) e razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) de folhas de maracujazeiro, *Passiflora edulis* SIMS cvs. FB200 (A, C, E) e FB300 (B, D, F), não alagadas (\square ; Δ) e alagadas por um período de 3 dias (\blacksquare ; \blacktriangle). *indica diferença significativa entre as plantas alagadas e não alagadas no mesmo período (Tukey, $P \leq 0,05$). Barras verticais representam o desvio padrão. (n=5).

A razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) não diferiu nas plantas alagadas pelo período de três dias em ambas as cultivares (Figura 2 E-F). Entretanto, quando as plantas foram submetidas ao alagamento por sete dias, valores significativamente maiores da razão C_i/C_a foram observados em ambas as cultivares a partir do quinto dia de alagamento (Figura 3 E-F).

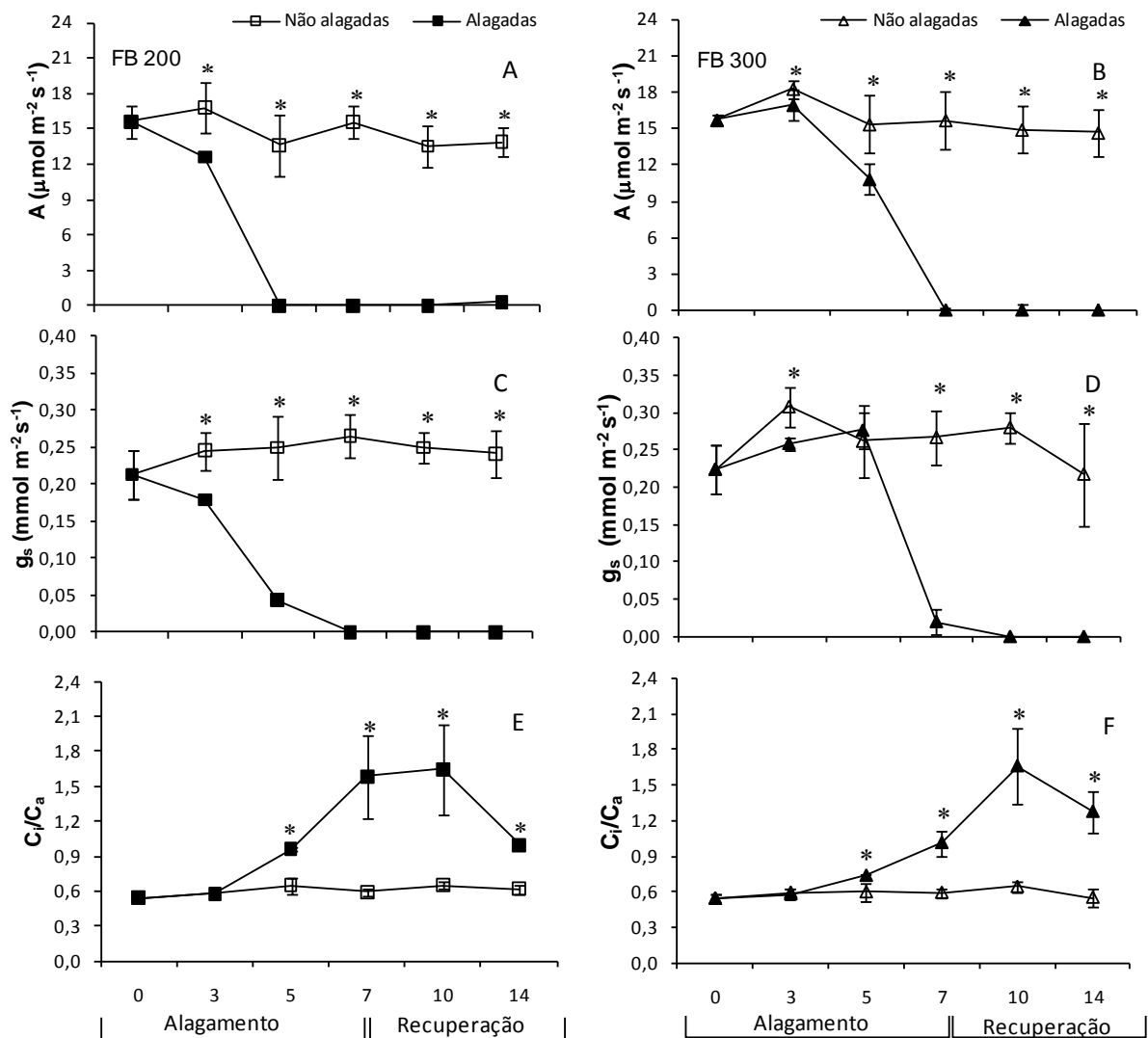


Figura 3 – Taxa de assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (g_s) e razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) de plantas de maracujazeiro, *Passiflora edulis* SIMS cvs. FB200 (A, C, E) e FB300 (B, D, F), não alagadas (□; Δ) e alagadas por um período de 7 dias (■; ▲). *indica diferença significativa entre as plantas alagadas e não alagadas no mesmo período (Tukey, $P \leq 0,05$). Barras verticais representam o desvio padrão. (n=5).

A pressão de CO_2 nos espaços intercelulares é definida pelo balanço entre o consumo de CO_2 pela fotossíntese e a sua reposição, seja pelo influxo do meio externo seja pela respiração. O comportamento estomático tende a atuar de forma a manter constante a pressão parcial interna de CO_2 para uma dada pressão externa de CO_2 , enquanto essa tendência de otimização é mantida, a razão C_i/C_a permanece constante (OLIVEIRA, 2007). No presente estudo o aumento da razão C_i/C_a também pode ser associada ao acúmulo de CO_2 produzido pela respiração,

visto que com a diminuição do potencial hídrico e o fechamento estomático a difusão desse gás para o meio externo foi comprometida. Além disso, o acúmulo de CO₂ interno também ocorreu devido ao decréscimo da incorporação de carbono pelas reações de carboxilação da fotossíntese. Sugere-se que a limitação na fotossíntese não foi causada somente pelo fechamento estomático, mas também por outros fatores, como por exemplo, danos no aparato fotossintético.

Observa-se que após o período de recuperação das plantas alagadas por três dias, ambas as cultivares apresentaram A , g_s e C_i/C_a semelhantes às plantas não alagadas (Figura 2 A-F). Estes resultados mostram que a atividade fotossintética das cultivares FB 200 e FB 300 foi recuperada após a exposição a curtos períodos de alagamento. No entanto, a recuperação da atividade fotossintética não foi observada quando as plantas foram submetidas a sete dias de alagamento (Figura 3 A-F). Neste caso, os valores da assimilação líquida de CO₂ e da condutância estomática permaneceram iguais a zero, enquanto os valores da razão C_i/C_a reduziu no sétimo dia da recuperação (Figura 3A-F).

A cinética da emissão da fluorescência da clorofila *a* tem sido uma técnica não destrutiva amplamente difundida para o estudo em organismos fotossintéticos, tanto na pesquisa básica quanto na pesquisa aplicada, fornecendo informações qualitativas e quantitativas sobre uma grande variedade de eventos fotossintéticos (STIRBET; GOVINDJEE, 2011).

A Figura 4 representa uma típica curva OJIP da fluorescência da clorofila *a* e as letras O, J, I, P sinalizam o tempo em que cada ponto ocorre na curva. Nota-se um comportamento semelhante nas cultivares de maracujazeiro FB 200 e FB 300, com um aumento do nível de fluorescência inicial (F_0) para o nível máximo (F_M) no decorrer dos dias de alagamento. Resultados semelhantes foram encontrados por Oukarroum et al. (2009) ao trabalhar com estresse hídrico e termotolerância em plantas de cevada.

Observa-se ainda que, como consequência, ocorreu uma diminuição da área acima da curva OJIP (Figura 4). De acordo com Metha et al. (2010) a área entre F_0 e F_M é proporcional ao estado de oxidação dos aceptores de elétrons no lado redutor do FSII. Se a área é drasticamente reduzida, a transferência de elétrons do Centro

de Reação (RC) para o *pool* de plastoquinona (PQ) é bloqueada, devido ao acúmulo de aceptores reduzidos.

Com o alagamento, as fases O-J e J-I foram as que apresentaram maiores alterações (Figura 4). As fases O-J e J-I representam, respectivamente, a redução do lado aceptor do FSII (Q_A e Q_B) e a progressiva redução do *pool* de plastoquinona, indicando um acúmulo de plastoquinonas reduzidas.

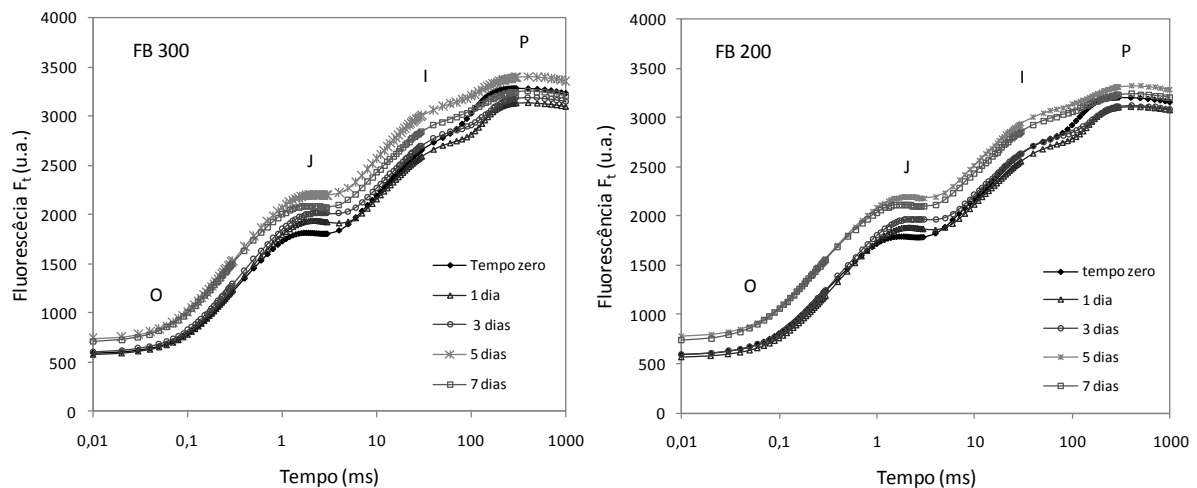


Figura 4 – Cinética da fluorescência da clorofila a (curva OJIP) plotados em escala logarítmica de tempo, obtida em folhas de plantas de maracujazeiro *Passiflora edulis* SIMS, cvs. FB 200 e FB 300, submetidas a zero dia (◆), 1 dia (△), 3 dias (○), 5 dias (*), 7 dias de alagamento (□). Letras O, J, I e P sinalizam o momento em que cada ponto ocorre na curva e são as médias de 5 medidas independentes.

Neste estudo, os dados de fluorescência foram normalizados entre 0,05 ms (ponto O) e 0,3 ms (ponto K), como $V_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$, e plotados como a diferença da cinética da fluorescência transiente OJIP (ΔV_{OK}) revelando uma nova banda L. A banda L é um indicador da conectividade espacial das unidades do FSII. Valores positivos da banda L indicam menor conectividade (YUSUF et al., 2010). A maior conectividade das unidades do FSII resultam em melhor utilização da energia de excitação e maior estabilidade do aparato fotossintético (STRASSER, 1981; STRASSER et al., 2004).

De acordo com a figura 5 C-D o estresse por alagamento resultou em uma diminuição da conectividade das unidades do FSII (com bandas L positivas) nas duas cultivares. Na cultivar FB 200, os resultados para banda L positiva foram observados mais tardiamente, no 5º dia de alagamento, visto que no terceiro dia de estresse as plantas apresentavam comportamento semelhante ao primeiro dia.

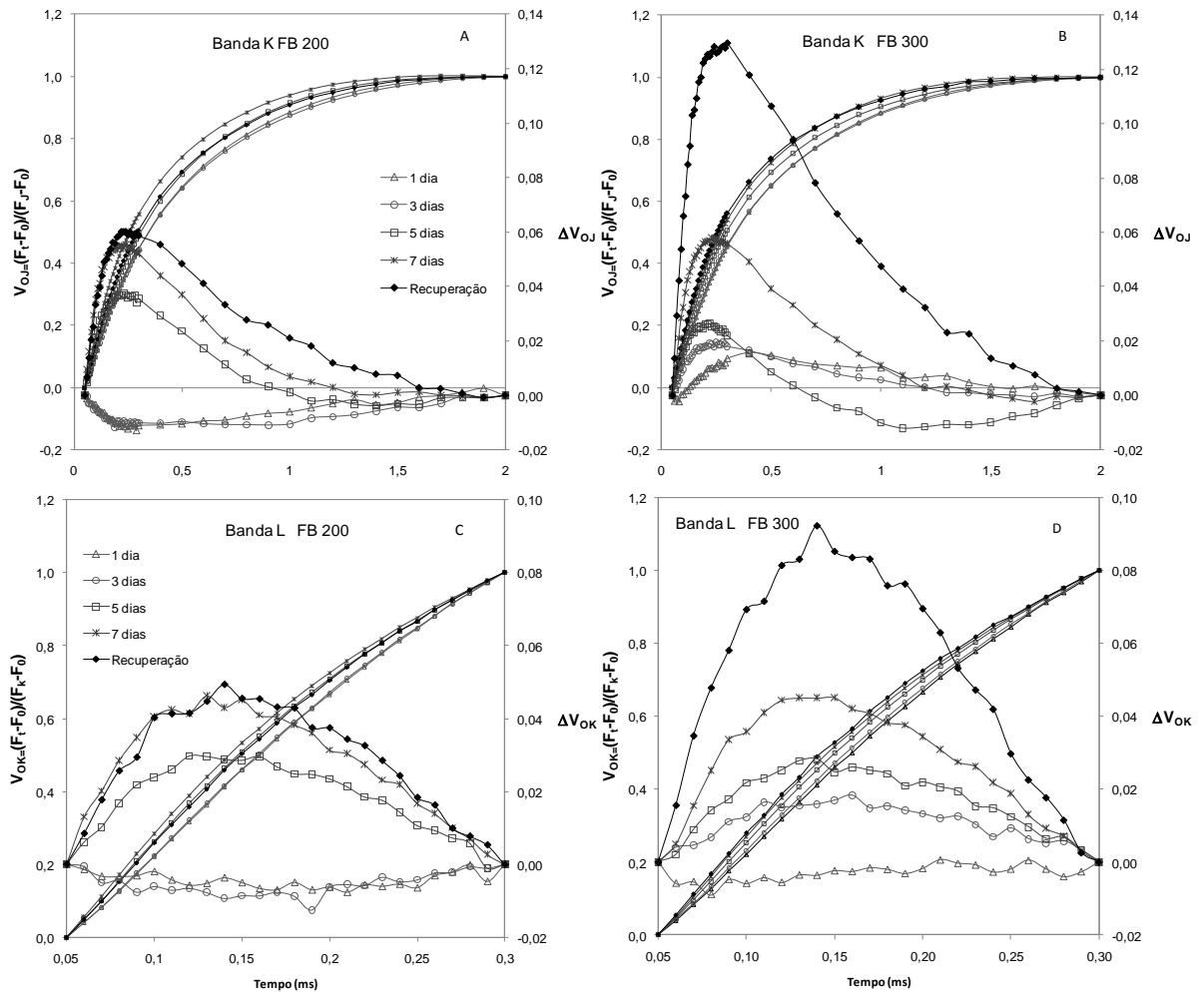


Figura 5 - Cinética OJIP da fluorescência da clorofila *a* de folhas adaptadas ao escuro de plantas de *Passiflora edulis* SIMS, cvs FB 200 e FB 300; A e B: ΔV_{OJ} revelando a banda K; C e D: ΔV_{OK} revelando a banda L. Comportamento das plantas submetidas a 1 dia (Δ), 3 dias (\circ), 5 dias (\square), 7 dias de alongamento ($*$) e recuperação de 7 dias (\blacklozenge) (n=5).

Por outro lado, a banda L positiva foi observada na cultivar FB 300 já no terceiro dia de alongamento (Figura 5D). Observou-se, também, que após o período de recuperação, as duas cultivares não apresentaram uma diminuição da banda L, como esperado. Ao contrário, em FB 300, a banda L aumentou, mostrando que as plantas de *Passiflora edulis* SIMS, das cv. FB 200 e FB 300 não recuperaram a integridade das unidades do FSII em um período de sete dias após o estresse por alongamento.

Os dados de fluorescência foram também normalizados entre as etapas O-J (0,05 e 2 ms, respectivamente), como $VOJ = (Ft - F_0) / (FJ - F_0)$, e plotados com a

diferença da cinética da fluorescência transiente OJIP (ΔVOJ), possibilitando a observação da banda K. Segundo Strasser et al.(2004), a banda K, quando positiva, pode refletir tanto a inativação do complexo de evolução do oxigênio (especialmente do complexo Mn) e/ou um aumento do tamanho da antena funcional. A presença desta banda K também foi observada em cultura de algas lacustris *Haematococcus* após tratamento térmico e em diferentes plantas de ecossistemas com ambiente seco e quente, como folhas de *Cycus revoluta* e *Permelia* sp., bem como frutos de *Juniperus* sp. (Srivastava et al. 1997).

As figuras 5 A-B mostram valores positivos para a banda K em FB 300 a partir do 1º dia de alagamento, ao contrário da cultivar FB 200, a qual só apresentou valores positivos para esta banda a partir do quinto dia de alagamento. Assim, analogamente aos resultados observados em relação à banda L, o efeito do alagamento sobre o comportamento da banda K na cultivar FB 200 foi evidenciado tardiamente. No entanto, no 7º dia de alagamento os valores da banda K foram semelhantes para as duas cultivares.

Em relação à fase de recuperação das plantas, notou-se um resultado semelhante ao da banda L, destacando-se o aumento da banda K apresentado pela cultivar FB 300 após o período de recuperação. Estes resultados permitem sugerir que na cultivar FB 300 os componentes do FSII, assim como o complexo de evolução do oxigênio, foram mais afetados pelo alagamento.

Para melhor entender os efeitos do alagamento sobre a atividade fotossintética nas plantas de maracujazeiro, os resultados das curvas OJIP foram detalhados usando as equações que compõem o Teste JIP. Este teste representa a análise multipamétrica do aumento da fluorescência transiente OJIP e permite obter informações sobre parâmetros estruturais e funcionais que quantificam a atividade aparato fotossintético (STRASSER et al., 2004).

Os fluxos específicos de energia por Centro de Reação (ABS/RC , DI_0/RC , TR_0/RC , ET_0/RC) sofreram alterações gradativas no decorrer do experimento em ambas as cultivares (Figuras 6-7).

Após o 5º dia de alagamento, aumentos na absorção (ABS/RC) e na captura de energia (TR_0/RC) foram observados em FB200. No entanto, parte dessa energia foi perdida devido o aumento da dissipação por centro de reação ativo (DI_0/RC). Um

decréscimo no transporte de elétrons (ET_0/RC) ocorreu no terceiro dia de alagamento, corroborando os resultados encontrados na curva OJIP, onde observou um acúmulo de Q_A e Q_B e comprometimento da cadeia transportada de elétrons.

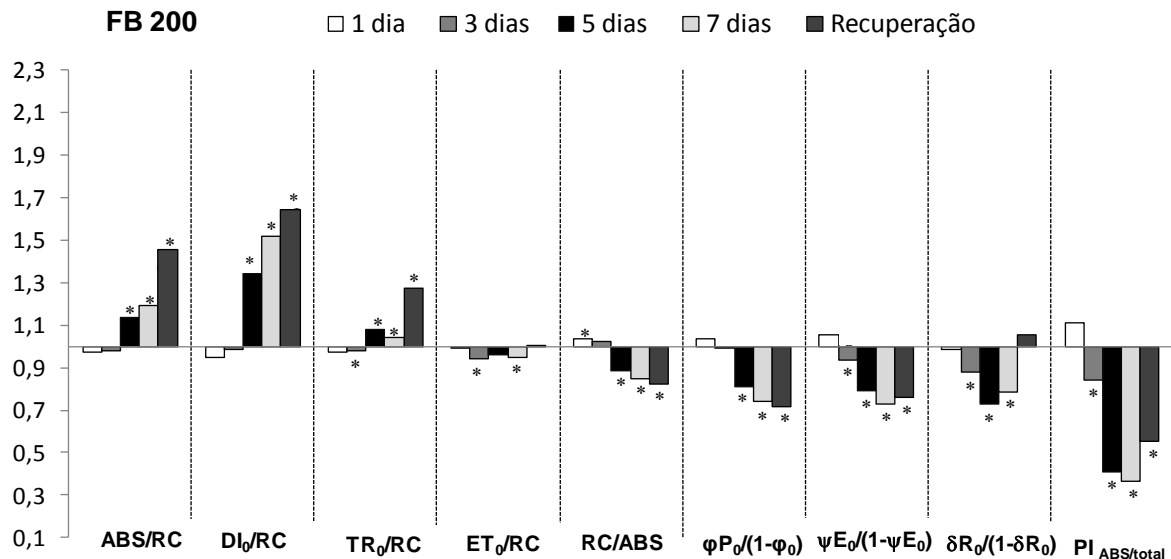


Figura 6 – Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a*, deduzidos pelo teste JIP, em plantas de maracujazeiro, *Passiflora edulis* SIMS, cv. FB200. Comportamento das plantas submetidas a 1 dia, 3 dias, 5 dias, 7 dias de alagamento e recuperação por 7 dias. Para cada parâmetro as médias foram normalizadas usando as plantas não alagadas como referência, representadas no eixo horizontal (igual à unidade). As colunas mostram o impacto fracionário provocado pelo estresse. * representa as diferenças significativas do controle (Tukey, $P \leq 0,05$). (n=5).

Em FB 300 houve um aumento significativo em ABS/RC e TR_0/RC a partir 3^o e 5^o dia alagamento, respectivamente (Figura 7). Smit et al., (2009) relacionam o aumento de ABS/RC ao aumento do tamanho do sistema antena. Assim, esse aumento representaria uma estratégia adaptativa da cultivar para incrementar a absorção de energia de excitação utilizada no processo fotossintético. No entanto, os maiores valores de ABS/RC e TR_0/RC foram acompanhados por aumentos significativos nos valores da dissipação de energia (DI_0/RC) a partir do 5^o dia de alagamento (Figura 8). Resultados similares foram observados por Valbão (2009) em plantas de maracujazeiro sob estresse de transplântio. O autor verificou que, o aumento da absorção (ABS/RC) e da captura de energia radiante (TR_0/RC) era também acompanhado pelo aumento da dissipação da energia radiante (DI_0/RC), sugerindo um mecanismo de fotoproteção.

Após sete dias de recuperação, os valores de ABS/RC e TR_0/RC mantiveram-se altos em ambas as cultivares, no entanto, com as taxas de DI_0/RC ainda muito altas (Figuras 6 e 7). A cultivar FB 300 apresentou os maiores valores de DI_0/RC após recuperação. Também na curva da fluorescência OJIP, foi observado que, mesmo após a recuperação, esta cultivar ainda apresentava a Banda L positiva, indicando a perda da conectividade entre os componentes do FSII. Estes resultados confirmam a elevações de DI_0/RC e a queda significativa nos valores de ET_0/RC (Figura 7) enquanto que na cultivar FB 200 não houve alterações nestes parâmetros.

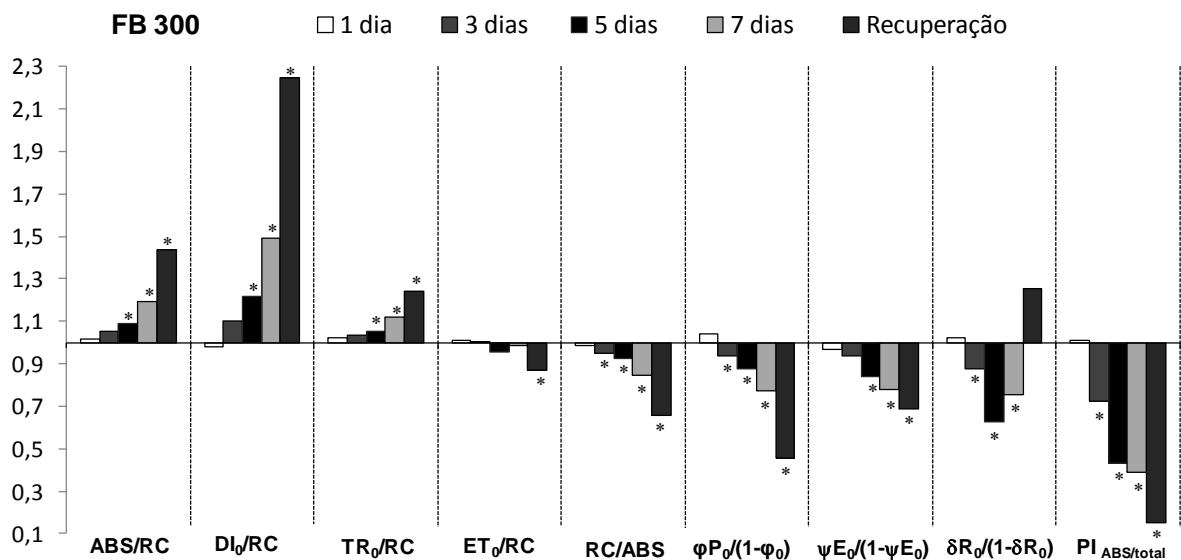


Figura 7 - Parâmetros da fluorescência OJIP deduzidos pelo teste JIP em maracujazeiros *Passiflora edulis* SIMS cv. FB300 (n=5). Comportamento das plantas submetidas de 1 dia, 3 dias, 5 dias, 7 dias de alagamento e 7 dias de recuperação avaliadas sob a perspectiva de oito parâmetros estruturais e funcionais. Para cada parâmetro as médias foram normalizadas usando as plantas não alagadas como referência igual à unidade. O eixo horizontal representa as plantas não alagadas (igual à unidade ou =1) e as colunas a partir deste mostram o impacto fracionário provocado pelo estresse. Diferenças significativas do controle (Tukey, $P \leq 0,05$) são indicadas pelo asterisco.

Segundo Metha et al. (2010), o índice de desempenho fotossintético (PI) é um indicador da “vitalidade” da planta. O cálculo de PI combina a densidade de centros de reação, o fluxo de energia máximo que chega ao FSII, o transporte de elétrons e a redução dos aceptores finais do FSI .

Observou-se redução significativa do índice de desempenho total ($PI_{ABS/total}$) na cultivar FB 300 a partir do segundo dia de alagamento. Entretanto, na cultivar FB 200 a redução significativa desse parâmetro ocorreu somente no quarto dia

alagamento (Figuras 8-9). Os componentes do $PI_{ABS,total}$ (RC/ABS ; $\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$; $\psi_{E0}/(1-\psi_{E0})$ e $\delta_{R0}/(1-\delta_{R0})$ foram gradativamente reduzidos após o terceiro dia de alagamento na cultivar FB 300 (Figura 7).

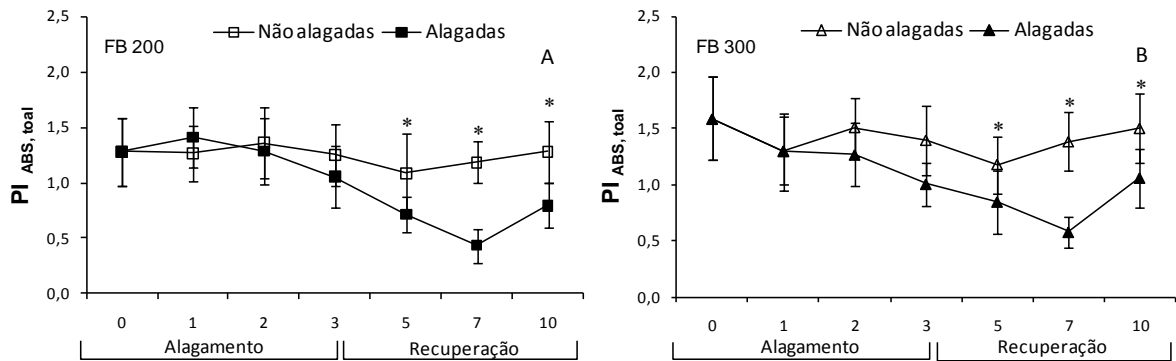


Figura 8 – Índice de desempenho total ($PI_{ABS,total}$) obtido em folhas de maracujazeiro, *Passiflora edulis* SIMS, cvs.FB 200 e FB 300 não alagadas (□; △) e alagadas por um período de 3 dias (■; ▲). O asterisco (*) indica diferença significativa entre as plantas alagadas e não alagadas no mesmo período. As barras verticais representam o desvio padrão (n=5). Quando não visível a barra de desvio é menor que o símbolo.

No entanto, na cultivar FB 200, a densidade de centros de reação ativos (RC/ABS) e o fluxo máximo de energia que chega aos centros de reação do FSII [$\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$] decresceram a partir do 5º dia de alagamento devido a diminuição da conectividade entre as unidades do FSII mostrado com a banda L positiva a partir do 5º dia de alagamento.

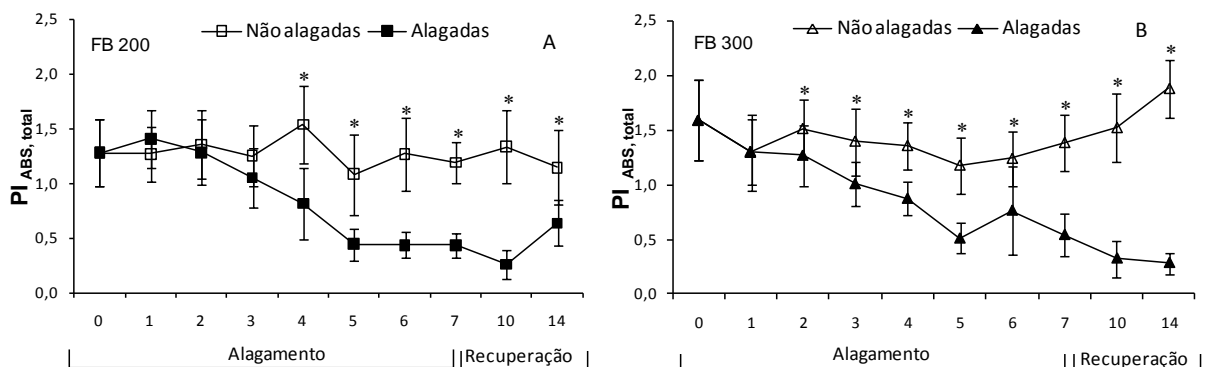


Figura 9 – Índice de desempenho total ($PI_{ABS,total}$) obtido em folhas de maracujazeiro, *Passiflora edulis* SIMS, cvs.FB 200 e FB 300 não alagadas (□; △) e alagadas por um período de 7 dias (■; ▲). O asterisco (*) indica diferença significativa entre as plantas alagadas e não alagadas no mesmo período. As barras verticais representam o desvio padrão (n=5).

Após o período de recuperação das plantas alagadas por 3 dias, um aumento de $PI_{ABS/total}$ foi observado nas duas cultivares. Por outro lado, após a recuperação das plantas submetidas ao alagamento por sete dias, houve recuperação parcial de $PI_{ABS/total}$ na cultivar FB 200 sem sinais de recuperação na cultivar FB 300. Em condições de estresse ambientais, como alta luminosidade, déficit hídrico e alagamento, a taxa de produção de poder redutor na fase fotoquímica geralmente é maior do que sua taxa de reoxidação, principalmente devido ao descréscimo da redução do CO_2 (ASADA, 1999). Assim, a super-redução da cadeia de transporte de elétrons fotossintético leva à formação de excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos cloroplastos, o que pode resultar em fotoinibição e danos fotooxidativos (ASADA, 1999).

Uma série de passos é requerida para que haja a eliminação das espécies reativas de oxigênio quando produzidas em excesso. A enzima superóxido dismutase (SOD) é considerada uma primeira barreira enzimática contra o estresse oxidativo por converter o $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 (FRIDOVICH, 1995). O produto da converção do superóxido pela SOD, o H_2O_2 , deve ser removido do meio celular a fim de evitar sua conversão em radicais mais reativos, como o radical hidroxil (OH^{\cdot}) (PERL-TREVES; PERL, 2002). Para isso, diversas enzimas como catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) atuam reduzindo o H_2O_2 .

No terceiro dia de alagamento, observou-se que a atividade da enzima Catalase diminuiu nas plantas da cv. FB 200, já a atividade da enzima peroxidase do ascorbato não foi alterada nesse período (Figura 10 A-C). Entretanto, quando as plantas foram submetidas ao alagamento por sete dias, acréscimos significativos na atividade da APX foi observado na cultivar FB 200 (Figura 11 A). A maior atividade da APX em FB 200 reforça o comprometimento da atividade fotossintética observada nesta cultivar, dados os valores de A nulos no 5º dia de alagamento. Quanto à recuperação, sete dias de drenagem do solo não foram suficientes para que a atividade dessa enzima retornasse aos índices semelhantes ao das plantas não alagadas (Figura 11A).

Alterações significativas na atividade da APX também foram observados para a cultivar FB 300, no entanto, somente ao final do período de recuperação (Figura 11B), analogamente ao observado nas bandas L e K (Figura 5 A-D) que aumentaram após o período de recuperação, confirmando assim, um agravamento

do estresse após o período de drenagem do solo. De acordo com Mittler; Zilinskas (1994), o período de recuperação de plantas após exposição a condições de estresse parece ser um estágio delicado que pode ser acompanhado pelo estresse oxidativo, sendo requerida a indução dos sistemas de defesa (MITTLER; ZILINSKAS, 1994).

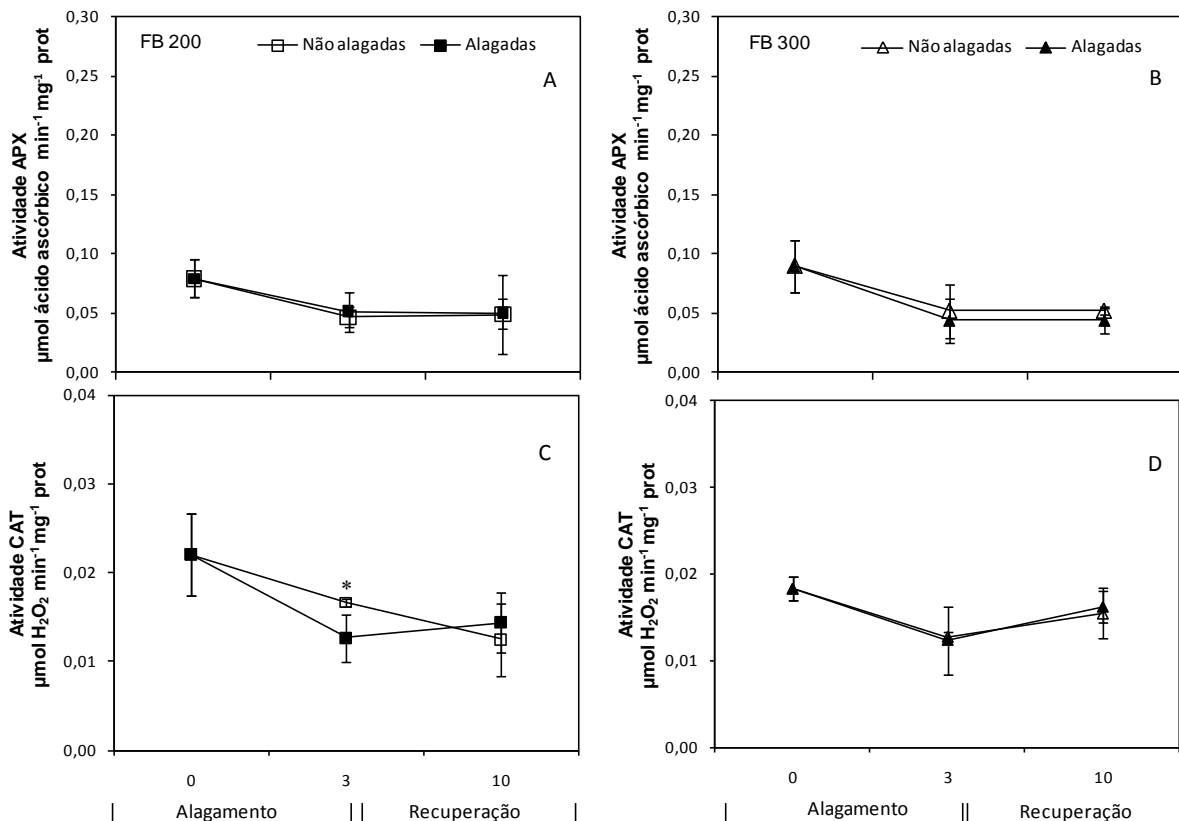


Figura 10 - Atividade específica das enzimas Catalase (CAT) e Peroxidase do Ascorbato (APX) de folhas de maracujazeiro *Passiflora edulis* SIMS cvs. FB 200 e FB 300 não alagadas (□; Δ) e alagadas por um período de 3 dias e recuperação (■; ▲). O asterisco (*) indica diferença significativa entre as plantas alagadas e não alagadas no mesmo período. As barras verticais representam desvio padrão (n=3). Quando não visível a barra de desvio é menor que o símbolo.

Inicialmente a atividade da CAT decresceu na cultivar FB 200 em relação as plantas controle. No entanto, no 7^o dia de alagamento a atividade aumentou significativamente, decrescendo no período de recuperação (Figura 11 C). Nenhuma alteração na atividade da CAT foi observada em FB 300. Dados semelhantes foram obtidos por Silva et al. (2010), trabalhando com déficit hídrico em *Jatropha curcas*. Os autores relatam uma forte inibição da atividade da CAT e um aumento da atividade da APX após cinco dias de déficit hídrico. Segundo Palatnik et al., (2002) várias isoformas da APX são amplamente distribuídas em quase todas as

organelas celulares, os estresses abióticos frequentemente provocam o aumento tanto da expressão do gene quanto da atividade total de APX a fim de compensar a deficiência da atividade da Catalase. A CAT e a APX apresentam diferentes afinidades pelo H_2O_2 , com a APX na ordem μM e a CAT em mM. Assim, enquanto a APX seria responsável pela modulação refinada das EROs para a sinalização, a CAT seria responsável pela remoção do excesso de EROs gerado durante o estresse (MITTLER, 2002).

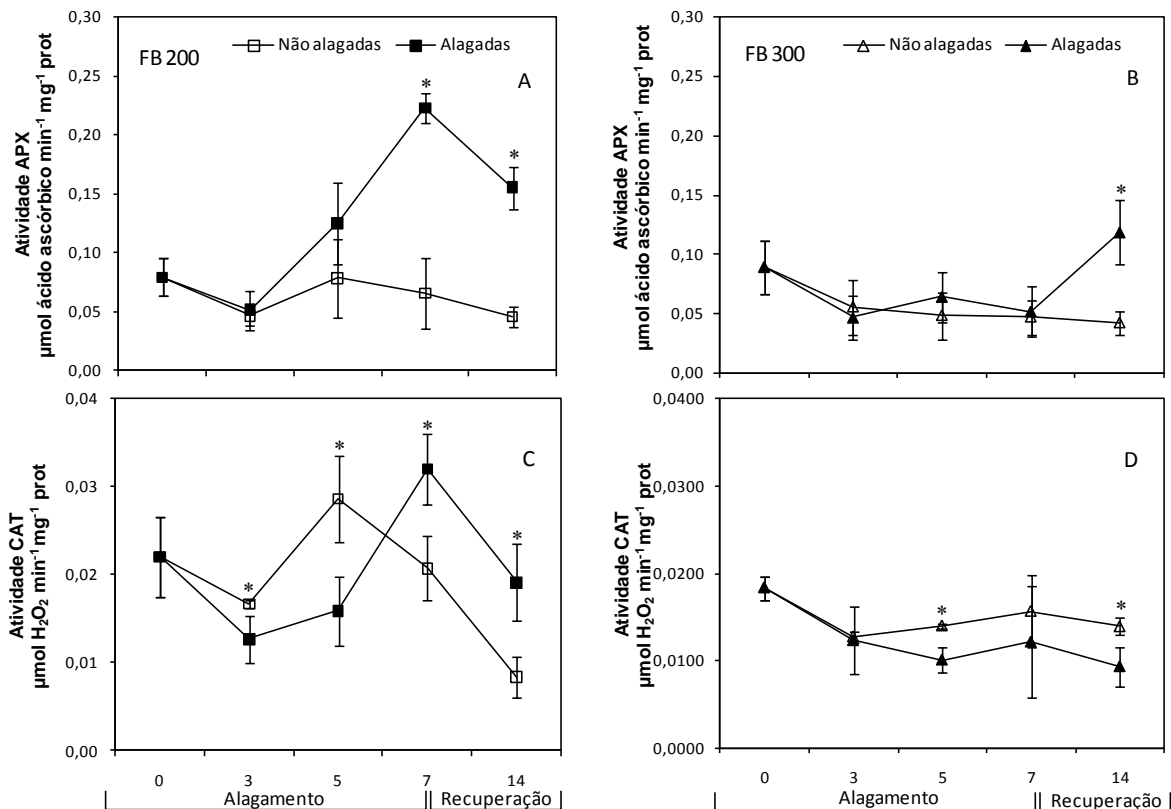


Figura 11 - Atividade específica das enzimas Catalase (CAT) e Peroxidase do Ascorbato (APX) de folhas de maracujazeiro *Passiflora edulis* SIMS, cvs. FB 200 (A e C) e FB 300 (B e D), não alagadas (\square ; Δ) e alagadas por um período de 7 dias e recuperação (\blacksquare ; \blacktriangle). O asterisco (*) indica diferença significativa entre as plantas alagadas e não alagadas no mesmo período. As barras verticais representam desvio padrão. (n=3). Quando não visível a barra de desvio é menor que o símbolo.

Diante dos resultados obtidos, observou-se que as cultivares FB 200 e FB 300 apresentaram-se tolerantes a curtos períodos de alagamento (três dias), com pequeno decréscimo na atividade fotossintética, verificada por meio da avaliação da taxa de assimilação de CO_2 e condutância estomática que se tornou semelhante às das plantas não alagadas após recuperação. A atividade antioxidante nesse período não apresentou alterações. A taxa de assimilação líquida de CO_2 em ambas as

cultivares foram drasticamente reduzidas quando submetidas a sete dias alagamento. A redução em A foi atribuída ao fechamento estomático e a danos ocorridos nos fotossistemas. A cultivar FB 300 tolera um maior período de alagamento quando comparada a cultivar FB 200, o que pode ser atribuída a sua rusticidade e sua maior variabilidade genética, uma vez que esta cultivar foi produzida por meio do cruzamento de uma variedade de maracuja amarelo com uma população roxa. No entanto, a cultivar FB 200 apresenta sinais de recuperação após o período de drenagem do substrato com aumento da atividade fotoquímica, verificados nos valores de $PI_{ABS/total}$. A técnica da fluorescência a , mostrou-se muito eficiente na detecção de estresse em maracujazeiros, ressaltando sua importância por ser uma técnica não destrutiva.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando as condições ambientais que as plantas podem ser submetidas no Estado, a análise da atividade fotossintética assume grande importância na seleção de cultivares mais tolerantes ao estresse hídrico por alagamento, uma vez que, a fotossíntese é uma dos processos centrais no metabolismo das plantas. Nesse sentido, a técnica da fluorescência da clorofila *a* foi muito eficiente na detecção de estresse em maracujazeiros, ressaltando sua importância por ser uma técnica não destrutiva.

O estresse hídrico por alagamento mostrou-se prejudicial ao desenvolvimento da cultura do maracujazeiro afetando, principalmente, a atividade fotossintética das cultivares FB 200 e FB 300. Os resultados obtidos indicam que as duas cultivares de maracujazeiro são tolerantes a curtos períodos de alagamento. No entanto, sete dias de alagamento pode ser considerado um estresse severo pois não ocorre recuperação da atividade fotossintética após drenagem do substrato.

O maracujazeiro é susceptível ao excesso de água no solo, não sendo recomendado sua cultura em locais alagadiços ou em área de riscos de longos períodos de inundação.

De forma geral, pode considerar que este trabalho contribuiu para o conhecimento do comportamento fisiológico do maracujazeiro exposto ao alagamento. Maiores estudos são, portanto, necessários para avaliar a influência do excesso de água no solo na atividade de outros parâmetros fisiológicos, como na atividade de enzimas do metabolismo do carbono.

5 REFERÊNCIAS

ALVES, J.D.; MAGALHÕES, M.M.; GOULART, P.F.P.; DANTAS, B.F.; GOUVÊA, J. A.; PURCINO, R.P.; MAGALHÕES, P.C.; FRIES, D.D.; LIVRAMENTO, D.E.; MEYER, L.E.; SEIFFERT, M.; SILVEIRA, T. Mecanismos de tolerância da variedade de milho “saracura”(BRS 4154) ao alagamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.1, p.41-52, 2002.

ANDERSON M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, Ames, v.109, p.1247-1257, 1995.

ASADA, K. The Water–Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 601–639, 1999.

BARUCH, Z., Responses to drought and flooding in tropical forage grasses. **Plant and Soil**, v.164, p. 97-105, 1994.

BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PASSOS, I.R.S.; MELETTI, L. M. M. *Passiflora edulis* SIMS: The correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 566-576, 2008.

BERNACCI, L.C.; VITTA, F.A.; BAKKER, Y.V. Passifloraceae.In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T.S. (Ed.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa/FAPESP, 2003. v. 3, p. 247-274.

CARVALHO, C.J.R.; ISHIDA, F.Y.; Respostas de pupunheiras (*Bactris gasipaes* Kunth) jovens ao alagamento. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 37, n. 9, p. 1231-1237, 2002.

CINTRA, F. L. D., PORTELA, G. C., NOGUEIRA, L. C. Caracterização física e hídrica em solos dos Tabuleiros Costeiros no Distrito de Irrigação Platô de Neópolis. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.8, n.1, p.45-50, 2004.

COSTA, A.F.S.; COSTA, A.N.; VENTURA, J.A.; FANTON, C.J.; LIMA, I.M.; CAETANO, L.C.S.; SANTANA, E.N. **Recomendações técnicas para o cultivo do maracujazeiro**. Vitória:INCAPER, 2008.

DUARTE, M. N., CURI, N., PÉREZ, D. V., KÄMPF, N., CLAESSEN, M. E. C. Mineralogia, química e micromorfologia de solos de uma microbacia nos tabuleiros costeiros do Espírito Santo. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.35, n.6, p.1237-1250, jun. 2000.

ELSTNER, E.F. Mechanism of oxygen activation in different compartments. in:E.J. Pell, K.L. Steffen (Eds.), *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism*. **American Society of Plant Physiologists**, Roseville, p. 13-25, 1991.

FELIEPE, R.T.A.; OLIVEIROA, J.A.; LEÃO, G.A. Potencial de *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* para fitorremediação: Absorção de arsênio e respostas antioxidativas. **Revista Árvore**,v.33, n.2, p.245-254, 2009.

FERNÁNDEZ, A.P., STRAND, A. Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p.509–513, 2008.

FOYER C.H.; DESCOURVIÉRES P.; Kunert K.J. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 17, p. 507-523, 1994.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and SODs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 97–112, 1995.

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosys**,v.143, p. 8-96, 2009.

GILL, S.S.; TUTEJA, N.; Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry** (2010), doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016.

GUISSÉ, B.; SRIVASTAVA, A.; STRASSER, R.J. The polyphasic rise of the chlorophyll a fluorescence (O-K-J-I-P) in heat stressed leaves. *Archive. Scientific Genève*, v. 48, p.147-160, 1995.

GONÇALVES, J.F.; SILVA, C.E.M; Guimarães, D.G. Fotossíntese e potencial hídrico foliar de plantas jovens de andiroba submetidas à deficiência hídrica e à reidratação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.44, n.1, p.8-14, 2009.

GRATAO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal stressed plants a little easier, *Functional Plant Biology*, v. 32, p. 481-494, 2005.

HAVIR, E.; MCHALE, N. A. A Regulation of Catalase Activity in Leaves of *Nicotiana sylvestris* by High CO₂. *Plant Physiology*, v.89, n.3, p.952-957, 1989.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedling and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiology*, v. 34, p. 713-721, 1993.

LI, C.; BAI, T.; MA, F.; HAN, M. Hypoxia tolerance and adaptation of anaerobic respiration to hypoxia stress in two *Malus* species. *Scientia Horticulturae*, v. 124, p. 274–279, 2010.

MARTINS, M. G., SILVA, M. L. N., AVANZI, J. C., CURTI, N., FONSECA, S. Fator cobertura e manejo do solo e perdas de solo e água em cultivo de eucalipto e em Mata Atlântica nos Tabuleiros Costeiros do estado do Espírito Santo. *Scientia Florestalis*, Piracicaba, v. 38, n. 87, p. 517-526, 2010.

MEHTA, P.; JOJOO, A.; MATHUR, S.; BHARTI, S. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves *Plant. Physiology and Biochemistry*, v. 48, p.16-20, 2010.

MELETTI, L. M.M.; BRÜCKNER, C.H. Melhoramento Genético. In: BRÜCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 345-385. 2001.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/php/proton/cultivarweb/cultivares_registradas.php.

Acesso em dezembro de 2010.

MITTLER, R.; ZILINSKAS, B. A. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. **The Plant Journal**, v. 5, n. 3, p. 397-405, 1994.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.

MOLLER, I.M.; JESEN, P.E.; HANSSON. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of plant biology**, v.58, n.1, p.459-481, 2007.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant Cell Physiology**. v.22, p. 867-880, 1981.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.49, p.249–79, 1998.

OLIVEIRA, Viviana Camila. **Efeito da saturação hídrica do solo na taxa de assimilação de CO₂ e no desenvolvimento de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae)**. 2007. 106f. Tese (Mestrado em Biologia Vegetal)- Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

OUKARROUMA, A.; MADIDI, S.E.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R.J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, v.60, p.438–446, 2007.

OUKARROUM, A.; SCHANSKER, G.; STRASSER R.J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, v.137, p. 188–199, 2009.

PALATNIK, J.F.; VALLE, E.M.; FEDERICO, M.L.; GOMEZ, L.D.; MELCHIORRE, M.N.; PALEO, A.D.; CARRILLO, N.; ACEVEDO A. Status of antioxidant metabolites and enzymes in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Science**, v.162, p. 363-371, 2002.

PERL-TREVES, R.; PERL, A. Oxidative stress: an introduction. In: INZÉ, D.; MONTAGU, M. V. **Oxidative stress in plants**. Taylor & Francis: London and New York, 2002. cap. 1, p.1-32.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIN, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.137-143, 1999.

PEZESHKI, S.R. Plant responses to flooding. In: WILKINSON, R.E. (Org.). **Plant Environment Interactions**, p. 289-321, 1994.

PORTELA, J. C., LIBARDI, L. L., VAN LIER, Q. J. Retenção da água em solo sob diferentes usos no ecossistema tabuleiros costeiros. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.1, p.49-54, 2001.

REHEM, B.C.; ALMEIDA, A.A.F.; MIELKER, M.S.; GOMES, F.P. Efeitos do alagamento do substrato no crescimento e na composição química de genótipos clonais de *Theobroma cacao* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, p.805-815, 2009.

SCHOLANDER, P.F.; HAMMEL, H.T.; BRADSTREET, E.D.; HEMMINGSEN, E.A. Sap pressure in vascular plants. **Science**, v. 148, p. 339–346, 1965.

SILVA, J.R. **Flora Brasil, sementes e mudas**: O lucro de seu pomar começa aqui. [Araguari - MG]. Folheto.

SINGH, H.P.; SINGH, B.B.; RAM, P. Submergence tolerance of rainfed lowland rice: search for physiological marker traits. **Journal Plant Physiology**, v.158, p. 883-889, 2001.

SMIT, M.F.; HEERDEN, P.D.R.V.; PIENAAR, J.J.; WEISSFLOG, L.; STRASSER, R. J.; KRUGER, G.H.J. Effect of trifluoroacetate, a persistent degradation product of fluorinated hydrocarbons, on *Phaseolus vulgaris* and *Zea mays*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 623–634, 2009.

STIRBET, A.; GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, (2011). doi:10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010.

STRASSER, B.J.; STRASSER, R.J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. In: Mathis P (ed) *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, The Netherlands, p. 977– 980, 1995.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. In: Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P. (Eds.), **Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation**. Taylor & Francis, London, UK, 25, p. 443–480, 2000.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the fluorescence transient. In: George C., Papageorgiou C., Govindjee (eds.): *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. **Advances in Photosynthesis and Respiration Series**. Springer, Dordrecht: p.321–362, 2004.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; QIANG, S.; GOLTSEV, V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1313–1326, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

TÔTH, S.Z. **Analysis and Application of the Fast Chl a Fluorescence (OJIP) Transient complemented with simultaneous 820 nm transmission measurements**. 2006, 170 p. Tese de Doutorado, Universidade de Genebra, Suíça. 170p. 2006.

TSIMILI-MICHAEL, M.; STRASSER, R.J. *In vivo* assessment of stress impact on plants' vitality: Applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants. In: VARMA, A. (ed.). **Mycorrhiza: State of the art, genetics and molecular biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics**. 3th edition. Springer, p. 679-703, 2008.

VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemical Biology International**, v.160, p.1-40, 2006.

VALBÃO, S.C.F. **Fluorescência da clorofila a em diferentes fases do desenvolvimento e qualidade dos frutos de três genótipos do maracujazeiro cultivados no norte do estado do Espírito Santo**. 2009. 87f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

WISE, R.R.; NAYLOR, A.W. Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. **Plant Physiology**, v.83, p. 278-282, 1987.

YU; Q.; RANGEL, Z. Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutase in narrow leafed lupines. **Plant science**, v. 142, p. 1-11, 1999.

YUSUF, M.A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N.B. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a. **Biochimica et Biophysica Acta**, Índia, v. 1797, p. 1428–1438, 2010.