

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

**Estresses abióticos em híbridos de canola: Efeito do
alagamento e de baixas temperaturas**

Anelise Tessari Perboni

Pelotas, 2011

Anelise Tessari Perboni

**Estresses abióticos em híbridos de canola: Efeito do
alagamento e de baixas temperaturas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Marcos Antonio Bacarin

Co-orientador: Dr. Sidnei Deuner

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

P426e Perboni, Anelise Tessari

Estresses abióticos em híbridos de canola: efeito do alagamento e de baixas temperaturas / Anelise Tessari Perboni ; orientador Marcos Antonio Bacarin; co-orientador Sidnei Deuner. Pelotas, 2011.-53f. - Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1. Teste-JIP 2. Brassica napus 3. Estresse 4. Índice de performance I. Bacarin, Marcos Antonio (orientador) II. Título.

CDD 584.93

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Antonio Bacarin

Prof^a. Dr^a. Diolina Moura Silva

Prof. Dr. José Antônio Peters

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de realizar os meus sonhos e dar forças para lutar por eles.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida durante o curso.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), pelo auxílio financeiro.

Ao professor Marcos Antonio Bacarin, pela orientação, ensinamentos, confiança, apoio e amizade que me proporcionaram crescer como profissional e pessoa.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (PPGFV), pela convivência e amizade, em especial a Emanuela Martinazzo, Marília Mércia Carneiro, Camila Pinho de Souza, Janete Adamski e Sidnei Deuner.

Aos estagiários e bolsistas de iniciação científica, Pablo Valadão, Márcio Farias e Henrique Chiarelo pelo auxílio na condução dos experimentos e pela amizade.

Aos professores e funcionários do PPGFV, pelos ensinamentos e apoio recebido.

As amigas Camila Pegoraro e Caroline Rodrigues, pelo carinho e pelos momentos de descontração, que muitas vezes “renovaram as energias” e tornaram o caminho até aqui mais agradável.

Aos meus pais Nelson e Aire, pelos exemplos de vida e dedicação, amor e apoio incondicional.

Aos meus irmãos Lais e Iuri, pela amizade, companhia e pelas palavras de apoio.

Ao meu namorado Leonardo, pelo carinho, compreensão e companhia durante a realização desse curso.

E por fim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

RESUMO

PERBONI, Anelise Tessari. **Estresses abióticos em híbridos de canola: Efeito do alagamento e de baixas temperaturas.** 2011. 53f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A canola (*Brassica napus* L.) pertence à família das Brassicaceae e constitui-se na terceira oleaginosa mais produzida no mundo, superada apenas pela soja e pela palma. O alagamento do solo e as baixas temperaturas podem promover alterações no metabolismo celular e prejudicar o crescimento das plantas, gerando uma condição de estresse. Foram desenvolvidos dois experimentos utilizando os híbridos de canola Hyola 43, Hyola 401, Hyola 420 e Hyola 432. O primeiro foi conduzido em casa de vegetação, onde 10 plantas de cada híbrido foram submetidas a estresse por alagamento por um período de seis dias. Foram avaliados os parâmetros e as diferenças na cinética de emissão da fluorescência da clorofila, teor de clorofila, área foliar e massa seca da parte aérea e raiz. O alagamento promoveu redução da área foliar, massa seca de raízes e relação massa seca de raiz/massa seca parte aérea de todos híbridos estudados. Em relação a fluorescência da clorofila foram identificadas diferenças nos parâmetros relacionados aos fluxos específicos que sofreram variação em função do estresse sendo esta mais acentuada para Hyola 432. Os índices de performance fotossintéticos (PI_{ABS} e $PI_{ABS, total}$) apresentaram decréscimo ao final de 6 dias de experimento exceto para o híbrido Hyola 420. A análise da cinética da fluorescência transiente da clorofila *a* mostrou efeitos diferenciais da aplicação do estresse nos diferentes locais da maquinaria fotossintética, sendo estes efeitos menos pronunciados nas plantas do híbrido Hyola 420. No segundo experimento as plantas de canola foram cultivadas em casa de vegetação sendo o estresse por baixas temperaturas conduzido no Laboratório de Metabolismo Vegetal. Dez plantas de cada híbrido foram acondicionadas em câmara de crescimento com ausência de luz por períodos distintos de baixas temperaturas: 1 e 4 horas a 0°C e 1, 4 e 15 horas a 4°C. Avaliaram-se os parâmetros e as diferenças na cinética de emissão da fluorescência da clorofila *a*. Os híbridos apresentaram o mesmo comportamento em relação à fluorescência da clorofila em resposta ao estresse por baixas temperaturas. Em geral, os parâmetros da fluorescência da clorofila relacionados à atividade do fotossistema I foram os mais afetados, sendo que o aumento destes parâmetros resultou em maiores valores de $PI_{ABS, total}$. A análise da cinética da fluorescência transiente da clorofila *a* revelou efeitos da temperatura principalmente no ponto J o qual reflete o acúmulo de plastoquinona A reduzida (Q_A^-) e na fase I-P que reflete a redução dos aceptores de elétrons finais do lado aceptor do FSI, ou seja, ferredoxina (Fd), outros intermediários e NADP. Conclui-se que as plantas do híbrido Hyola 420 foram menos afetadas pelas condições de alagamento demonstrando que tal híbrido pode ser considerado menos sensível a determinado estresse em relação aos demais híbridos testados. Os parâmetros que envolvem a atividade do FSI bem como a

fluorescência variável transiente no ponto J foram mais responsivos às condições impostas pelo estresse por baixas temperaturas.

Palavras-chave: *Brassica napus*, Teste JIP, estresse, índice de performance.

ABSTRACT

PERBONI, Anelise Tessari. **Abiotic stress in canola hybrids: Effect of flooding and low temperatures.** 2011. 53f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) belongs to the family Brassicaceae and constitutes the third most produced oilseed in the world, surpassed only by soybean and palm. Flooding of soil and low temperatures can cause alterations in cellular metabolism and impair plant growth, generating a stress condition. Two experiments were conducted using the canola hybrid Hyola 43, Hyola 401, Hyola 420 and Hyola 432. The first was conducted in greenhouse where 10 plants of each hybrid were subjected to stress by flooding for a period of six days. Were evaluated parameters and differences in the kinetics of emission of chlorophyll fluorescence, chlorophyll content, leaf area and dry weight of shoot and root. The flooding caused a reduction of leaf area, root dry mass and root dry mass/shoot dry mass ratio of all hybrids studied. In relation to chlorophyll fluorescence were identified differences in parameters related to specific flows that have undergone changes as a function of stress the latter being more pronounced for Hyola 432. The performance photosynthetic index (PI_{ABS} and $PI_{ABS, total}$) showed a decrease after 6 days of the experiment except for hybrid Hyola 420. The analysis of the kinetics of chlorophyll a fluorescence transient showed differential effects of stress application in different sites of photosynthetic apparatus, and these effects were less pronounced in the plants of hybrid Hyola 420. In the second experiment, canola plants were grown in a greenhouse where stress by low temperatures was driven in the Laboratory of Plant Metabolism. Ten plants of each hybrid were placed in a growth chamber the absence of light for different periods of low temperatures: 1 and 4 hours at 0°C and 1, 4 and 15 hours at 4°C. Were evaluated parameters and differences in the kinetics of emission of chlorophyll a fluorescence. The hybrids showed the same behavior in relation to chlorophyll a fluorescence in response to stress by low temperatures. In general, the parameters of chlorophyll fluorescence related to the activity of the PSI were the most affected, and the increase of these parameters resulted in higher values of the $PI_{ABS, total}$. The analysis of the kinetics of chlorophyll a fluorescence transient showed temperature effects, mainly at the J point which reflects the accumulation of reduced plastoquinone (Q_A^-) and the I-P phase reflecting the reduction of end electron acceptors at the PSI acceptor side, ie, ferredoxin (Fd) NADP and other intermediaries. We conclude that the plants of the hibrid Hyola 420 were less affected by flooding showing that this hybrid can be considered less sensitive to stress compared to other hybrids. The parameters that involve the activity of the FSI and the variable fluorescence transient at the J point were more responsive to stress conditions imposed by low temperatures.

Keywords: *Brassica napus*, JIP-test, stress, performance index.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	08
CAPÍTULO 1 - Efeito do alagamento sobre a fluorescência da clorofila a e crescimento de híbridos de canola	13
1. Introdução	14
2. Material e Métodos	16
3. Resultados	19
4. Discussão	28
5. Conclusões	31
CAPÍTULO 2 - Efeito das baixas temperaturas sobre a fluorescência da clorofila a de híbridos de canola	32
1. Introdução	33
2. Material e Métodos	35
3. Resultados e Discussão	36
4. Conclusões	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS	46

INTRODUÇÃO

A canola (*Brassica napus* L.) pertence à família das Brassicaceae e constitui-se na terceira oleaginosa mais produzida no mundo, superada apenas pela soja e pela palma (CONAB, 2009). No Brasil, cultiva-se apenas canola da espécie *Brassica napus* L. var *oleifera* que foi desenvolvida por melhoramento genético de colza, planta da espécie *Brassica napus* que apresenta grãos com teores mais elevados de ácido erúico e de glucosinolatos (TOMM, 2007). A área de cultivo de canola no Brasil é de aproximadamente 30 mil hectares sendo estes responsáveis pela produção anual de 37 mil toneladas desta oleaginosa. O Rio Grande do Sul é o maior produtor dos grãos com 23 mil hectares cultivados anualmente (CONAB, 2009).

O cultivo de canola possui grande valor sócio-econômico por oportunizar a produção de óleos vegetais no inverno, possibilitando a expansão desta cultura para utilização como biodiesel, além do uso para consumo humano (TOMM, 2005).

A canola destaca-se como uma excelente alternativa econômica para uso em esquemas de rotação de culturas pela redução do inóculo de doenças causadas por fungos necrotróficos que comprometem o rendimento e a qualidade dos grãos de trigo, a exemplo de *Fusarium graminearum* e *Septoria nodorum*, e de milho, a exemplo da mancha de diplodia (*Stenocarpella macrospora*) e da cercosporiose (*Cercospora zeaemaydis*). Também traz benefícios para as leguminosas, como soja (não é hospedeira de nematóide de cisto da soja - *Heterodera glycines*) e feijão cultivados em sucessão as culturas de inverno, contribuindo assim para a redução das populações em áreas infectadas (TOMM, 2007).

Os grãos de canola produzidos no Brasil apresentam em torno de 40% de óleo, sendo utilizado para várias finalidades: alimentícia, cosmética, farmacêutica, industrial, ração animal, entre outras. O principal uso está na alimentação humana onde o consumo de óleo de canola tem sido indicado por médicos e nutricionistas para atender pessoas interessadas em dietas saudáveis por possuir a melhor

composição de ácidos graxos. O óleo de canola possui o menor teor de gorduras saturadas, apenas 7 %, e ainda apresenta o teor mais elevado (11 %) de ácido alfa-linoléico (um ácido graxo ômega-3) que reduz os riscos de ataques cardíacos e infartos. Apresenta também, em sua constituição, vitamina E (alfatocoferol), a qual atua como antioxidante inativando os radicais livres auxiliando na proteção contra as enfermidades coronárias (MORRIS, 2000). Por essas razões pode-se observar atualmente uma expansão do mercado de óleo de canola no Brasil associada a uma tendência mundial no aumento de consumo deste óleo, a exemplo do verificado nos Estados Unidos, onde esse produto já ocupa 20% do mercado de óleos vegetais.

Além da produção de óleo para consumo humano, a canola também é utilizada para a produção de farelo (34 a 38 % de proteínas) o qual pode ser empregado na formulação de rações para bovinos, suínos, ovinos e aves. Outra utilização do óleo de canola está relacionada à produção de biodiesel.

O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel foi implantado no Brasil a partir da Lei no 11.097, de 13 de janeiro de 2005 (Lei do Biodiesel), que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, segundo a qual, biodiesel é um “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustível de origem fóssil”. Sendo um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis, pode ser obtido por diferentes processos, podendo ser a matéria-prima de origem animal (gordura animal) ou de óleos vegetais.

O Brasil dispõe de uma grande diversidade de espécies vegetais com potencial para a produção de biomassa renovável, destacando-se as oleaginosas das quais se podem extrair óleos para fins energéticos. Dentre as oleaginosas indicadas para extração de óleo está a canola que apresenta um rendimento em torno de 0,5 a 0,9 toneladas de óleo por hectare. Por ser uma espécie anual e apresentar um ciclo de cultivo pequeno, a canola possui grande vantagem em relação a algumas oleaginosas: a possibilidade de cultivo na entre safra do cultivo principal.

O rendimento da canola no Brasil é mais limitado por falhas em aplicar, modificar e ajustar fatores de produção dentro de sistemas integrados de produção do que pelas condições de solo e clima (TOMM, 2007). O crescimento da área de cultivo nas próximas safras para atender o aumento da demanda de óleo de canola,

tanto para consumo humano quanto para utilização na produção de biodiesel, dependerá da geração, transferência e do ajuste de tecnologias às condições de clima e solo sul-brasileiras, através de pesquisas aplicadas para adaptação de técnicas, podendo resultar em retorno rápido a custo relativamente baixo, redução das limitações à elevação da produtividade das lavouras e aumento da segurança de investimentos no cultivo de canola.

Contudo, poucas informações sobre características fotossintéticas relacionadas aos materiais genéticos de canola são encontradas na literatura, principalmente sobre fluorescência da clorofila a, bem como o efeito de estresse sobre a fotossíntese.

Estresse é considerado toda condição estabelecida na qual as forças de um sistema estão fora de seu estado termodinâmico ideal, sendo que este estado ideal ocorre quando um sistema biológico encontra-se em plena harmonia com seu ambiente (STRASSER, 1988). Ainda, segundo Larcher (1987), o estresse pode ser descrito como um estado em que crescentes demandas são feitas sob a planta a fim de levar a uma desestabilização inicial de suas funções, seguida de normalização e aumento de resistência. Se os limites de tolerância forem ultrapassados e a capacidade adaptativa sobrecarregada, podem ocorrer danos permanentes ou mesmo a morte da planta.

Apesar da capacidade de rápida aclimação de fluxos metabólicos e adaptações específicas, bem como do desenvolvimento de mecanismos de tolerância a certos estresses, as plantas são frequentemente expostas a eventos repentinos de estresse a curto ou longo prazo que, eventualmente, reduzem a atividade das células e o crescimento da planta. Isso pode levar a graves danos podendo ocasionar morte celular, se os mecanismos de enfrentamento do estresse ou mecanismos de reparo estiverem sobrecarregados. O estresse em plantas pode ser ocasionado por vários fatores sendo classificado em estresse biótico, ocasionado por organismos vivos (plantas daninhas, patógenos, insetos, etc.) e estresse abiótico, ocasionado por fatores ambientais (déficit hídrico, alagamento, altas e baixas temperaturas, metais pesados, etc.) (LICHTENTHALER, 1996).

Sabe-se que o aparelho fotossintético das plantas é muito sensível a estresses ambientais e mesmo pequenas alterações na sua estrutura e no seu funcionamento podem ser facilmente detectadas através da fluorescência da clorofila a (YUSUF et al., 2010). Esta técnica tem permitido um aumento do

conhecimento dos processos fotoquímicos e não-fotoquímicos que ocorrem na membrana dos tilacóides dos cloroplastos (ROHÁCEK, 2002), além de possibilitar o estudo de características relacionadas à capacidade de absorção e transferência de energia luminosa na cadeia de transporte de elétrons, sendo também possível estudos das mudanças conformacionais dos tilacóides (KRAUSE; WEIS, 1991).

A análise da fluorescência da clorofila constitui-se em um método sensível, eficiente, rápido e não destrutivo capaz de detectar com segurança e confiabilidade efeitos de estresse e injúrias no processo fotossintético (YUSUF et al., 2010). Algumas relações da fluorescência da clorofila *a* são frequentemente utilizadas como indicadores para medir a resposta (grau de tolerância) das plantas aos fatores ambientais, como estresses abióticos (PANDA et al., 2006).

Induções da fluorescência da clorofila podem ser estimadas utilizando-se fluorômetros portáteis apropriados, diferindo nas características de detecção dos sinais de fluorescência (LAZÁR, 2006). De forma geral, a curva de indução da fluorescência é caracterizada por um rápido aumento da fluorescência de um nível basal (F_0) a um nível máximo conhecido como fluorescência máxima (F_M), obtido após incidência de luz branca saturante. Neste aumento da fluorescência ao nível M apenas o FSII está envolvido (LICHTENTHALER et al., 2005). Este processo é referido como fluorescência rápida das clorofilas. Com a gradual fluência dos elétrons em direção ao FSI, através do complexo citocromo *b6f* e da plastocianina, ocorre um gradual declínio de F_M até um nível estável, conhecido como F_S . A subsequente aplicação de flashes de luz saturante permite uma análise mais refinada dos processos de extinção fotoquímicos e não-fotoquímicos da energia de excitação (“quenching”) e caracteriza o que se chama de fluorescência lenta da clorofila (LICHTENTHALER et al., 2005).

O aumento rápido da fluorescência da clorofila até o ponto M (F_M) apresenta-se polifásico e transiente, onde é possível identificar os pontos O, J, I e P (KOUŘIL et al., 2001; LAZÁR, 2006). Esses pontos são obtidos aproximadamente a 50 μ s, 2 ms, 30 ms e 300 ms, respectivamente, após a incidência de luz na amostra. Sua amplitude pode estar diretamente ligada à intensidade e duração do estresse (STRASSER, 1997; JIANG et al., 2006).

Obtidos os dados de intensidade da fluorescência, estes podem ser analisados através do Teste JIP desenvolvido por Strasser e Strasser (1995). O uso correto dos parâmetros matemáticos propostos pelo Teste JIP permite quantificar o

fluxo de energia absorvido e aproveitado no sistema fotossintético, podendo também avaliar o desempenho fotossintético de plantas (TSIMILLI-MICHAEL; STRASSER, 2008). O Teste JIP é altamente adequado para investigações *in vivo* do comportamento do aparato fotossintético, uma vez que a forma da fluorescência transiente OJIP é sensível a estresses ocasionados por alterações em muitas condições ambientais (TSIMILLI-MICHAEL et al., 1999; STRAUSS et al., 2006).

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do alagamento e das baixas temperaturas sobre a cinética de emissão da fluorescência transiente da clorofila *a* visando a validação dessa metodologia como indicadora destes estresses em plantas de canola.

CAPÍTULO 1

EFEITO DO ALAGAMENTO SOBRE A FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* E CRESCIMENTO DE HÍBRIDOS DE CANOLA

*Effect of flooding on chlorophyll *a* fluorescence and growth of canola hybrids*

RESUMO - O alagamento do solo pode promover alterações no metabolismo celular e prejudicar o crescimento das plantas, gerando uma condição de estresse. Efeitos do alagamento do solo na fluorescência da clorofila *a*, teor de clorofila e crescimento de plantas de diferentes híbridos de canola (*Brassica napus* L.) foram estudados em condições de casa de vegetação. Aos 45 dias após semeadura as plantas foram submetidas ao alagamento por um período de seis dias. Observou-se que o alagamento não interferiu nos teores de clorofila das plantas, porém, promoveu a redução da área foliar, massa seca de raízes e relação massa seca de raiz/massa seca parte aérea de todos híbridos estudados. Em relação a fluorescência da clorofila não foram identificadas diferenças nos parâmetros que descrevem rendimento ao contrário dos parâmetros relacionados aos fluxos específicos que sofreram variação em função do estresse sendo esta mais acentuada para Hyola 432. Os índices de performance fotossintéticos ($PI_{ABS, total}$ e PI_{ABS}) apresentaram decréscimo ao final de 6 dias de experimento exceto para o híbrido Hyola 420. A análise da cinética da fluorescência transiente da clorofila *a* mostrou efeitos diferenciais da aplicação do estresse nos diferentes locais da maquinaria fotossintética, sendo que estes efeitos foram menos pronunciados nas plantas do híbrido Hyola 420. Baseado nestes resultados pode-se concluir que as plantas do híbrido Hyola 420 foram menos afetadas pelas condições de inundação demonstrando que tal híbrido pode ser considerado menos sensível ao estresse por alagamento em relação aos demais híbridos testados.

Palavras-chave: *Brassica napus*, Teste JIP, alagamento, estresse, índice de performance.

ABSTRACT - By generating stress conditions soil flooding can induce alterations in the cell metabolism and thus is detrimental to plant growth. This study was done under the green house conditions to determine the effect of soil flooding on the chlorophyll fluorescence, chlorophyll content, and plant growth of some hybrids of

canola (*Brassica napus* L.). Fifty five days old plants were subjected to flooding for six days. Although the flooding did not affect total chlorophyll content, the leaf area, root dry mass and the root and shoot dry mass ratio declined in all hybrids. There was no difference in the parameters chlorophyll fluorescence that could describe the yield, in contrast to the parameters related to the specific energy flux that varied due to flooding stress. The variation was more pronounced in hybrid Hyola 432. At the end of the six days, the performance indexes ($PI_{ABS, total}$ and PI_{ABS}) decreased, in all hybrids except in Hyola 420. The difference kinetics of the chlorophyll a fluorescence transient showed different effects on different sites of the photosynthetic machinery, which were more pronounced in the plants of Hyola 420. It could be concluded that compared to the other hybrids, Hyola 420 was less sensitive to flooding.

Keywords: *Brassica napus*, JIP-test, flooding, stress, performance index.

1. INTRODUÇÃO

Embora todas as plantas superiores necessitem de água, seu excesso nas raízes pode causar injúrias ou até ser letal devido ao bloqueio da transferência do oxigênio e outros gases entre o solo e a atmosfera. Durante o alagamento as plantas são expostas a redução do fornecimento de oxigênio por causa da lenta taxa de difusão de oxigênio na água e sua limitada solubilidade (SAIRAM et al., 2008). Uma das principais estratégias para melhorar a produtividade das culturas é a compreensão dos processos fisiológicos, bioquímicos e genéticos que são alterados por determinado tipo de estresse, de forma a permitir o desenvolvimento de genótipos altamente produtivos nestas condições ambientais desfavoráveis.

O alagamento do solo é um estresse ambiental comum em áreas propensas ao transbordamento de rios, elevada pluviosidade, drenagem deficiente e flutuações elevadas do lençol freático (KOZLOWSKI, 1997; MIELKE; SCHAFFERB, 2010). Nas plantas, as mudanças físico-químicas do solo, induzidas pelo alagamento, afetam vários aspectos da fisiologia, morfologia e anatomia, dependendo da espécie (KOZLOWSKI, 1997; MIELKE et al., 2003). Os principais efeitos adversos provocados pelo alagamento são a inibição da germinação de sementes, diminuição do volume de raízes e do crescimento da parte aérea, senescência foliar prematura e mortalidade da planta (PEZESHKI, 2001). Além disso, a diminuição da disponibilidade de O_2 no solo influencia a sobrevivência, o crescimento e a produtividade das plantas terrestres (PEZESHKI, 2001), resultando em alterações nas trocas gasosas foliares, na absorção de nutrientes minerais, no balanço

hormonal (KOZLOWSKI et al., 1991), na translocação de fotoassimilados e na produção de biomassa (PEZESHKI, 2001), entre outras respostas morfofisiológicas.

O crescimento dos vegetais é diretamente relacionado, entre outros fatores, com o processo fotossintético, o qual é caracterizado pela absorção da energia luminosa pelos fotossistemas e redução do CO_2 . O fotossistema II (FSII) é o componente mais sensível do aparato fotossintético e pode ser temporariamente afetado por estresses ambientais antes que qualquer dano estrutural irreversível possa tornar-se aparente (FORCE et al., 2003; PANDA et al., 2008).

A análise da fluorescência da clorofila tem-se revelado um método sensível, eficiente, rápido e não invasivo (YUSUF et al., 2010) para a detecção e quantificação das alterações induzidas no aparato fotossintético, principalmente no FSII (MEHTA et al., 2010). Sinais da fluorescência da clorofila *a* têm sido amplamente utilizados para a avaliação de vários efeitos ambientais sobre o metabolismo fotossintético (FORCE et al., 2003). Algumas relações da fluorescência da clorofila *a* são frequentemente utilizadas como indicadores para medir a resposta (grau de tolerância) das plantas aos fatores ambientais, como os estresses abióticos (PANDA et al., 2006). A intensidade da fluorescência da clorofila de organismos fotossintéticos adaptados ao escuro segue uma variação característica com o tempo após o início da iluminação. Esse efeito é conhecido como "efeito Kautsky". Na curva de indução de fluorescência, na intensidade mínima (F_0) todos os centros de reação estão abertos e na máxima (F_M) todos os centros de reação estão fechados. Todos os materiais fotossintéticos oxigênicos investigados até o momento mostram um aumento transiente da fluorescência constituído de uma sequência de fases, destacando as fases OJ e IP (STRASSER et al., 2000).

Obtidos os dados de fluorescência, estes podem ser analisados através do Teste JIP desenvolvido por Strasser e Strasser (1995). O Teste JIP é uma análise multiparamétrica do rápido aumento da fluorescência OJIP, o qual permite obter informações sobre os parâmetros estruturais e funcionais, que quantificam a performance e atividade do aparato fotossintético (YUSUF et al., 2010). Além disso, o Teste JIP tem sido amplamente utilizado para a avaliação do impacto dos diferentes tipos de estresses nas plantas, tais como, elevada luminosidade, temperaturas baixas ou altas, ozônio, seca, salinidade e metais pesados como citado por Yusuf et al. (2010).

O decréscimo na produção de energia fotoquímica, em consequência do alagamento do solo pode afetar a eficiência fotossintética, em virtude de distúrbios causados na raiz ou diretamente na parte aérea, e dos danos que ocorrem nas estruturas responsáveis pela fase fotoquímica da fotossíntese (ALLEN et al., 1996). Desta forma, ocorre a diminuição das reações ao nível dos cloroplastídeos como consequência da redução no fornecimento de energia gerada pelo FSII para os processos fotossintéticos subsequentes. Os danos também podem ser exteriorizados pela redução nos teores de clorofilas resultante da degradação e, ou decréscimo de sua síntese, como constatado em folhas de algumas espécies submetidas a diferentes níveis de alagamento (PEZESHKI et al., 1996). Outra resposta das plantas submetidas ao alagamento consiste na redução imediata do crescimento, podendo chegar a níveis de danos que impedem a retomada do mesmo após a drenagem.

A canola (*Brassica napus* L.) pertence à família das Brassicaceae e constitui-se na terceira oleaginosa mais produzida no mundo, superada apenas pela soja e pela palma (CONAB, 2009). A área de cultivo da canola no Brasil é de aproximadamente 30 mil hectares sendo estes responsáveis pela produção anual de 37 mil toneladas desta oleaginosa. O Rio Grande do Sul é o maior produtor do grão com 23 mil hectares cultivados anualmente (CONAB, 2009).

O trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do alagamento sobre o funcionamento do aparato fotossintético e crescimento de diferentes híbridos de canola.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes dos híbridos de canola Hyola 43, Hyola 401, Hyola 420 e Hyola 432, fornecidas pela empresa Celena Alimentos S/A, cujas características são apresentadas na Tabela 1. As sementes dos híbridos foram semeadas em vasos plásticos com capacidade de 0,5 L contendo areia lavada em água corrente como substrato e mantidas em casa de vegetação. Após a emergência, considerada como 50% das plântulas emergidas, foi realizado o desbaste deixando apenas uma planta por vaso. Sete dias após a emergência iniciou-se a aplicação de solução nutritiva Hoagland e Arnon (1950), pH ajustado para 6,0-6,5, a qual foi repetida a cada dois dias. A irrigação foi realizada

diariamente para repor a quantidade de água perdida acrescentando-se a quantidade necessária para umedecer totalmente o substrato. Aos 45 dias após a semeadura os vasos foram divididos em dois lotes: um lote que continuou recebendo as mesmas condições de suprimento de água, denominado controle; e outro lote o qual foi submetido ao estresse por alagamento, que consistiu na aplicação de uma lâmina de água de 2 a 3 centímetros acima do nível do solo por um período de seis dias. No primeiro, segundo, quarto e sexto dia após indução do estresse foram realizadas as determinações de índice de clorofila e fluorescência da clorofila *a*. No sexto dia foram determinadas a área foliar e a massa seca das partes das plantas.

Tabela 1. Características gerais dos híbridos de canola.

Características	Hyola 43	Hyola 401	Hyola 420	Hyola 432
Início da floração (dias)	53 a 77	44 a 74	64 a 70	47 a 73
Duração da floração (dias)	28 a 52	19 a 33	20 a 47	29 a 50
Período da emergência até a colheita (dias)	123 a 155	107 a 135	116 a 150	119 a 134
Altura das plantas (cm)	78 a 129	86 a 126	116 a 130	89 a 124
Suscetibilidade a canela preta*	resistente	suscetível	suscetível	resistente

*doença fúngica de maior importância para a cultura da canola.

Os teores de clorofila foram estimados nas folhas selecionadas para as determinações dos parâmetros de fluorescência utilizando-se um medidor portátil de clorofila CL-01 (Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK), e expressos em índice de clorofila.

A fluorescência transiente polifásica (OJIP) da clorofila *a* foi medida nas primeiras folhas jovens completamente expandidas, à temperatura ambiente, utilizando um fluorômetro portátil (Modelo Handy PEA, Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK). As medidas foram realizadas no período da manhã, entre as 8 e 9 horas, em folhas previamente adaptadas ao escuro por 20 minutos para oxidação completa do sistema fotossintético de transporte de elétrons. A emissão de fluorescência foi induzida em uma área de 4 mm de diâmetro da folha pela exposição da amostra a um pulso de luz saturante numa intensidade de $3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As intensidades de fluorescência foram determinadas a 50, 100, 300 μs , 2 (F_J) e 30 (F_I) ms e F_M (fluorescência máxima). A partir das intensidades de

fluorescência foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER; STRASSER, 1995).

Os parâmetros da fluorescência modulada das clorofilas em estado adaptado à luz foram medidos utilizando um fluorômetro modulado portátil (Modelo FMS2, Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, Norfolk, UK). As medidas foram realizadas no período da manhã, à temperatura ambiente, nas mesmas folhas em que foram feitas as determinações da fluorescência OJIP. Foram medidos os parâmetros: intensidade de fluorescência no equilíbrio (steady-state) (F_S), definida como sendo a intensidade de fluorescência quando os processos de transporte de elétrons acoplados às reações bioquímicas de redução do carbono estão equilibrados; fluorescência máxima em estado adaptado à luz (F_M'), obtida após a aplicação de um flash saturante de luz e fluorescência inicial em estado adaptado à luz (F_0'). A partir desses parâmetros foram calculados o rendimento quântico fotoquímico máximo em estado adaptado a luz (F_V'/F_M') e o rendimento quântico fotoquímico atual em estado adaptado a luz [$\phi_{PS2} = (F_M' - F_S')/F_M'$].

Para avaliar o efeito do alagamento sobre os parâmetros de crescimento foram medidas a área foliar (AF) e biomassa de folhas, caules, pecíolos e raízes ao final do experimento. A área foliar foi estimada utilizando um medidor de área foliar (Modelo LI-3100 Li-Cor Inc., Lincoln, NE). A massa seca foi obtida pela pesagem do material vegetal, após secagem em estufa com circulação de ar forçada, a 70°C por um período de pelo menos 72h.

Os parâmetros de crescimento medidos aos seis dias de alagamento foram avaliados para cada híbrido comparando-se as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, sendo cada tratamento composto por dez repetições. O índice de clorofila e os parâmetros de fluorescência modulada foram avaliados como um experimento com delineamento inteiramente ao acaso no esquema fatorial 4 x 2 x 5, sendo quatro híbridos, dois regimes hídricos e cinco coletas. Após análise de variância as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% com dez repetições por tratamento.

3. RESULTADOS

3.1. Análise dos teores de pigmentos cloroplastídicos

O efeito do alagamento sobre os teores de clorofila de diferentes híbridos de *Brassica napus* é apresentado na Figura 1. Os teores de clorofila diferiram entre os híbridos de canola antes da indução do alagamento. As plantas do híbrido Hyola 43 apresentaram maior índice de clorofila (11,31), enquanto as plantas do híbrido Hyola 432 o menor (7,83). Para os híbridos Hyola 43, Hyola 420 e Hyola 432 não foram observadas variações nos índices de clorofila durante o transcorrer do experimento para nenhum dos dois tratamentos. Porém, para as plantas dos híbridos Hyola 401 observou-se um incremento significativo nos índices de clorofila em ambos os tratamentos a partir do segundo dia após o alagamento (Figura 1B).

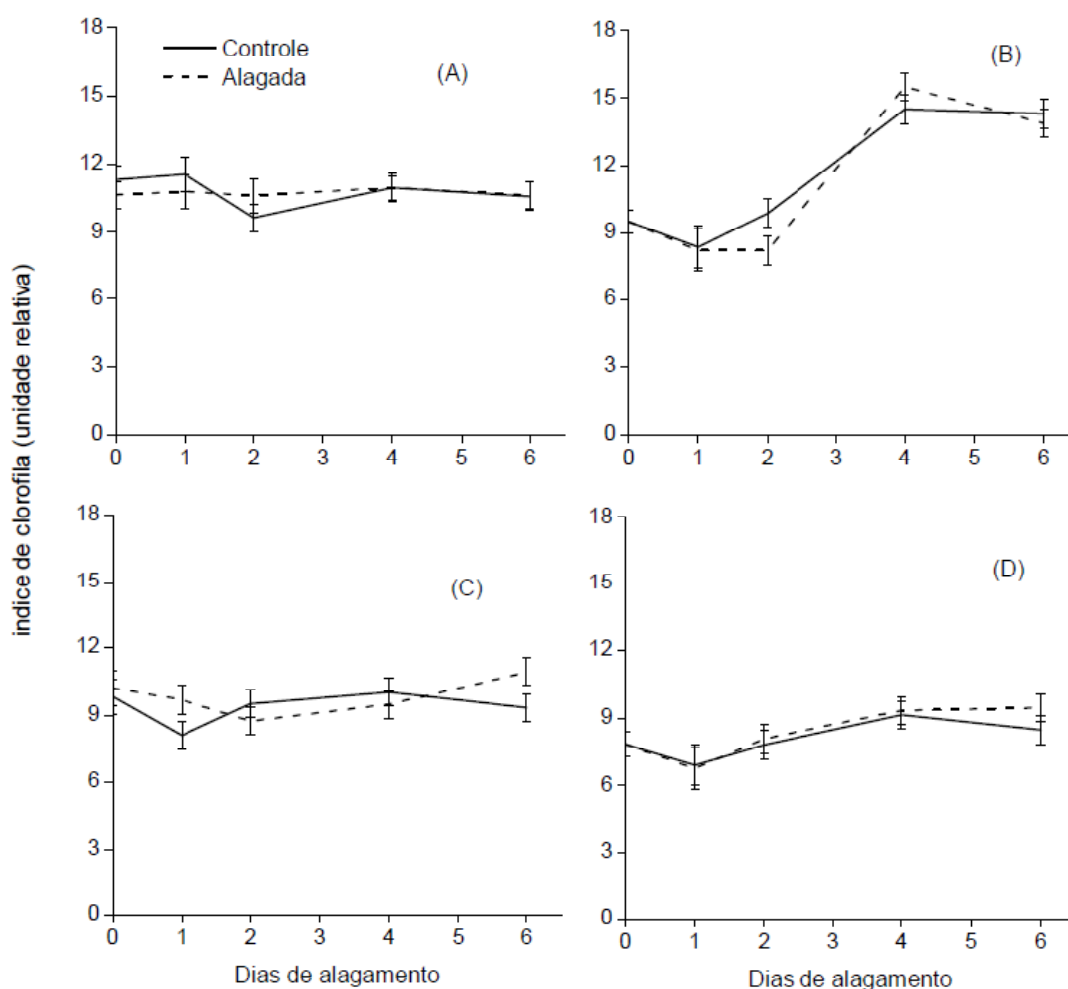


Figura 1. Teor de clorofila, expresso em índice de clorofila (unidade absoluta) de plantas de híbridos de canola (*Brassica napus* L.), (A) Hyola 43; (B) Hyola 401; (C) Hyola 420 e (D) Hyola 432, submetidos a dois regimes hídricos (controle e alagado) em função dos dias após o início do alagamento.

3.2. Análise da fluorescência transiente da clorofila a (OJIP)

O aumento da fluorescência transiente OJIP é uma medida direta do comportamento fotossintético do FSII, e permite a obtenção de uma série de informações de diferenças fisiológicas entre os híbridos e sobre o efeito do alagamento em plantas de canola. Alguns parâmetros do Teste JIP (STRASSER; STRASSER, 1995) estão apresentados na Figura 2, obtidos nos dias 0, 1, 2, 4 e 6 após o início do alagamento e representados na forma de gráfico de radar, no qual os valores dos parâmetros de fluorescência foram normalizados para os valores medidos no tratamento controle, isto é, onde as plantas não estiveram submetidas ao alagamento.

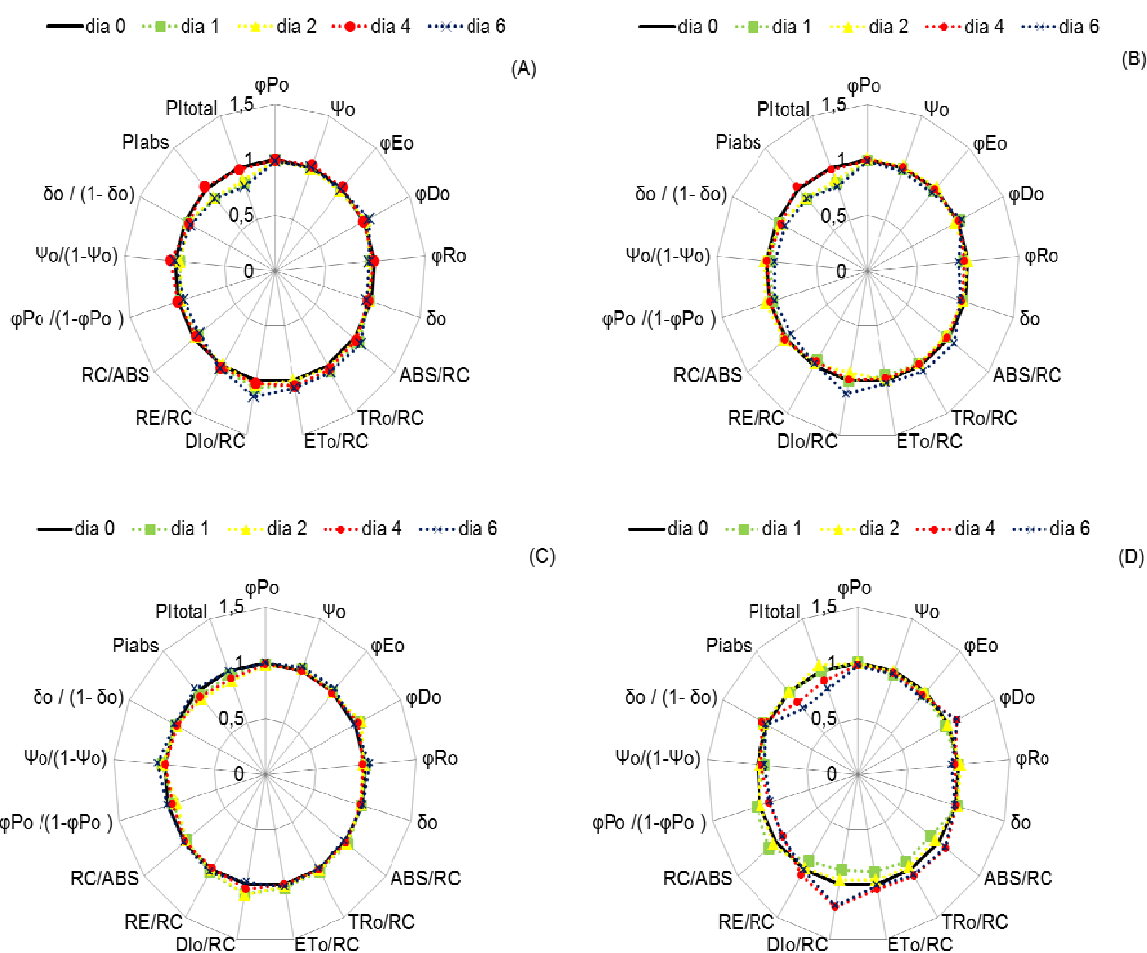


Figura 2. Parâmetros fotossintéticos deduzidos de análise por Teste JIP da fluorescência transiente de plantas de híbridos de canola (*Brassica napus* L.), (A) Hyola 43; (B) Hyola 401; (C) Hyola 420 e (D) Hyola 432, submetidos a dois regimes hídricos (controle e alagado) em função dos dias após o início do alagamento.

Não foram identificadas diferenças nos parâmetros que descrevem o rendimento ou razão de fluxo isto é: a) ϕ_{P0} - rendimento quântico máximo fotoquímico primário no tempo $t = 0$; b) Ψ_0 - probabilidade (em $t = 0$) que um exciton capturado no centro de reação mova um elétron na cadeia de transporte de elétrons além de Q_A^- ; c) ϕ_{E0} - rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons; d) ϕ_{D0} - rendimento quântico em $t = 0$ para a dissipação de energia; e) ϕ_{R0} - rendimento quântico para a redução do acceptor final de elétrons do FSI por fóton absorvido; f) δ_0 - eficiência com que um elétron pode mover do intersistema de aceptores de elétrons para o acceptor final de elétrons do FSI.

Em relação aos fluxos específicos por centro de reação (RC) pode ser destacado uma variação na resposta dependente do híbrido e do tempo de alagamento. Para as plantas dos híbridos Hyola 43 e 420, pouca variação foi observada nestes parâmetros. Já, para as plantas do híbrido Hyola 432, foi observado logo no primeiro dia de alagamento, um decréscimo: a) na razão ABS/RC - fluxo de absorção por centro de reação, que indica o tamanho aparente do sistema antena do FSII, isto é, a quantidade de clorofila absorvedora por centro de reação completamente ativo (reduzidor de Q_A); b) na razão TR_0/RC - fluxo de energia capturado por centro de reação em $t = 0$; c) na razão ET_0/RC - fluxo de transporte de elétrons por centro de reação em $t = 0$; d) na razão DI_0/RC - fluxo de energia dissipada por centro de reação em $t = 0$; e) na razão RE/RC - redução do acceptor final de elétrons do FSI por centro de reação em $t = 0$ (Figura 2), fato este não verificado para os demais híbridos. Contudo, a partir do 4º dia após o alagamento, para as plantas do híbrido Hyola 432 e do 6º dia para o híbrido Hyola 401, foi identificada uma elevação nos parâmetros de fluxo específico, sendo mais acentuada para a razão DI_0/RC , em especial para Hyola 432.

O índice de performance fotossintético (PI_{ABS}) é uma combinação de três componentes parciais, que descrevem: a) a quantidade de centro de reação fotossintético (RC/ABS); b) o fluxo máximo de energia que atinge o centro de reação do FSII [$\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$]; e c) o transporte de elétrons no início da iluminação [$\Psi_0/(1-\Psi_0)$], conforme equação abaixo:

$$PI_{ABS} = \frac{RC}{ABS} \times \left(\frac{\phi_{P0}}{1 - \phi_{P0}} \right) \times \left(\frac{\Psi_0}{1 - \Psi_0} \right) = \frac{RC}{ABS} \times \frac{TR_0}{DI_0} \times \frac{ET_0}{1 - ET_0}$$

Porém, Tsimilli-Michael e Strasser (2008), introduziram mais um componente nesta fórmula que descreve as reações de oxi-redução que ocorrem no lado aceptor de elétrons do fotossistema I (FSI), propondo o termo índice de performance total ($PI_{ABS,total}$) o qual é descrito pela fórmula:

$$PI_{ABS,total} = PI_{ABS} \times \left(\frac{\delta_0}{1 - \delta_0} \right)$$

O índice de performance fotossintético (PI_{ABS}) (STRASSER et al., 1999, 2000, 2004) e o índice de performance total ($PI_{ABS,total}$), que mede a performance até os aceptores finais de elétrons do FSI (TSIMILLI-MICHAEL; STRASSER, 2008) não apresentaram grande variação em função dos dias após o início do alagamento para as plantas do híbrido Hyola 420. Contudo, as plantas dos híbridos Hyola 43 e Hyola 401 apresentaram comportamento semelhante, isto é, um decréscimo em relação ao controle no 1°, 2° e 6° dias após o início do alagamento e no 4° dia após o início do alagamento, valores semelhantes aos medidos para o tratamento controle. Entretanto, para as plantas do híbrido Hyola 432 os valores de PI_{ABS} e $PI_{ABS,total}$ diminuíram a partir do 4° dia após o início do alagamento.

Na Figura 2 estão representados todos os componentes dos dois índices de performance, na qual observa-se que existe uma diferença entre os híbridos, principalmente aos seis dias após o início do alagamento, nos componentes que mais influenciam os valores de ambos os PI, devendo ser destacado que para o híbrido Hyola 401 todos os componentes tem participação no decréscimo do $PI_{ABS,total}$, enquanto para as plantas do híbrido Hyola 432 o fator que descreve as reações de oxi-redução do FSI não afetaram o $PI_{ABS,total}$.

3.3. Análise de cinética da fluorescência transiente (OJIP)

A fluorescência variável transiente ($W_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$) da clorofila a das folhas adaptadas ao escuro de híbridos de canola é mostrada, em escala logarítmica de tempo de 50µs até 1s, na Figura 3A. Todas as curvas apresentam uma forma OJIP típica (STRASSER et al., 1999, 2000, 2004) com uma fluorescência variável máxima demonstrando que todos os tratamentos estavam fotosinteticamente ativos (YUSUF et al., 2010). Para melhor avaliação das diferenças entre os híbridos, empregaram-se normalizações adicionais e subtrações correspondentes, o que permite o estudo de diferença das cinéticas revelando bandas que estão ocultas entre os pontos O, J, I e P.

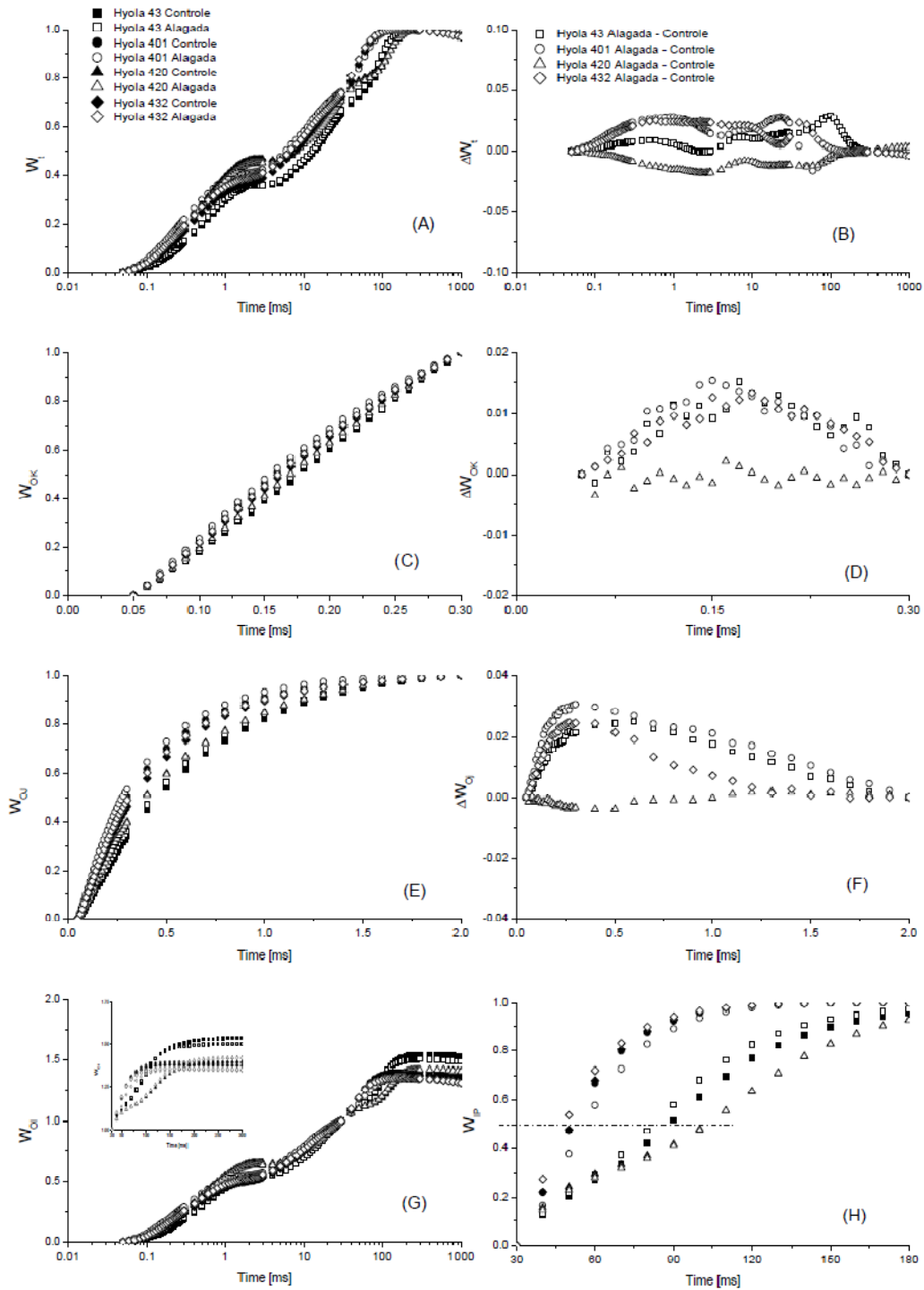


Figura 3. Fluorescência transiente da clorofila *a* de folhas adaptadas ao escuro em diferentes híbridos de canola (*Brassica napus* L.). (A) fluorescência variável relativa [$W_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$]; (B) diferença cinética de W_t [$\Delta W_t = (W_{t \text{ alagada}} - W_{t \text{ controle}})$]; (C) fluorescência variável entre os pontos O e K [$W_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$]; (D) diferença cinética de W_{OK} [$\Delta W_{OK} = W_{OK \text{ alagada}} - W_{OK \text{ controle}}$]; (E) fluorescência variável entre os pontos O e J [$W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$]; (F) diferença cinética de W_{OJ} [$\Delta W_{OJ} = (W_{OJ \text{ alagada}} - W_{OJ \text{ controle}})$]; (G) fluorescência variável entre os pontos O e I [$W_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$]; (H) fluorescência variável entre os pontos I e P [$W_{IP} = (F_t - F_I)/(F_P - F_I)$].

Na Figura 3B é apresentada a diferença das fluorescências variáveis entre as plantas alagadas e o controle [$\Delta W_t = (W_{t \text{ alagada}} - W_{t \text{ controle}})$] na qual se observa o efeito do alagamento sobre a fluorescência variável transiente no tempo entre 50 μ s e 1s, podendo ser identificadas as diferentes bandas L, K e P. As diferenças entre os tratamentos são mostradas nas Figuras 3C e 3D, onde os dados de fluorescência foram normalizados entre os pontos O (50 μ s) e K (300 μ s) e apresentaram como fluorescência variável relativa $W_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$ em escala linear entre estes dois tempos (Figura 3C) e como diferença cinética $\Delta W_{OK} = W_{OK \text{ alagada}} - W_{OK \text{ controle}}$ (Figura 3D). Foi possível observar pela cinética a presença da banda L positiva (aproximadamente em 150 μ s) nas plantas dos híbridos Hyola 43, Hyola 401 e Hyola 432 o que significa uma diminuição da conectividade energética entre as unidades do FSII.

A presença da banda L, descrita por Strasser e Stirbet et al. (1998), é um indicador da conectividade energética ou do grau de agrupamento das unidades do FSII, sendo mais alta quando a conectividade é menor. Contudo, quanto menor a conectividade, menor a utilização da energia de excitação e menor a estabilidade do sistema (STRASSER et al., 2004). Assim, pode-se inferir que as plantas do híbrido Hyola 420 não sofreram perda desta conectividade quando submetidas a alagamento.

Na Figura 3E a fluorescência transiente foi normalizada entre os pontos O (50 μ s) e J (2ms), como $W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$, e na Figura 3F como diferença cinética $\Delta W_{OJ} = W_{OJ \text{ alagada}} - W_{OJ \text{ controle}}$, na faixa de tempo de 50 μ s a 2 ms (escala linear), na qual é identificada a banda K positiva (ao redor de 300 μ s) para as plantas dos híbridos Hyola 43, Hyola 401 e Hyola 432. Quando a banda K é positiva, reflete uma inativação do complexo de evolução de oxigênio e/ou um aumento do tamanho da antena funcional do FSII (YUSUF et al., 2010). Assim pode-se inferir que as plantas do híbrido Hyola 420 não sofreram inativação do complexo de evolução de oxigênio.

Para avaliar a fase O-I os valores de fluorescência da clorofila foram normalizados como $W_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$, sendo que esta normalização permite, quando $W_{OI} < 1$, avaliar a sequência de eventos que ocorre da captura do éxciton pelo FSII até a redução da plastoquinona. No presente experimento não se observa diferenças marcantes na fase O-I entre os tratamentos (Figura 3G). Para avaliação da fase I-P dois diferentes procedimentos foram utilizados: a) normalização das curvas $W_{OI} \geq 1$ (gráfico inserido na Figura 3G) que permite avaliar a sequência de

eventos de transferência de elétrons da plastoquinona reduzida (plastoquinol - PQH₂) para os aceptores finais de elétrons do FSI; e b) dados normalizados como $W_{IP} = (F_t - F_i)/(F_P - F_i)$ (Figura 3H) em escala linear entre 30 e 180 ms. Em ambas as figuras, podem-se identificar diferenças apenas entre os híbridos, não sendo possível evidenciar efeito do estresse por alagamento nas plantas. A máxima amplitude do aumento da fluorescência na fase I-P identificada na Figura 3G, reflete o tamanho do pool de aceptores finais de elétrons do lado acceptor do FSI (YUSUF et al., 2010). Desta forma pode-se observar que as plantas do híbrido Hyola 43, independente do estresse por alagamento, apresentaram um maior pool de aceptores finais de elétrons do lado acceptor do FSI (Figura 3G). Na Figura 3H (W_{IP}), a normalização permite que a amplitude máxima aumente para o valor unitário, possibilitando a fácil comparação das constantes globais de taxas de redução do pool de aceptores finais de elétrons do FSI. Neste gráfico quando $W_{IP} = 0,5$ (linha tracejada) é definida a meia-vida, e conforme citado por Yusuf et al. (2010) o inverso da meia vida é a constante global de redução do pool de aceptores finais de elétrons do FSI. Assim pode-se identificar que os híbridos Hyola 43 e Hyola 420 apresentaram menor constante de taxa global de redução dos aceptores finais do FSI.

3.4. Análise da fluorescência modulada da clorofila a em estado adaptado a luz

Para as plantas do híbrido Hyola 43 o valor da relação F_V'/F_M' (rendimento quântico fotoquímico máximo em estado adaptado a luz) sofreu decréscimo entre o 1º e o 2º dia após alagamento seguido de uma elevação ao quarto dia e uma queda significativa ao final de seis dias de experimento (Figura 4A). Quanto ao híbrido Hyola 401 observa-se uma pequena diminuição na relação F_V'/F_M' nas plantas que sofreram alagamento, enquanto que nas plantas controle os valores foram praticamente constantes (Figura 4B). Para o híbrido Hyola 420 identificou-se um incremento no rendimento quântico fotoquímico, para ambos os tratamentos, durante o transcorrer do experimento, sendo que para as plantas de Hyola 432 (Figura 4D) foi verificado o inverso, sendo observado um incremento aos seis dias após o alagamento. As plantas do híbrido Hyola 420 apresentaram menor rendimento quântico fotoquímico máximo (F_V'/F_M') em relação aos demais híbridos testados antes do início do experimento (Figura 4C).

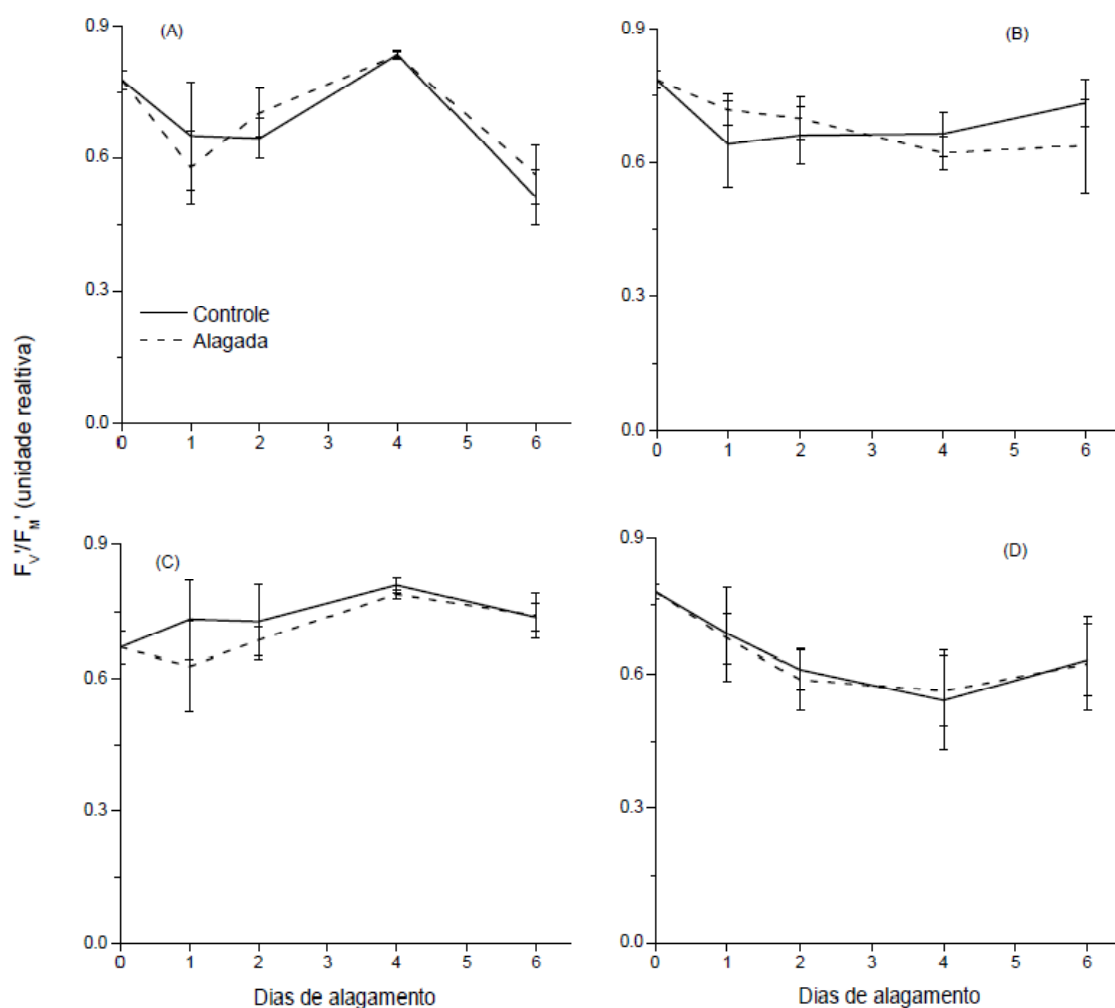


Figura 4. Rendimento quântico fotoquímico máximo (F_v/F_m') (unidade absoluta) de plantas de híbridos de canola (*Brassica napus* L.), (A) Hyola 43; (B) Hyola 401; (C) Hyola 420 e (D) Hyola 432, submetidos a dois regimes hídricos (controle e alagado) em função dos dias após o alagamento.

Outro parâmetro da cinética de fluorescência modulada é o rendimento quântico fotoquímico atual em estado adaptado a luz (ϕ_{PS2}) obtido quando as folhas estão sob luminosidade, ou seja, quando o processo fotossintético está efetivo, sendo este parâmetro extremamente útil porque representa o rendimento quântico atual das folhas indicando a fração de luz absorvida pela clorofila associada com atividade do FSII e utilizada nos processos fotoquímicos. Na Figura 5, observa-se que ϕ_{PS2} apresentou comportamento semelhante ao rendimento quântico fotoquímico máximo do FSII (Figura 4), para todos os híbridos e tratamentos.

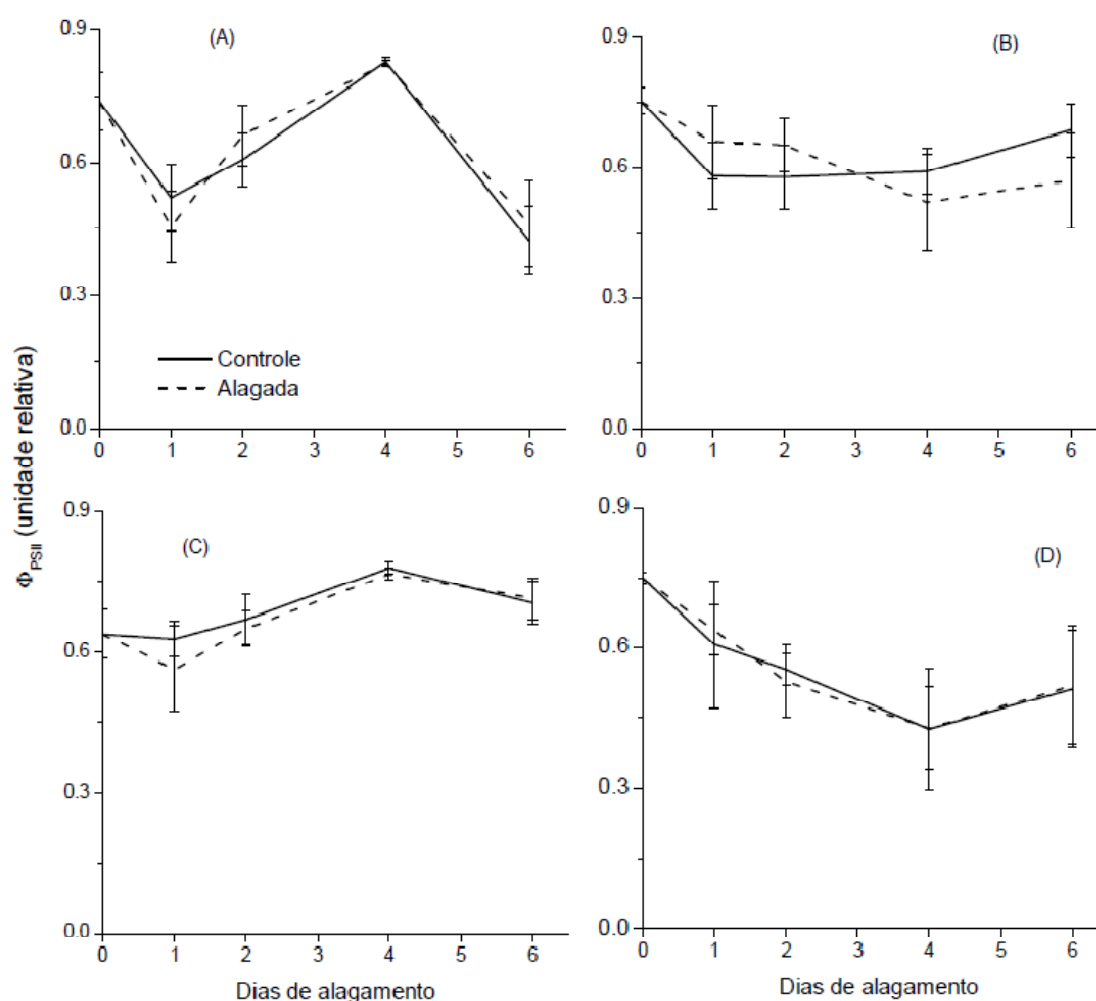


Figura 5. Rendimento quântico fotoquímico atual em estado adaptado a luz (Φ_{PSII}) (unidade absoluta) de plantas de híbridos de canola, (A) Hyola 43; (B) Hyola 401; (C) Hyola 420 e (D) Hyola 432, submetidos a dois regimes hídricos (controle e alagado) em função dos dias após o alagamento.

3.5. Análise de parâmetros de crescimento - área foliar e massa seca

Para todos os híbridos estudados foram observadas reduções significativas na área foliar, na massa seca de raízes e na relação massa seca raiz/parte aérea quando comparadas as plantas alagadas por seis dias com as plantas controle (Tabela 2). As plantas de Hyola 432 apresentaram a maior redução da área foliar (32,4%) em relação ao controle, enquanto que os demais híbridos apresentaram redução variando de 14 a 20%. Em relação à massa seca total, as plantas dos híbridos Hyola 43 e Hyola 420 não foram influenciadas pelo alagamento, porém as demais apresentaram uma redução significativa variando de 30% para Hyola 401 e 21% para Hyola 432 quando alagadas. A massa seca das folhas apresentou redução com o alagamento somente para o híbrido Hyola 401, enquanto a massa seca do caule mais pecíolo não foi afetada pelo alagamento. Entretanto, em todos

os híbridos houve uma redução na relação entre a massa seca da raiz/parte aérea sendo mais acentuada para os híbridos Hyola 43 e 432.

Tabela 2. Variáveis de crescimento, medidas aos seis dias de alagamento, de plantas de híbridos de canola (*Brassica napus* L.) submetidos a diferentes regimes hídricos (sem alagamento/controle e alagados por seis dias).

Parâmetros	Híbridos							
	Hyola 43		Hyola 401		Hyola 420		Hyola 432	
	Contr.	Alagad.	Contr.	Alagad.	Contr.	Alagad.	Contr.	Alagad.
Área foliar (cm ² planta ⁻¹)	149,1*	127,4	172,5*	136,6	181,2*	149,6	174,2*	117,8
Massa seca total (g planta ⁻¹)	1,677 ^{ns}	1,443	1,821*	1,282	1,840 ^{ns}	1,725	1,600*	1,263
Massa seca folha (g planta ⁻¹)	0,572 ^{ns}	0,512	0,805*	0,613	0,835 ^{ns}	0,813	0,555 ^{ns}	0,463
Massa seca caule+pecíolo (g planta ⁻¹)	0,560 ^{ns}	0,586	0,572 ^{ns}	0,428	0,575 ^{ns}	0,591	0,634 ^{ns}	0,541
Massa seca raiz (g planta ⁻¹)	0,545*	0,345	0,444*	0,241	0,430*	0,321	0,412*	0,259
Relação massa seca raiz/parte aérea	0,480*	0,310	0,325*	0,233	0,303*	0,229	0,382*	0,260

* indica diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo teste Tukey entre as médias dentro de cada variável analisada dentro de cada híbrido. ns - diferenças não significativas. Média de 10 repetições.

4. DISCUSSÃO

O efeito adverso do alagamento sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas pode estar associado a diversos fatores intrínsecos que atuam de forma independente ou simultânea. Estas interações podem estar ligadas, por exemplo, ao efeito concomitante da baixa concentração de O₂ e alta de CO₂ nas raízes, e a produção acentuada de etileno (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008), fatores estes que afetam diretamente o desenvolvimento das raízes e da parte aérea. Contudo, muitas espécies tem a capacidade de suportar estas condições e até sobreviver a condições extremas de alagamento (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008), sendo

que há uma forte variação intraespecífica desta resposta. Em algumas espécies pode ser visualizada a formação de um sistema interconectado de condutores de gases chamados aerênquimas, com baixa resistência à difusão de gases (EVANS, 2004), ou mesmo o desenvolvimento de raízes adventícias, que minimizam a deficiência de oxigênio no sistema radicular, fato este observado nos tratamentos que sofreram alagamento, assim pode-se supor que o desenvolvimento das raízes adventícias permitiu o suprimento parcial de O_2 para as raízes.

Durante o alagamento, a redução do O_2 (aceptor final de elétrons na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial) regula a redução da razão ATP:ADP e da carga energética de adenilatos (GIBBS; GREENWAY, 2003), gerando uma queda na glicólise e uma intensificação da fermentação para gerar ATP e regenerar NAD^+ , porém como consequência geral há a formação de espécies reativas de oxigênio (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008).

A área foliar, determinada aos seis dias após o início do alagamento, foi reduzida em todos os híbridos de canola, contudo com graus de redução diferenciais entre os híbridos. A redução da área foliar é amplamente observada na literatura quando as plantas são submetidas ao alagamento (GARDINER; KRAUSS, 2001; ARBONA et al., 2009). Em relação à massa seca total das plantas somente Hyola 401 e Hyola 432 foram afetados corroborando resultados encontrados por Issarakraisila et al. (2007) os quais verificaram redução da massa seca total de *Brassica oleracea* var. *alboglabra* e *Brassica rapa* subsp. *parachinensis* submetidas a alagamento. Além disso, pode-se observar que em todos os híbridos a massa seca das raízes e a relação entre a massa seca das raízes/parte aérea foi reduzida em função do alagamento. Semelhantes resultados foram observados por Mielke et al. (2003) em estudo realizado com plântulas de *Genipa americana*, as quais, sob alagamento, apresentaram reduções na massa seca de raiz e na relação entre a massa seca de raiz e massa seca da parte aérea.

No presente experimento não se observou influencia do estresse induzido pelo alagamento sobre os teores de clorofila dos híbridos avaliados (Figura 1), embora, a redução dos teores de clorofila em função do alagamento seja observada na maioria das espécies como, por exemplo, em *Dendranthema nankingense* e *D. zawadskii* (YIN et al., 2010). Contudo, Ishida et al. (2002) não observou influencia nos teores de clorofila de *Paspalum repens* sob alagamento. As respostas específicas das plantas em função do alagamento variam de acordo com muitos fatores, incluindo

espécies de plantas e genótipo, idade das plantas, propriedades da água e, hora e duração do alagamento (KOZLOWSKI, 1997), o que pode justificar as diferenças encontradas entre as espécies.

O alagamento não causou variação nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* descritos pelo Teste JIP principalmente os relacionados ao rendimento (Φ_{P_0} , Ψ_0 , Φ_{E_0} , Φ_{D_0} , Φ_{R_0} e δ_0) (Figura 2). Contudo nos parâmetros que descrevem os fluxos específicos de energia por centro de reação é identificada uma resposta diferencial entre os híbridos em função do alagamento, podendo ser destacada a alta dissipação de energia no forma de calor (razão DI_0/RC) para o híbrido Hyola 432. Segundo Christen et al. (2007), o valor de DI_0/RC é o resultado do que foi absorvido diminuindo-se o que foi capturado ($DI_0/RC = ABS/RC - TR_0/RC$).

O índice de performance (PI_{ABS}) é um dos parâmetros de fluorescência que permite informações completas e quantitativas do estado da planta e sua vitalidade, sendo que em vários estudos tem-se demonstrado que é um parâmetro que estima a vitalidade em resposta a estresses ambientais e permite o agrupamento de genótipos em função da intensidade do estresse (STRASSER et al, 1999, 2000 e 2004). Recentemente, Tsimilli-Michael e Strasser (2008) introduziram o índice de performance total ($PI_{ABS,total}$), o qual, em folhas intactas adaptadas ao escuro, inclui "potenciais" parciais de conservação de energia e está estreitamente relacionado com o resultado final da atividade da planta, como o crescimento ou a sobrevivência sob condições de estresse (YUSUF et al., 2010). No presente trabalho pode-se observar uma diminuição tanto em PI_{ABS} quanto em $PI_{ABS,total}$, contudo esta diminuição é variável com o tempo de alagamento e principalmente quanto ao híbrido, devendo ser destacado que as plantas do híbrido Hyola 420 não apresentaram redução nos índices de performance bem como massa seca em função do excesso de água, demonstrando que a atividade fotossintética pode não ter sido afetada pelo estresse por alagamento.

Tal fato também é demonstrado quando se analisa as curvas de cinética de fluorescência (Figura 3), na qual não se observa para as plantas do híbrido Hyola 420 sob alagamento, o aparecimento da banda L (Figura 3B) e banda K (Figura 3D). A banda L é influenciada pela transferência de energia entre as unidades do FSII, comumente denotada como conectividade e agrupamento (STRASSER; STIRBET, 1998). Assim, em outras palavras, a habilidade de resistência ao estresse por alagamento nas plantas do híbrido Hyola 420, pode estar associada ao melhor

agrupamento entre as unidades ativas do FSII ou mesmo a manutenção da estrutura das membranas dos tilacóides. Fato também observado por Panda et al. (2006) os quais reportam que a conectividade entre os sistemas antena do FSII é muito sensível ao alagamento de arroz podendo ser utilizado para sugerir o grau de suscetibilidade ou tolerância ao estresse.

O aparecimento da banda K (ao redor de 300 μ s) é altamente visível sobre determinados estresses, principalmente alta temperatura e seca como reportado por Srivastava et al. (1997). Uma pronunciada banda K pode se explicada por um desbalanço entre os lados doadores e aceptores de elétrons do FSII (STRASSER, 1997), estando associado à dissociação do complexo de evolução de oxigênio (DE RONDE et al., 2004). Oukarroum et al. (2007) tem sugerido que o aparecimento das bandas L e K pode ser um excelente indicador potencial para identificação de distúrbios fisiológicos antes do aparecimento de danos visuais no caso de estresse por seca. Desta forma, a associação da interpretação do aparecimento das bandas L e K mais pronunciada para as plantas dos híbridos Hyola 43, 401 e 432 sugere que os mesmos são mais sensíveis ao alagamento do que o Hyola 420.

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os híbridos de *Brassica napus* L. testados demonstram comportamentos distintos em resposta ao alagamento do solo. Baseado nos índices de performance, curvas de cinética da fluorescência e massa seca total, pode-se concluir que as plantas do híbrido Hyola 420 apresentam melhor desempenho fisiológico em condições de inundação demonstrando que tal híbrido é menos sensível ao estresse por alagamento quando comparado a Hyola 43, 401 e 432.

CAPÍTULO 2

EFEITO DAS BAIXAS TEMPERATURAS SOBRE A FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* DE HÍBRIDOS DE CANOLA

Effect of low temperatures on chlorophyll a fluorescence of canola hybrids

RESUMO - Os efeitos sobre o aparato fotossintético de plantas de canola (*Brassica napus* L.) submetidas a baixas temperaturas foram estudados. As baixas temperaturas são um dos principais fatores de estresse que limitam o crescimento e a produtividade das culturas anuais de inverno, bem como a distribuição geográfica das plantas. Plantas de canola foram cultivadas em casa de vegetação e induzidas a estresse por baixas temperaturas 50 dias após a semeadura. Dez plantas de cada híbrido foram acondicionadas em câmara de crescimento com ausência de luz por períodos distintos de baixas temperaturas: 1 e 4 horas a 0°C e 1, 4 e 15 horas a 4°C. Avaliaram-se os parâmetros e as diferenças na cinética de emissão da fluorescência da clorofila *a*. Os híbridos apresentaram o mesmo comportamento em relação à fluorescência da clorofila *a* em resposta ao estresse por baixas temperaturas. Em geral, os parâmetros da fluorescência da clorofila relacionados à atividade do FSI foram os mais afetados, sendo que o aumento destes parâmetros resultou em maiores valores de $PI_{ABS, total}$. A análise da cinética da fluorescência transiente da clorofila *a* revelou efeitos da temperatura principalmente no ponto J o qual reflete o acúmulo de plastoquinona A reduzida (Q_A^-) e na fase I-P que reflete a redução dos aceptores de elétrons finais do lado acceptor do FSI. Conclui-se que os parâmetros que envolvem a atividade do FSI e a fluorescência transiente no ponto J foram mais responsivos às condições impostas pelas baixas temperaturas.

Palavras-chave: *Brassica napus*, fluorescência da clorofila *a*, Teste JIP, estresse, temperatura.

ABSTRACT - The effects on the photosynthetic apparatus of plants of oilseed rape (*Brassica napus* L.) under low temperatures were studied. Low temperatures are a major stress factors that limit growth and yield of annual crops of winter, as well as the distribution of plants at different spatial scales. Oilseed rape plants were grown in a greenhouse and the stress induced by low temperature 50 days after sowing. Ten plants of each hybrid were placed in a growth chamber the absence of light for

different periods of low temperatures: 1 and 4 hours at 0°C and 1, 4 and 15 hours at 4°C. Were evaluated parameters and differences in the kinetics of emission of chlorophyll *a* fluorescence. The hybrids showed the same behavior in relation to chlorophyll *a* fluorescence in response to stress by low temperatures. In general, the parameters of chlorophyll fluorescence related to the activity of the PSI were the most affected, and the increase of these parameters resulted in higher values of the $PI_{ABS, total}$. The analysis of the kinetics of chlorophyll *a* fluorescence transient showed temperature effects, mainly at the J point which reflects the accumulation of reduced plastoquinone (Q_A^-) and the I-P phase reflecting the reduction of end electron acceptors at the PSI acceptor side, i.e., ferredoxin (Fd) NADP and other intermediaries. It can be conclude that the parameters involving the activity of FSI and transient fluorescence at the J point were more responsive to the conditions imposed by low temperatures.

Keywords: *Brassica napus*, chlorophyll *a* fluorescence, JIP-test, stress, temperature.

1. INTRODUÇÃO

A tolerância das plantas ao frio varia entre espécies e cultivares sendo relacionada a sua evolução (GARSTKA et al., 2007). As baixas temperaturas são um dos principais fatores de estresse que limitam o crescimento e a produtividade das culturas anuais de inverno (LIANG et al., 2007; STAVANG et al., 2008), bem como a distribuição geográfica das plantas (SLOT et al., 2005; ENSMINGER et al., 2006). O estresse ocasionado pelo frio impede a expressão do potencial genético total das plantas, devido à inibição direta de reações metabólicas e, indiretamente, através da restrição da absorção de água induzida pelas baixas temperaturas e desidratação celular induzida pelo congelamento (CHINNUSAMY et al., 2007).

De acordo com a faixa de temperatura, as plantas tem sido divididas em: i. plantas sensíveis ao frio, suscetíveis a temperaturas inferiores a 12°C, ii. plantas tolerantes ao frio, resistentes a temperaturas baixas não-congelantes, e iii. plantas tolerantes ao congelamento, as quais podem adquirir tolerância à geada após um período de exposição a temperaturas baixas não-congelantes em um processo adaptativo de aclimação ao frio (GARSTKA et al., 2007).

Muitas espécies de plantas de clima temperado podem aclimatar-se ao frio e adquirir tolerância à formação de gelo extracelular em seus tecidos (HUGHES; DUNN, 1996; CHINNUSAMY et al., 2007). Contudo, mediante exposição prévia a temperaturas baixas não-congelantes muitas plantas podem aumentar sua tolerância ao congelamento, ou sobreviver a temperaturas bastante reduzidas,

(CHINNUSAMY et al., 2007; ASGHARI et al., 2008). Este processo está associado a diversas alterações fisiológicas e bioquímicas nas plantas as quais incluem: i. aumento dos níveis de açúcares, proteínas, aminoácidos e ácidos orgânicos; acúmulo de osmólitos e proteínas protetoras (HUGHES; DUNN, 1996); ii. alterações no transporte fotossintético de elétrons (HUNER et al., 2003); iii. expressão alterada de enzimas do ciclo de Calvin (STITT; HURRY, 2002); iv. modificações na composição da membrana lipídica (HUGHES; DUNN, 1996); e v. alterações na expressão gênica (PALVA et al., 2001).

Estudos utilizando a fluorescência da clorofila *a* indicam que o centro de reação do fotossistema II (FSII) é um dos principais alvos do estresse por baixas temperaturas (AGATI et al., 1996; STRAUSS et al., 2006, 2007). Sinais da fluorescência da clorofila *a* têm sido amplamente utilizados para a avaliação de vários efeitos ambientais sobre o metabolismo fotossintético (FORCE et al., 2003), bem como para medir a resposta (grau de tolerância) das plantas aos fatores ambientais, como estresses abióticos (PANDA et al., 2006).

Obtidos os dados de intensidade da fluorescência, estes podem ser analisados através do Teste JIP desenvolvido por Strasser e Strasser (1995). O Teste JIP é uma análise multiparamétrica do rápido aumento da fluorescência OJIP, o qual permite quantificar o fluxo de energia absorvido e aproveitado no sistema fotossintético, podendo também avaliar o desempenho fotossintético de plantas (TSIMILLI-MICHAEL; STRASSER, 2008). O Teste JIP é altamente adequado para investigações *in vivo* do comportamento do aparato fotossintético, uma vez que a forma da fluorescência transiente OJIP é sensível a estresses ocasionados por alterações em muitas condições ambientais (TSIMILLI-MICHAEL et al., 1999; STRAUSS et al., 2006).

A canola (*Brassica napus* L.) pertence à família das Brassicaceae e constitui-se na terceira oleaginosa mais produzida no mundo, superada apenas pela soja e pela palma (CONAB, 2009). O cultivo comercial mundial de canola concentra-se em regiões temperadas, principalmente em latitudes superiores a 35° (MCCLINCHEY; KOTT, 2008), ou seja, regiões predominantemente frias. A temperatura do ar é a variável ambiental mais importante na regulação do crescimento e desenvolvimento da canola (THOMAS, 2003) sendo que temperaturas muito baixas, bem como a formação de geada são prejudiciais no início do ciclo de desenvolvimento, no período de florescimento e enchimento de grãos da cultura

(MCCLINCHEY; KOTT, 2008). Com isso, é necessário que plantas de canola passem por um período prévio de aclimação ao frio para que sejam capazes de resistir aos danos ocasionados pela geada (STAVANG et al., 2008; DALMAGO et al., 2010).

Em razão do aumento da área ocupada pela canola no Brasil, nos últimos anos, e do potencial de cultivo em novas áreas, como espécie alternativa de inverno nos sistemas de produção de grãos, é importante o conhecimento das respostas desta oleaginosa em relação às baixas temperaturas a fim de contribuir para elucidação do processo de aclimação ao frio desta espécie. O trabalho teve como objetivo estudar os efeitos de baixas temperaturas sobre o aparato fotossintético de diferentes híbridos de canola.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de crescimento

Foram cultivados em casa de vegetação os híbridos de canola Hyola 43, Hyola 401, Hyola 420 e Hyola 432. As sementes dos híbridos foram semeadas em vasos plásticos com capacidade de 0,5 L contendo areia como substrato. Após emergência foi realizado o desbaste deixando apenas uma planta por vaso. Aos sete dias após a emergência iniciou-se a aplicação de solução nutritiva Hoagland e Arnon (1950), pH ajustado para 6,0-6,5, a qual foi repetida a cada dois dias. A irrigação foi realizada diariamente para repor a quantidade de água perdida.

2.2. Tratamento de frio

Quando as plantas apresentaram 50 dias após a semeadura (estádio vegetativo) foram submetidas a estresse por frio. Dez plantas de cada híbrido foram acondicionadas em câmara de crescimento com ausência de luz por períodos distintos de baixas temperaturas: 1 e 4 horas a 0°C e 1, 4 e 15 horas a 4°C. Imediatamente após a indução do estresse foram realizadas as determinações da fluorescência da clorofila *a* sendo estas repetidas após uma hora de permanência das plantas à temperatura de aproximadamente 20-25°C caracterizando um período de recuperação. Antes da aplicação de cada estresse foram realizadas determinações de fluorescência da clorofila *a*, sendo que estes valores foram considerados como controle.

2.3. Medidas da fluorescência transiente polifásica da clorofila a e Teste-JIP

A fluorescência transiente polifásica (OJIP) da clorofila a foi medida nas primeiras folhas jovens completamente expandidas utilizando um fluorômetro portátil (Modelo Handy PEA, Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK) de acordo com Strasser et al. (1995). As medidas foram realizadas em folhas previamente adaptadas ao escuro por 20 minutos para oxidação completa do sistema fotossintético de transporte de elétrons. A emissão de fluorescência foi induzida em uma área de 4 mm de diâmetro da folha pela exposição da amostra a um pulso de luz vermelha (pico 650 nm) numa intensidade de cerca de $3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intensidade de excitação suficiente para assegurar o fechamento de todos os centros de reação do FSII para obter a intensidade de fluorescência máxima). As intensidades de fluorescência foram determinadas a 50, 100, 300 μs , 2 (F_J) e 30 (F_I) ms e F_M (fluorescência máxima). A partir das intensidades de fluorescência foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER; STRASSER, 1995). Além da análise através do Teste JIP o efeito das baixas temperaturas foi avaliado pela diferença na cinética de emissão de fluorescência conforme descrito por Yusuf et al. (2010).

Utilizou-se 10 repetições por tratamento, e os parâmetros de fluorescência foram normalizados em relação às determinações dos respectivos controles.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise da fluorescência transiente da clorofila a (OJIP)

O aumento da fluorescência transiente OJIP é uma medida capaz de detectar com segurança e confiabilidade efeitos de estresses e injúrias no processo fotossintético (YUSUF et al., 2010), permitindo a obtenção de uma série de informações de diferenças fisiológicas entre materiais genéticos e sobre o efeito de baixas temperaturas em plantas.

Na Figura 1 são apresentados parâmetros biofísicos obtidos a partir das curvas de fluorescência transiente da clorofila a e quantificados pelo Teste JIP (STRASSER; STRASSER, 1995), os quais estão representados na forma de gráfico de radar.

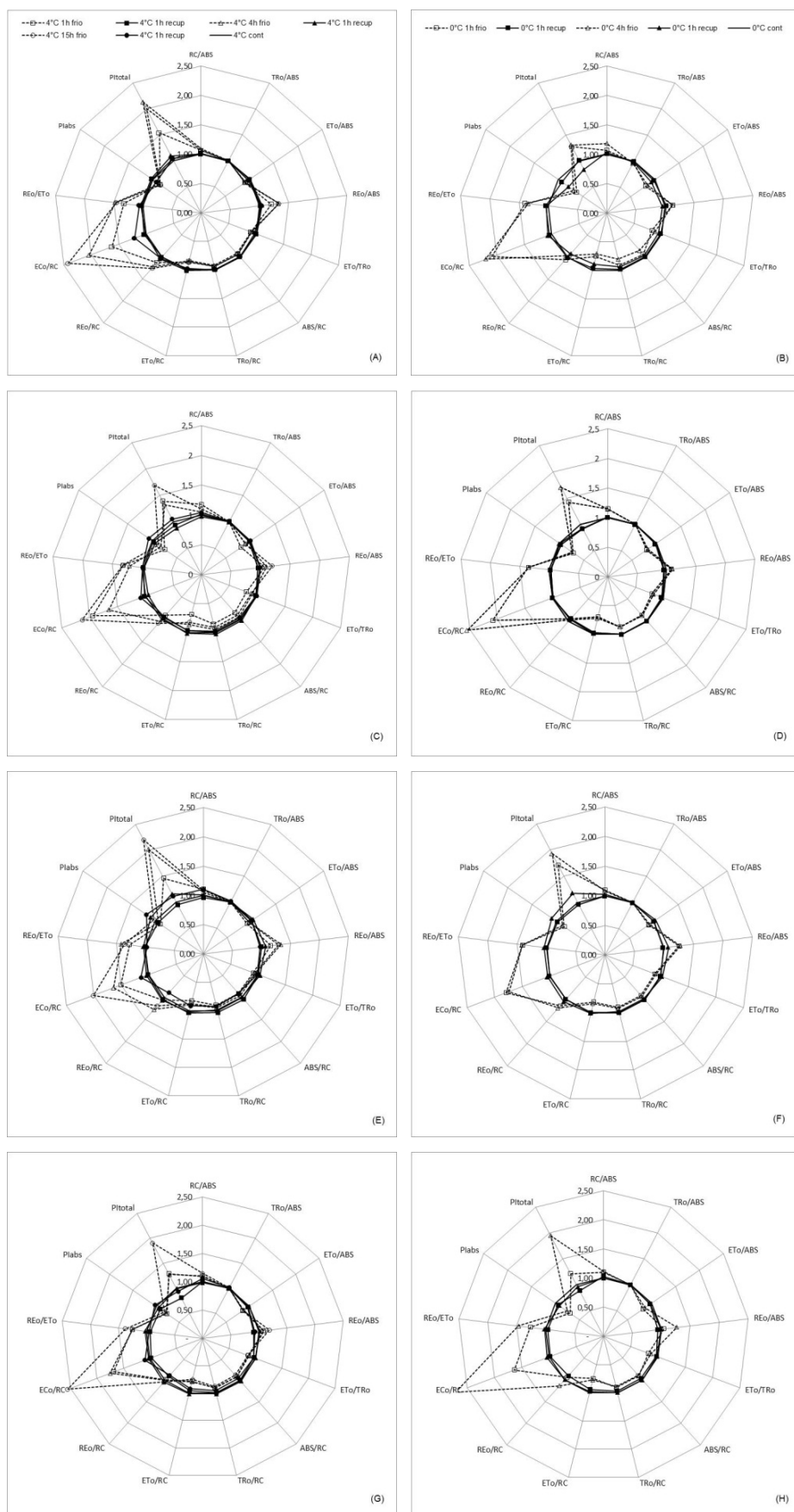


Figura 1. Parâmetros fotossintéticos deduzidos de análise por Teste JIP da fluorescência transiente de plantas de híbridos de *Brassica napus* L., (A) e (B) Hyola 43; (C) e (D) Hyola 401; (E) e (F) Hyola 420; e (G) e (H) Hyola 432, submetidas a baixas temperaturas.

Em geral, todos os híbridos de canola apresentaram o mesmo comportamento em relação aos parâmetros afetados em função das baixas temperaturas bem como períodos distintos de condicionamento ao estresse. Para os parâmetros que descrevem o rendimento ou taxas de fluxos, observa-se que para o rendimento quântico máximo da fotoquímica primária no $t=0$ ($TR_o/ABS = \phi_{P0}$) e o rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons ($ET_o/ABS = \phi_{E0}$) não foram identificadas diferenças entre os tratamentos. Contudo, o parâmetro RE_o/ABS (ϕ_{R0}) (rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para os aceptores finais de elétrons do fotossistema I - FSI) aumentou em ambas temperaturas de 0 e 4°C nos diferentes tempos de exposição tendo seus valores reduzidos a nível de controle após permanência das plantas a temperatura ambiente pelo período de 1 hora (período de recuperação). Para os parâmetros relacionados à eficiência não foi observada alteração em ET_o/TR_o (Ψ_0) (probabilidade [em $t=0$] que um éxciton capturado no centro de reação mova um elétron na cadeia de transporte de elétrons além de Q_A^-), porém a eficiência com que um elétron pode mover do intersistema de aceptores de elétrons reduzidos para o acceptor final de elétrons do FSI ($RE_o/ET_o = \delta_0$) apresentou-se mais elevada em função dos tratamentos retornando aos valores do controle após o período de recuperação.

Para os parâmetros que descrevem fluxos específicos por centro de reação (RC) verificou-se que o fluxo de absorção por RC (ABS/RC), o fluxo de energia capturada por RC no $t=0$ (TR_o/RC) e a redução do acceptor final de elétrons no lado acceptor do FSI por RC no $t=0$ (RE_o/RC) não foram afetados pelas temperaturas de 0 e 4°C. Entretanto, pode-se observar que os valores de EC_o/RC (total de transportadores de elétrons por RC no $t=0$) aumentaram consideravelmente sendo verificados acréscimos de até 74, 120, 154 e 172 % em 4 horas a 0°C para Hyola 420, Hyola 43, Hyola 401 e Hyola 432, respectivamente, bem como 101, 114, 142 e 155% em 15 horas a 4°C para Hyola 420, Hyola 401, Hyola 43 e Hyola 432, respectivamente. Além disso, o fluxo de transporte de elétrons por RC no $t=0$ (ET_o/RC) foi reduzido em todos os tratamentos. Contudo, os valores de EC_o/RC e ET_o/RC retornaram ao patamar do controle após o período de recuperação.

Os tratamentos de baixa temperatura provocaram, em todos os híbridos, um aumento entre 2,5 a 4,5 vezes em relação ao controle: i. no tempo (em ms) para atingir a fluorescência máxima (tF_M); ii. na área total complementar entre a curva de

indução de fluorescência e $F=F_M$; iii. no número de giros de oxidação e reoxidação de Q_A (N); iv. e na razão Φ que representa a energia necessária para fechar todos os centros de reação do FSII (S_m). Porém todos estes parâmetros retornaram aos níveis do controle após o período de recuperação (dados não mostrados).

Um dos parâmetros que permite a interpretação completa do sistema de absorção e aproveitamento da energia na cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese e descreve o efeito de um estresse sobre o aparato fotossintético é o índice de performance fotossintético o qual representa a combinação de três componentes parciais, que descrevem: a) a quantidade de centro de reação fotossintético (RC/ABS); b) o fluxo máximo de energia que atinge o centro de reação do FSII [$\Phi_{P0}/(1-\Phi_{P0})$]; e c) o transporte de elétrons no início da iluminação [$\Psi_0/(1-\Psi_0)$]. Porém, Tsimilli-Michael e Strasser (2008), introduziram mais um componente nesta fórmula que descreve as reações de oxi-redução que ocorrem no lado acceptor de elétrons do FSI [$\bar{\Phi}_0/(1-\bar{\Phi}_0)$], propondo o termo índice de performance total ($PI_{ABS,total}$).

O índice de performance fotossintético relativo à absorção (PI_{ABS}) (STRASSER et al., 1999, 2000, 2004), diminuiu em todos os híbridos de canola, sendo esta diminuição mais acentuada nos tratamentos que foram submetidos a temperatura de 0°C, independente do tempo de exposição. No entanto, o índice de performance total ($PI_{ABS,total}$), que mede a performance até os aceptores finais de elétrons do FSI (TSIMILLI-MICHAEL; STRASSER, 2008) aumentou em função da temperatura e tempo de exposição chegando a valores 31, 71, 93 e 95% superiores em 4 horas a 0°C para Hyola 43, Hyola, 401, Hyola 420, Hyola 432, respectivamente, e 69, 90, 101, 120% em 15 horas a 4°C para Hyola 401, Hyola 432, Hyola 43 e Hyola 420, respectivamente. Contudo, o período de recuperação, ou seja, a permanência das plantas a temperatura ambiente por uma hora foi capaz de tornar os valores de PI_{ABS} e $PI_{ABS,total}$, muito próximos aos valores apresentados no controle.

A fluorescência transiente OJIP e a quantificação das alterações induzidas por estresses em sua forma, através do índice de performance, fornecem uma ferramenta rápida e não-invasiva de diagnóstico para detecção precoce do estresse por frio no escuro. Corroborando com resultados obtidos no presente estudo, Strauss et al. (2007) verificou redução dos valores de PI_{ABS} em genótipos de soja submetidos a baixa temperatura. Ao contrário do que ocorreu com PI_{ABS} , o estresse

por frio em canola promoveu aumento dos valores de $PI_{ABS, total}$. Tal resultado pode ser explicado devido ao fato de que os parâmetros que envolvem a atividade do FSI, como RE_o/ET_o (Figura 1), também sofreram elevação em função das baixas temperaturas.

3.2. Análise da cinética da fluorescência transiente (OJIP)

Considerando que todos os híbridos apresentaram o mesmo comportamento geral em relação a cinética de emissão da fluorescência da clorofila a em resposta ao estresse por baixa temperatura, optou-se por representar as respostas da diferença cinética da fluorescência às diferentes temperaturas para o conjunto de todos os híbridos, destacando-se apenas o efeito da temperatura.

A fluorescência variável transiente ($W_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$) da clorofila a das folhas adaptadas ao escuro de híbridos de canola é mostrada nas Figuras 2A (temperatura de 4°C) e 3A (temperatura de 0°C). Todas as curvas apresentam uma forma OJIP típica (STRASSER et al., 1999, 2000, 2004) com uma fluorescência variável máxima demonstrando que todos os tratamentos estavam fotosinteticamente ativos (YUSUF et al., 2010). Além disso, pode-se verificar um aumento da fluorescência variável transiente no ponto J o qual reflete o acúmulo de plastoquinona A reduzida (Q_A^-) e a redução dos valores de fluorescência na fase I-P que reflete a redução dos aceptores de elétrons finais do lado acceptor do FSI, ou seja, ferredoxina (Fd), outros intermediários e NADP.

Nas figuras 2B e 3B é caracterizada a diferença das fluorescências variáveis entre as plantas submetidas a baixas temperaturas e o controle [$\Delta W_t = (W_{t \text{ baixas temperaturas}} - W_{t \text{ controle}})$] bem como entre os valores obtidos após o período de recuperação e o controle [$\Delta W_t = (W_{t \text{ recuperação}} - W_{t \text{ controle}})$]. Através destas normalizações pode-se observar a amplitude da diferença das fluorescências variáveis nas fases O-I e I-P em função das baixas temperaturas.

Na figuras 2C e 3C os valores de fluorescência da clorofila foram normalizados como $W_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$ para avaliação da fase O-I, sendo que esta normalização permite, quando $W_{OI} < 1$, avaliar a sequência de eventos que ocorre a partir da captura do éxciton pelo FSII até a redução da plastoquinona

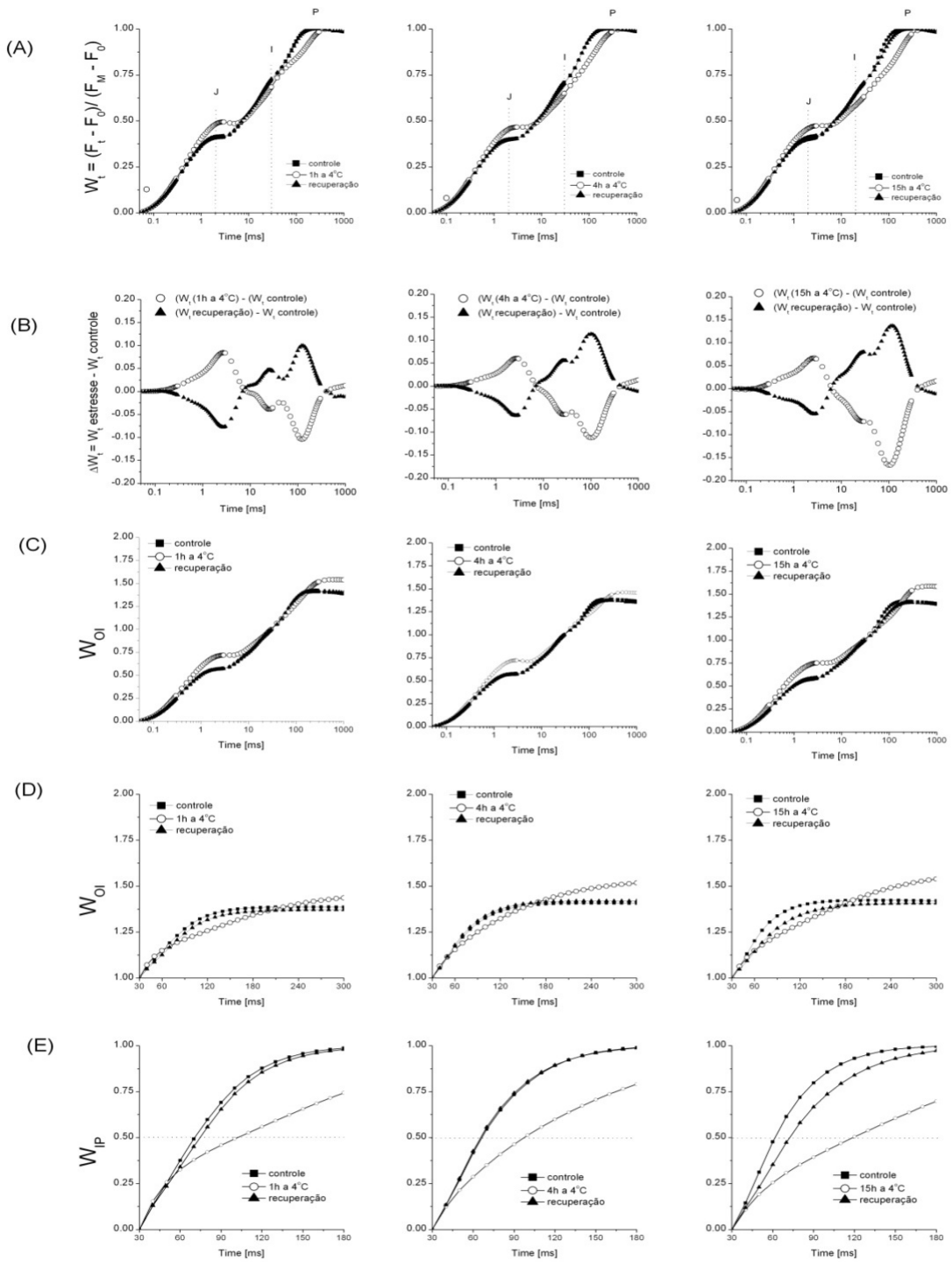


Figura 2. Fluorescência transiente da clorofila *a* de folhas adaptadas ao escuro em diferentes híbridos de canola (*Brassica napus* L.). (A) fluorescência variável relativa [$W_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$]; (B) diferença cinética de W_t [$\Delta W_t = (W_t \text{ baixas temperaturas} - W_t \text{ controle})$]; (C) fluorescência variável entre os pontos O e I [$W_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$]; (D) fluorescência variável entre os pontos O e I ($W_{OI} \geq 1$); (E) fluorescência variável entre os pontos I e P [$W_{IP} = (F_t - F_I)/(F_P - F_I)$].

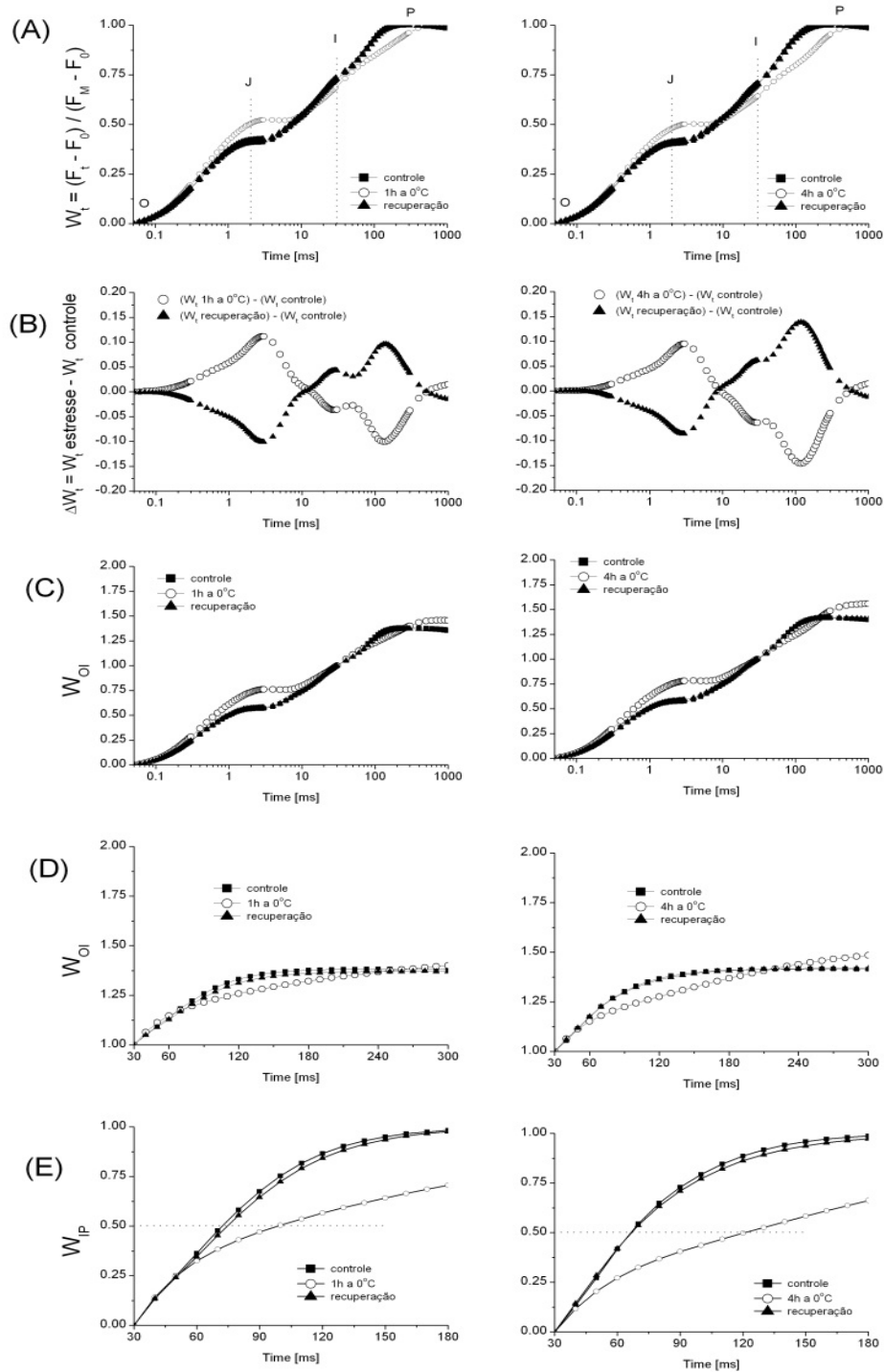


Figura 3. Fluorescência transiente da clorofila a de folhas adaptadas ao escuro em diferentes híbridos de canola (*Brassica napus* L.). (A) fluorescência variável relativa [$W_t = (F_t - F_0) / (F_M - F_0)$]; (B) diferença cinética de W_t [$\Delta W_t = (W_t \text{ baixas temperaturas} - W_t \text{ controle})$]; (C) fluorescência variável entre os pontos O e I [$W_{OI} = (F_t - F_0) / (F_I - F_0)$]; (D) fluorescência variável entre os pontos O e I ($W_{OI} \geq 1$); (E) fluorescência variável entre os pontos I e P [$W_{IP} = (F_t - F_I) / (F_P - F_I)$].

Para avaliação da fase I-P, dois diferentes procedimentos foram utilizados: a) normalização das curvas $W_{OI} \geq 1$ (Figuras 2D e 3D) que permite avaliar a sequência de eventos de transferência de elétrons da plastoquinona reduzida (plastoquinol - PQH₂) para os aceptores finais de elétrons do FSI; e b) dados normalizados como $W_{IP} = (F_t - F_i) / (F_P - F_i)$ em escala linear entre 30 e 180 ms (Figuras 2E e 3E). A máxima amplitude do aumento da fluorescência na fase I-P identificada nas figuras 2D e 3D, reflete o tamanho do pool de aceptores finais de elétrons do lado acceptor do FSI (YUSUF et al., 2010). Desta forma pode-se observar uma redução do tamanho do pool no período inicial da curva seguido de um aumento subsequente superando os valores apresentados pelo controle. Nas figuras 2E e 3E (W_{IP}), a normalização permite que a amplitude máxima aumente para o valor unitário, possibilitando a fácil comparação das constantes globais de taxas de redução do pool de aceptores finais de elétrons do FSI. Neste gráfico quando $W_{IP} = 0,5$ (linha tracejada) é definida a meia-vida de forma que o inverso do tempo, para atingir $W_{IP}=0,5$, é uma estimativa da taxa global de redução dos aceptores de elétrons do FSI. No presente trabalho pode ser destacado que a taxa global de redução dos aceptores finais de elétrons foi menor (maior tempo para atingir $W_{IP}=0,5$) nas plantas submetidas às temperaturas de 0 e 4°C quando comparadas aos valores apresentado no controle, indicando uma menor taxa de redução dos aceptores finais do FSI.

A partir dos dados mostrados nas figuras 2 e 3, duas observações importantes sobre o efeito das baixas temperaturas na fluorescência transiente OJIP podem ser feitas: (a) a forma da fluorescência transiente OJIP registrada nas folhas de plantas refrigeradas no escuro dos híbridos de canola avaliados difere da registrada em folhas de plantas não tratadas (controle); e (b) comportamento semelhante da alteração da forma dos transientes em função das baixas temperaturas em todos híbridos estudados, principalmente no pico J (2 ms). O frio em plantas de canola resultou em um aumento na intensidade de fluorescência em 2ms (pico J) sendo este aumento geralmente interpretado como evidência do acúmulo da fração do pool de Q_A^- (STRASSER et al., 1995; LAZÁR; ILÍK, 1997), possivelmente devido a uma diminuição no transporte de elétrons além de Q_A^- (HALDIMANN; STRASSER, 1999).

Os tilacóides são geralmente relatados como o principal local de danos induzidos por baixas temperaturas no cloroplasto (KRAUSE et al., 1988; SROR et

al., 2003). As membranas dos tilacóides perdem a capacidade de transporte de elétrons e fotofosforilação em condições de queda de temperatura, possivelmente devido a alterações ou a reorganização de componentes do tilacóide, como por exemplo, os polipeptídeos de membrana (BERTAMINI et al., 2007). O funcionamento ineficiente das membranas têm sido encontrado em diferentes espécies e sob várias condições de estresse (JATIMLIANSKY et al., 2004). Strand e Öquist (1988) relataram que em *Pinus sylvestris*, danos nas estruturas dos tilacóides levam à inibição do fluxo de elétrons a partir de Q_A . Da mesma forma, Rapacz (2007) verificou que alterações na fluorescência da clorofila de plantas de trigo, observadas diretamente após baixas temperaturas, foram provocadas pelo fluxo de energia a partir de Q_A .

Além do acúmulo de plastoquinona A reduzida (Q_A^-) pode-se verificar, baseado nos resultados de fluorescência variável transiente na fase I-P e taxa global de redução dos aceptores finais de elétrons, a diminuição da redução dos aceptores de elétrons finais do lado aceptor do FSI. Tal resultado pode ser explicado pelo fluxo de elétrons cíclico do FSI onde a ferredoxina reduzida, o aceptor final do FSI, transfere seus elétrons de volta para o pool de plastoquinona através de NADPH ou diretamente para o complexo Cyt_{b6f} , sendo um processo acoplado a translocação de prótons e formação de ATP (JOLIOT; JOLIOT, 2002).

O estresse por baixas temperaturas promove um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem funcionar tanto como indutores dos mecanismos de tolerância ao estresse quanto como agentes causadores de injúrias e morte celular (MCKERSIE, 1997). O principal alvo para o dano oxidativo ocasionado por EROs é a proteína D1, no centro de reação do FSII. Além disso, em algumas espécies, o reparo da proteína D1 é geralmente limitado em condições de baixas temperaturas, pois a proteólise de D1 é reduzida, impedindo assim a integração de proteínas D1 sintetizadas para substituição e consequentemente aumentando os danos fotoinibitórios (ARO et al., 1990).

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os híbridos de *Brassica napus* L. testados demonstram comportamentos semelhantes em resposta às baixas temperaturas sendo que os parâmetros que envolvem a atividade do FSI bem como a fluorescência variável transiente no ponto J são mais responsivos às condições impostas pelo frio.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fluorescência transiente da clorofila *a* é uma ferramenta eficiente nas avaliações das respostas dos híbridos de canola às condições de alagamento e baixas temperaturas e permite identificar alterações no metabolismo destas plantas antes mesmo dos danos tornarem-se visíveis. Além disso, por ser uma técnica rápida e não-invasiva, pode ser empregada em avaliações a campo de resistência ou tolerância de plantas de canola a diferentes estresses permitindo a identificação de genótipos mais adequados para o cultivo em áreas onde ocorrem condições adversas a cultura. Outra vantagem importante seria a identificação do material parental que poderia ser incluído em programas de melhoramento visando desenvolver genótipos tolerantes a estresses garantindo maiores rendimentos por unidade de área.

Os índices de performance (PI_{ABS} e $PI_{ABS,total}$), obtidos a partir da fluorescência da clorofila *a*, são os parâmetros mais responsivos às condições de alagamento e baixas temperaturas indicando a sensibilidade das plantas de canola a determinados estresses. Além disso, a diferença na cinética de emissão de fluorescência foi capaz de identificar efeitos diferenciais de ambos os estresses nos diferentes locais da maquinaria fotossintética das plantas dos híbridos de canola através da banda L e banda K nas condições de alagamento e fluorescência variável transiente no ponto J e na fase I-P nas condições de baixas temperaturas.

REFERÊNCIAS

- AGATI, G.; MAZZINGHI, P.; DI PAOLA, M. L.; FUSI, F.; CECCHI, G. The F685/F730 chlorophyll fluorescence ratio as indicator of chilling stress in plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 148, p. 384-390, 1996.
- ALLEN, J. A.; PEZENSKY, S. R.; CHAMBERS, J. L. Interaction of flooding and salinity stress on balcypress (*Taxodium disticum*). **Tree Physiology**, v. 16, p. 307-313, 1996.
- ARBONA, V.; LÓPEZ-CLIMENT, M. F.; PÉREZ-CLEMENTE, R. M.; GÓMEZ-CADENAS, A. Maintenance of a high photosynthetic performance is linked to flooding tolerance in citrus. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, p. 135-142, 2009.
- ARO, E. M.; HUNDAL, T.; CARLBERG, I.; ANDERSSON, B. In vitro studies on light induced inhibition of photosystem II and D1 protein degradation at low temperatures. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1019, p. 269-275, 1990.
- ASGHARI, A.; MOHAMMADI, S. A.; MOGHADDAM, M.; TOORCHI, M.; MOHAMMADINASAB, A. D. Analysis of quantitative trait loci associated with freezing tolerance in rapeseed (*Brassica napus* L.) **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 22, p. 548-552, 2008.
- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 313-39, 2008.
- BENSCHOP, J. J.; BOU, J.; PEETERS, A. J. M.; WAGEMAKER, N.; GÜHL, K. et al. Long-term submergence-induced elongation in *Rumex palustris* requires abscisic acid-dependent biosynthesis of gibberellin. **Plant Physiology**, v. 141, p. 1644-52, 2006.
- BERTAMINI, M.; ZULINI, L.; MUTHUCHELIAN, K.; NEDUNCHEZHIAN, N. Low night temperature effects on photosynthetic performance on two grapevine genotypes. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 2, 381-385, 2007.
- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Cold stress regulation of gene expression in plants. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 10, p. 444-451, 2007.
- CHOI, D.; KIM, J. H.; KENDE, H. Whole genome analysis of the *OsGRF* gene family encoding plant-specific putative transcription activators in rice. **Plant Cell**

Physiology, v. 45, p. 897-904, 2004.

CHRISTEN, D.; SCHÖNMANN, S.; JERMINI, M.; STRASSER, R. J.; DÉFAGO, G. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 504-514, 2007.

COLMER, T. D. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. **Plant Cell Environ**, v. 26, p. 17-36, 2003.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, safra 2008/2009**, 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 12/04/2010.

DALMAGO, G. A.; CUNHA, G. R.; SANTI, A.; PIRES, J. L. F.; MÜLLER, A. L.; BOLIS, L. M. Aclimação ao frio e dano por geada em canola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 9, p. 933-943, 2010.

DE RONDE, J. A.; CRESS, W. A.; KRÜGER, G. H. J.; STRASSER, R. J.; VAN STADEN, J. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis P5CR* gene, during heat and drought stress. **Journal Plant Physiology**, v. 161, p. 1211-1224, 2004.

ENSMINGER, I.; BUSCH, F.; HUNER, N. P. A. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v. 126, p. 28-44, 2006.

EVANS, D. E. Aerenchyma formation. **New Phytologist**, v. 161, p. 35-49, 2004.

FORCE, L.; CRITCHLEY, C.; VAN RENSEN, J. J. S. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. **Photosynthesis Research**, v. 78, p. 17-33, 2003.

GARDINER, E. S.; KRAUSS, K. W. Photosynthetic light response of flooded cherrybark oak (*Quercus pagoda*) seedlings grown in two light regimes. **Tree Physiology**, v. 21, p. 1103-1111, 2001.

GARSTKA, M.; VENEMA, J. H.; RUMAK, I.; GIECZEWSKA, K.; ROSIAK, M.; KOZIOL-LIPINSKA, J.; KIERDASZUK, B.; VREDENBERG, W. J.; MOSTOWSKA, A. Contrasting effect of dark-chilling on chloroplast structure and arrangement of chlorophyll-protein complexes in pea and tomato: plants with a different susceptibility to non-freezing temperature. **Planta**, v. 226, p. 1165-1181, 2007.

GIBBS, J.; GREENWAY, H. Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth survival and anaerobic catabolism. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 1-47, 2003.

HALDIMANN, P.; STRASSER, R. J. Effects of anaerobiosis as probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence rise kinetic in pea (*Pisum sativum* L.).

Photosynthesis Research, v. 62, p. 67-83, 1999.

HOAGLAND, D.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station Circular**, 1950, 347p.

HUGHES, M. A.; DUNN, M. A. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 296, p. 291-305, 1996.

HUNER, N. P. A.; ÖQUIST, G.; MELIS, A. Photostasis in plants, green algae and cyanobacteria: the role of light harvesting antenna complexes. In: GREEN, B. R.; PARSON, W. W., (Eds.), **Advances in Photosynthesis and Respiration Light Harvesting Antennas in Photosynthesis**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 401-421, 2003.

ISHIDA, F. Y.; OLIVEIRA, L. E. M.; CARVALHO, C. J. R.; ALVES, J. D. Efeitos da inundação parcial e total sobre o crescimento, teor de clorofila e fluorescência de *Setaria anceps* e *Paspalum repens*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, p. 1152-1159, 2002.

ISSARAKRAISILA, M.; MA, Q.; TURNER, D. W. Photosynthetic and growth responses of juvenile Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*) and Caisin (*Brassica rapa* subsp. *parachinensis*) to waterlogging and water deficit. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 107-113, 2007.

JACKSON, M. B. Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 36, p. 145-174, 1985.

JACKSON, M. B. Ethylene-promoted Elongation: an Adaptation to Submergence Stress. **Annals of Botany**, v. 101, p. 229-248, 2008.

JATIMLIANSKY, J. R.; GARCÍA, M. D.; MOLINA, M. C. Response to chilling of *Zea mays*, *Tripsacum dactyloides* and their hybrid. **Biologia Plantarum**, v. 48, p. 561-567, 2004.

JIANG, C.; JIANG, G.; WANG, X.; LIA, D. K.; BISWASA, L.; LIA, Y. Increased photosynthetic activities and thermostability of photosystem II with leaf development of elm seedlings (*Ulmus pumila*) probed by the fast fluorescence rise OJIP. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 261-268, 2006.

JOLIOT, P.; JOLIOT, A. Cyclic electron transfer in plant leaf. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 15, p.10209-10214, 2002.

KAUTSKY, H.; HIRSCH, A. Neue versuche zur kohlenensäure assimilation. **Naturwissenschaften**, v. 19, p-964, 1931.

KOUŘIL R.; ILÍK P.; TOMEK P.; NAUŠ J. A. N.; POULÍČKOVÁ, A. Chlorophyll fluorescence temperature curve on *Klebsormidium flaccidum* cultivated at different temperature regimes. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 1131-1136, 2001.

- KOZLOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology Monograph**, v. 1, p. 1-29, 1997.
- KOZLOWSKI, T. T.; KRAMER, P. L.; PALLARDY, S. G. The physiological ecology of woody plants. **Academic Press**, 1991, 657 p.
- KRAUSE, G. H.; GRAFFLAGE, S.; RUMICH-BAYER, S.; SOMERSALO, S. Effects of freezing on plant mesophyll cells. In: LONG, S. P.; WOODWARD, F. I., (Eds.), **Plants and Temperature**. Company of Biologists, Cambridge, p. 311-327, 1988.
- KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 313-349, 1991.
- LAZÁR, D.; ILÍK, P. High-temperature induced chlorophyll fluorescence changes in barley leaves: comparison of the critical temperatures determined from fluorescence induction and from fluorescence temperature curve. **Plant Science**, v. 124, p. 159-164, 1997.
- LAZÁR, D. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. **Functional Plant Biology**, v. 33, p. 9-30, 2006.
- LIANG, Y.; CHEN, H.; TANG, M.; YANG, P.; SHEN, S. Responses of *Jatropha curcas* seedlings to cold stress: photosynthesis-related proteins and chlorophyll fluorescence characteristics. **Physiologia Plantarum**, p. 131, v. 508-517, 2007.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C.; KNAPP, M. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RFd of leaves with the PAM fluorometers. **Photosynthetica**, v. 43, p. 379-393, 2005.
- LICHTENTHALER, H. K. Vegetation Stress an introduction to the stress concept in plants. **Plant Physiology**, v. 148, p. 4-14, 1996.
- MCCLINCHEY, S. L.; KOTT, L. S. Production of mutants with high cold tolerance in spring canola (*Brassica napus*). **Euphytica**, v. 162, p. 51-67, 2008.
- MCKERSIE, B. D.; MURNAGHAN, J.; BOWLEY, S. R. Manipulating freezing tolerance in transgenic plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 19, p. 485-495, 1997.
- MEHTA, P.; JAJOO, 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.
- MIELKE, M. S.; ALMEIDA, A. F.; GOMES, F. P.; AGUILAR, M. A. G.; MANGABEIRA, P. A. O. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipa americana* seedlings to soil flooding. **Environmental and Experimental Botany**, v. 50, p. 221-231, 2003.

- MIELKE, M. S.; SCHAFFER, B. Photosynthetic and growth responses of *Eugenia uniflora* L. seedlings to soil flooding and light intensity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, p. 113-121, 2010.
- MOMMER, L.; PEDERSEN, O.; VISSER, E. J. W. Acclimation of a terrestrial plant to submergence facilitates gas exchange under water. **Plant Cell Environment**, v. 27, p. 1281-87, 2004.
- MORRIS, D. H. Canola and vitamin E. **Winnipeg: Canola Council of Canada**, 2000, 2p.
- OUKARROUM, A.; EL MADIDI, S.; 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.
- PALVA, E. T.; WELLING, A.; TÄHTIHARJU, S.; TAMMINEN, I.; PUHAKAINEN T.; MÄKELÄ, P.; LAITINEN, R.; LI, C.; HELENIUS, E.; BOIJE, M.; ASPEGREN, K.; AALTO, O.; HEINO, P. Cold acclimation and development of freezing and drought tolerance in plants. **Acta Horticulturae**, v. 560, p. 277-284, 2001.
- PANDA, D.; RAO, D. N.; SHARMA, S. G.; STRASSER, R. J.; SARKAR, R. K. Submergence effects on rice genotypes during seedling stage: probing of submergence driven changes of photosystem 2 by chlorophyll a fluorescence induction O-J-I-P transients. **Photosynthetica**, v. 44, p. 69-75, 2006.
- PANDA, D.; SHARMA, S. G.; SARKAR, R. K. Chlorophyll fluorescence parameters, CO₂ photosynthetic rate and regeneration capacity as a result of complete submergence and subsequent re-emergence in rice (*Oryza sativa* L.). **Aquatic Botany**, v. 88, p. 127-133, 2008.
- PEZESHKI, S. R.; PARDUE, J. H.; DELAUNE, R. D. Leaf gas exchange and growth of flood-tolerant and flood-sensitive tree species under low soil redox conditions. **Tree Physiology**, v. 16, p. 453-458, 1996.
- PEZESHKI, S. R. Wetland plant responses to soil flooding. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, p. 299-312, 2001.
- RAPACZ, M. Chlorophyll a fluorescence transient during freezing and recovery in winter wheat. **Photosynthetica**, v. 45, n. 3, p. 409-418, 2007.
- ROHÁČEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. **Photosynthetica**, Prague, v. 40, p. 13-29, 2002.
- SAIKA, H.; OKAMOTO, M.; MIYOSHI, K.; KUSHIRO, T.; SHINODA, S., et al. Ethylene promotes submergence-induced expression of *OsABA8ox1*, a gene that encodes ABA 8'-hydroxylase in rice. **Plant Cell Physiology**, v. 48, p. 287-98, 2007.

- SAIRAM, R. K.; KUMUTHA, D.; EZHILMATHI, K.; DESHMUKH, P. S.; SRIVASTAVA, G. C. Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 3, p. 401-412, 2008.
- SLOT, M.; WIRTH, C.; SCHUMACHER, J.; MOHREN, G. M. J.; SHIBISTOVA, O.; LLOYD, J.; ENSMINGER, I. Regeneration patterns in boreal Scots pine glades linked to cold-induced photoinhibition. **Tree Physiology**, v. 25, p. 1139-1150, 2005.
- SROR, H. A. M.; TISCHENDORF, G.; SIEG, F.; SCHMITT, J. M.; HINCHAB, D. K. Cryoprotection protects thylakoids during a freeze-thaw cycle by a mechanism involving stable membrane binding. **Cryobiology**, v. 47, p. 191-203, 2003.
- STAVANG, J. A.; HANSEN, M.; OLSEN, J. E. Short term temperature drops do not enhance cold tolerance. **Plant Growth Regulation**, v. 55, p. 199-206, 2008.
- STITT, M.; HURRY, V. A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in Arabidopsis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 199-206, 2002.
- STRAND, M., ÖQUIST, G. Effects of frost hardening, dehardening and freezing stress on in vivo chlorophyll fluorescence of seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Plant Cell Environment**, v. 11, p. 231-238, 1988.
- STRASSER, B. J. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. **Photosynthesis Research**, v. 52, p. 147-155, 1997.
- STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transient to address environmental questions: The JIP-test. In: MATHIS, P. (Ed.), **Photosynthesis: from light to biosphere**, Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, The Netherlands, p. 977-980, 1995.
- STRASSER, R. J. A concept for stress and its application in remote sensing. LICHTENTHALER, H. K. (Ed.), **Applications of Chlorophyll Fluorescence**. Kluwer Academic Publishers, p. 333-337, 1988.
- STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; GOVINDJEE. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v. 61, p. 32-42, 1995.
- STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Screening the vitality and photosynthetic activity of plants by the fluorescence transient. In: BEHL, R. K.; PUNIA, M. S.; LATHER, B. P. S., (Eds.), **Crop improvement for food security**. SSARM, Hisar, India, p. 72-115, 1999.
- STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: YUNUS, M.; PATHRE, U.; MOHANTY, P., (Eds.), **Probing photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation**. Taylor e Francis, London, p. 443-480, 2000.

- STRASSER, R. J.; STIRBET, A. D. Heterogeneity of Photosystem II probed by the numerically simulated chlorophyll a fluorescence rise (O-J-I-P). **Mathematics and Computers in Simulation**, v. 48, p. 3-9, 1998.
- STRASSER, R. J. The grouping model of plant photosynthesis: heterogeneity of photosynthetic units in thylakoids. In: AKOYUNOGJOU, G., (Ed.). **Photosynthesis III. Structure and Molecular Organization of the Photosynthetic Apparatus**. Balaban. International Science Services, Philadelphia, p. 727-737, 1981.
- STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the fluorescence transient In: PAPAGEORGIOU, G. C.; GOVINDJEE, (Eds.), **Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis**. Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Springer: Dordrecht, p. 321-362, 2004.
- STRAUSS, A. J.; KRÜGER, G. H. J.; STRASSER, R. J.; VAN HEERDEN, P. D. R. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 147-157, 2006.
- STRAUSS, A. J.; KRÜGER, G. H. J.; STRASSER, R. J.; VAN HEERDEN, P. D. R. The role of low soil temperature in the inhibition of growth and PSII function during dark chilling in soybean genotypes of contrasting tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 131, p. 89-105, 2007.
- THOMAS, P. **Canola grower's manual**. Winnipeg: Canola Council of Canada, 2003. Disponível em: http://www.canolacouncil.org/canola_growers_manual.aspx. Acesso em: 18 de novembro de 2010.
- TOMM, G. O. **Indicativos tecnológicos para produção de canola no Rio Grande do Sul**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007, 42p. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/canola/p_sp03_2007.pdf. Acesso em: 22/03/2010.
- TOMM, G. O. **Situação em 2005 e perspectivas da cultura de canola no Brasil e em países vizinhos**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005. 21p. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp26.htm. Acesso em: 22/03/2010.
- TSIMILLI-MICHAEL, M.; PÊCHEUX, M.; STRASSER, R. J. Light and heat stress adaptation of the symbionts of coral reef and temperate foraminifers probed in hospite by the chlorophyll a fluorescence kinetics O-J-I-P. **Naturforschung**, v. 54C, p. 671-680, 1999.
- TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. In vivo assessment of plants vitality: applications in detecting and evaluating the impact 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**, 3rd edition Springer, Dordrecht, p. 679-703, 2008.

- VAN DER STRAETEN, D.; ZHOU, Z.; PRINSEN, E.; VAN ONCKELEN, H. A.; VAN MONTAGU, M. C. A comparative molecular-physiological study of submergence response in lowland and deepwater rice. **Plant Physiology**, v. 125, p. 955-68, 2001.
- VOESENEK, L. A. C. J.; RIJNDERS, J. H. G. M.; PEETERS, A. J. M.; VAN DE STEEG, H. M.; KROON, H. Plant hormones regulate fast shoot elongation underwater: from genes to communities. **Ecology**, v. 85, p. 16-27, 2004.
- YIN, D.; CHEN, S.; CHEN, F.; GUAN, Z.; FANG, W. Morpho-anatomical and physiological responses of two *Dendranthema* species to waterlogging. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, p. 122-130, 2010.
- YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N. B. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1428-1438, 2010.