

MARCOS ROGÉRIO TÓTOLA

CINÉTICA DA FLUORESCÊNCIA E ATIVIDADE DO SISTEMA
ANTIOXIDATIVO EM PLANTAS DE EUCALIPTO COM MICORRIZAS
SOB TEMPERATURA SUPRA-ÓTIMA

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Curso de Fisiologia
Vegetal, para obtenção do título de
“Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
JANEIRO DE 1999

MARCOS ROGÉRIO TÓTOLA

CINÉTICA DA FLUORESCÊNCIA E ATIVIDADE DO SISTEMA
ANTIOXIDATIVO EM PLANTAS DE EUCALIPTO COM MICORRIZAS
SOB TEMPERATURA SUPRA-ÓTIMA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

APROVADA: 27 de novembro de 1998.

Prof. Marco Antonio Oliva Cano
(Conselheiro)

Prof. Carlos Alberto Martinez Y Huaman
(Conselheiro)

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva

Prof. Fábio Murilo da Matta

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Orientador)

À minha esposa, Cássia, e aos meus filhos, Paolo e Ana.

AGRADECIMENTO

À minha esposa Cássia, que tornou possível esta realização, pela ajuda, pelo amor e pela compreensão.

Aos meus filhos, Paolo e Ana, que são o meu maior incentivo.

Aos meus pais e irmãos, pelo carinho e pela confiança.

À Universidade Federal de Viçosa e ao CNPq, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao curso de Fisiologia Vegetal, por ter me acolhido e pela confiança.

Ao Prof. Arnaldo Chaer Borges, pela orientação, pela compreensão e pela amizade.

Aos Profs. Marco Antonio Oliva Cano, Paulo Roberto Mosquim e Carlos Alberto Martinez Y Huaman, pelo aconselhamento.

Aos professores do curso de Fisiologia Vegetal, pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pelo apoio irrestrito.

Aos companheiros do Laboratório de Micorrizas, pela cooperação e pela convivência feliz.

Aos colegas de curso, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e do curso de Fisiologia Vegetal, pela colaboração e pela amizade.

Ao Guilherme, ao Marcos Soares e à Leila, pelas intermináveis cinéticas enzimáticas.

Aos amigos Maurício, Maurílio e Denise, pela paciência e pelas discussões.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Marcos Rogério Tótola, filho de Primo Silvestre Tótola e Therezinha Maria Faustini Tótola, nasceu em 9 de setembro de 1965, em Rio Piracicaba, MG.

Em 1990, graduou-se Engenheiro-Agrônomo pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em 1993, concluiu o Mestrado em Microbiologia Agrícola na mesma Instituição.

Em 1994, iniciou o curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal também na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em novembro de 1998.

CONTEÚDO

EXTRATO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Origem e formação das espécies ativadas de oxigênio	6
2.1.1. Oxigênio singlete	6
2.1.2. Superóxido	7
2.1.3. Peróxido de hidrogênio	8
2.1.4. Radical hidroxil	9
2.1.5. Sistemas antioxidativos	9
2.2. Relação entre temperatura supra-ótima, formação de radicais livres e a redução da capacidade fotossintética: o fenômeno da fotoinibição	15
2.3. Objetivo	20

CAPÍTULO 1	21
CINÉTICA DA FLUORESCÊNCIA EM PLANTAS MICORRÍZICAS DE <i>Eucalyptus grandis</i> SOB TEMPERATURA E IRRADIÂNCIA SUPRA-ÓTIMAS.....	21
1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. Material biológico.....	24
2.2. Avaliação da emissão de fluorescência	25
2.3. Aquisição de termotolerância após pré-aclimação à temperaturasubletal e baixa irradiância	26
2.4. Avaliações de índices de dano celular	26
3. RESULTADOS	28
3.1. Avaliação da emissão de fluorescência em resposta à temperatura e irradiância supra-ótimas	28
3.2. Aquisição de termotolerância em função do tempo de incubaçãosob temperatura supra-ótima e baixa irradiância	32
3.3. Avaliações de índices de dano celular	33
4. DISCUSSÃO	35
CAPÍTULO 2	39
ATIVIDADE DOS SISTEMAS ANTIOXIDATIVOS EM PLANTAS DE <i>Eucalyptus grandis</i> , NO FUNGO ECTOMICORRÍZICO <i>Pisolithus</i> sp. E EM ECTOMICORRIZAS EM RESPOSTA À EXPOSIÇÃO À TEMPERATURA SUPRA-ÓTIMA	39
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1. Avaliação dos isolados fúngicos	42

2.2. Atividade do sistema antioxidativo e danos celulares em <i>Pisolithus</i> sp. em resposta à incubação à temperatura supra-ótima	43
2.2.1. Determinação das atividades enzimáticas	43
2.2.2. Danos oxidativos “in vivo”	44
2.3. Avaliação do estresse oxidativo causado por temperatura supra-ótima em discos foliares de plantas de <i>Eucalyptus grandis</i>	45
2.3.1. Determinação das atividades enzimáticas	45
2.3.2. Avaliação de danos oxidativos a lipídios	46
2.4. Atividade da catalase, das peroxidases, da superóxido dismutase, danos oxidativos a lipídios e padrão eletroforético de isoenzimas de superóxido dismutase em raízes de <i>E. grandis</i> , ou em micorrizas formadas entre <i>E. grandis</i> e <i>Pisolithus</i> sp., em resposta à incubação à temperatura supra-ótima	47
2.4.1. Material biológico	47
2.4.2. Extração das enzimas	48
2.4.3. Avaliação de danos oxidativos a lipídios	48
2.4.4. Padrão eletroforético de isoenzimas da superóxido dismutase	48
3. RESULTADOS	50
3.1. Efeito da temperatura de incubação sobre o crescimento micelial de fungos ectomicorrízicos	50
3.2. Atividade da catalase, das peroxidases, da superóxido dismutase e danos oxidativos a lipídios no micélio de <i>Pisolithus</i> sp. em resposta à exposição à temperatura supra-ótima	55
3.3. Atividade da catalase, das peroxidases e da superóxido dismutase em folhas de <i>E. grandis</i> expostas à temperatura supra-ótima	56

3.4. Atividade da catalase, das peroxidases, da superóxido dismutase, danos oxidativos a lipídios e padrão eletroforético de isoenzimas de superóxido dismutase em raízes de <i>E.</i> <i>grandis</i> ou em micorrizas formadas entre <i>E. grandis</i> e <i>Pisolithus</i> sp., em resposta à incubação à temperatura supra-ótima	58
4. DISCUSSÃO	64
3. RESUMO E CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

EXTRATO

TÓTOLA, Marcos Rogério, D.S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 1999. **Cinética da fluorescência e atividade do sistema antioxidativo em plantas de eucalipto com micorrizas sob temperatura supra-ótima.** Orientador: Arnaldo Chaer Borges. Conselheiros: Marco Antônio Oliva Cano, Paulo Roberto Mosquim e Carlos Alberto Martinez y Huaman.

Plantas de *Eucalyptus grandis* foram aclimatadas a 25°C e 400 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em câmara de crescimento, e posteriormente submetidas a uma combinação de temperatura e irradiância supra-ótimas, 40°C e 1.200 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a fim de se avaliarem as respostas fisiológicas dessa espécie a uma condição potencialmente fotoinibitória. Não se observaram efeitos isolados da temperatura ou do excesso de irradiância sobre a eficiência fotoquímica do Fotossistema II (FS II), avaliada como a razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima (F_v/F_m), porém observou-se um efeito sinérgico desses dois fatores. A redução de F_v/F_m foi atribuída, primariamente, à redução da fluorescência máxima (F_m). A pré-aclimação dos discos foliares à temperatura de 35°C e baixa irradiância, 5 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por duas horas, resultou em aumento da tolerância à condição fotoinibitória. Pode-se inferir que a aquisição de tolerância à fotoinibição do PS II de *E. grandis* envolveu, primariamente, a alteração conformacional do centro de reação do PS II. Não se pode descartar o envolvimento da síntese de novo de proteínas neste processo, em razão do tempo

requerido para se observar a alteração. O funcionamento de alguns componentes do sistema antioxidativo foi avaliado no sistema *Eucalyptus-Pisolithus*, em resposta à elevação da temperatura de 25°C-28°C para 40°C. As alterações nas atividades de catalase (Cat), peroxidases não-específicas (Pod) e superóxido dismutase (Sod), em dois isolados fúngicos, traduziram estratégias diferentes de regulação do sistema antioxidativo. Houve reduções significativas nas atividades específicas da Cat, das Pod e da ascorbato peroxidase (AscPod), da atividade total da Sod e do teor de proteínas solúveis em folhas de *E. grandis*, após incubação a 40°C. Essas alterações refletiram no menor teor de clorofila *a* e no aumento do teor de malondialdeído, uma indicação de que houve peroxidação de lipídios. Em raízes, não se observou efeito significativo da temperatura sobre as atividades de Cat, Pod e Sod. Não se detectou atividade da AscPod nesse órgão. Houve redução significativa do teor de proteínas solúveis e aumento do teor de malondialdeído após incubação a 40°C, por três horas. As relações Sod:Cat e Sod:Pod nas micorrizas seguiram o padrão de aumento ou de redução observado no micélio dos dois isolados fúngicos. A atividade total da Sod foi maior do que nas raízes, a despeito da sua menor atividade nos micélios fúngicos. Este aumento resultou da indução de 4 a 5 novas isoenzimas de Sod do tipo Mn-Sod, todas de baixo peso molecular e com possível origem fúngica. O conjunto dos resultados obtidos permite inferir que o controle do sistema antioxidativo é exercido de forma mais eficiente nas micorrizas do que nos componentes individuais da associação mutualista. Este controle pode ser um dos responsáveis pelo benefício mútuo decorrente da associação simbiótica, especialmente observado em condições ambientais pouco favoráveis à sobrevivência dos organismos que dela participam.

ABSTRACT

TÓTOLA, Marcos Rogério, D.S., Universidade Federal de Viçosa, January, 1999. **Kinetic of the chlorophyll fluorescence and activity of the antioxidant system in mycorrhizal eucalypti under high temperature.** Adviser: Arnaldo Chaer Borges. Committee Members: Marco Antônio Oliva Cano, Paulo Roberto Mosquim and Carlos Alberto Martinez y Huaman.

Plants of *Eucalyptus grandis* were acclimated at 25°C and 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, in growth chamber, and thereafter submitted to a high temperature/irradiance of 40°C and 1,200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, in order to investigate the physiological response of this species to a potential photoinhibitory condition. Based on variable to maximum fluorescence ratio (Fv/Fm), isolated effects of both high temperature and irradiance upon the photochemical efficiency of photosystem II (PSII) were not observed, but a synergic effect of these parameters was found. The decline in Fv/Fm ratio resulted mainly from a quenched maximal fluorescence (Fm). By incubating the leaves at 35°C and at a low irradiance of 5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for two hours, a higher tolerance to the photoinhibitory treatment could be observed. Given the time required in the process of thermotolerance induction, the involvement of “de novo” protein synthesis can not be dismissed. Some components of the antioxidant system were evaluated in the *Eucalyptus-Pisolithus* association, in response to an increase in temperature from 25°C-28°C to 40°C. The changes in

the activity of catalase (Cat), non-specific peroxidases (Pod), and that of superoxide dismutase (Sod), in two fungal isolates, are evidences for different strategies of the antioxidant system regulation in these organisms. Significant decreases in the specific activity of Cat, Pod, and ascorbate peroxidase (AscPod), total activity of Sod and of soluble proteins were observed in leaves of *E. grandis* incubated at 40°C. These changes were accompanied by a lower chlorophyll *a* and a higher malondialdehyde content. In the root system, significant effects of the temperature upon the activities of Cat, Pod, and Sod were not observed, and AscPod activity was not detected in that organ. A significant decrease in protein and a rise in malondialdehyde content were observed after incubation of the roots at 40°C for three hours. The Sod:Cat and Sod:Pod ratios in mycorrhizas followed the pattern of increase or decrease observed in the mycelium of the two fungal isolates. The total activity of Sod in the mycorrhizas was higher than that of the roots, despite its lower activity in the mycelium. This increase was attributed to the induction of 4 to 5 new Sod isozymes of the Mn-Sod class, all of low molecular weight and possibly coded by the fungal genome. The results obtained in this work indicate that the control of the antioxidant system is exerted more efficiently in the mycorrhizas than in the individual components of the association. This control may be partly responsible for the mutual benefits resulting from the symbiotic association, especially under environmental conditions less favorable to the survival of the symbionts.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que, em função dos fatores de estresse de natureza físico-química, a produtividade das culturas agrícolas seja de apenas 22% do potencial genético das plantas (BOYER, 1982). Os processos fisiológicos ligados à aclimatação e adaptação, bem como os mecanismos de injúria decorrentes da exposição aos fatores de estresse, são, assim, da maior importância prática.

A maioria das espécies vegetais utilizadas pelo setor de reflorestamento, no Brasil, são pertencentes aos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*. Grande parte dos plantios comerciais estão localizados em regiões sujeitas a fortes extremos ambientais, como excesso de temperatura, alta irradiância e baixa pluviosidade. As empresas do setor têm conduzido programas intensivos de seleção e de melhoramento de espécies ou clones mais adaptados a algumas condições específicas de estresse.

Plantas pertencentes àqueles dois gêneros caracterizam-se pela formação de um tipo de relação simbiótica-mutualista com certos fungos do solo, as micorrizas. Essa associação é considerada essencial para a sobrevivência dos dois organismos (HARLEY e SMITH, 1983), tendo sido um fator decisivo para a colonização inicial do ambiente terrestre pelas plantas há cerca de 400 milhões de anos (PYRONZINSKI e MALLOCK, 1975).

Ao longo desses 400 milhões de anos de co-evolução, estabeleceu-se uma nítida interdependência entre os dois organismos envolvidos na associação micorrízica. A maior parte dos trabalhos envolvendo o estudo dessa associação, mesmo aqueles que avaliam alguns fatores físico-químicos do ambiente, trata primariamente dos ganhos de produção da planta hospedeira. Essa visão parece um tanto quanto limitada e tende a desconsiderar os efeitos dos fatores estudados sobre o outro componente da associação, o fungo micorrízico, e a sua importância não só para a sobrevivência da planta, mas, também, como parte integral e essencial de muitos ecossistemas terrestres (READ, 1991; SÖDERSTRÖM, 1991).

Enquanto em ambientes adequados ao crescimento o desempenho das plantas é avaliado em termos de produção, em habitats marginais a sobrevivência precede a produtividade como elemento chave da adaptação. Numerosos estudos têm investigado a capacidade dos fungos micorrízicos aumentarem a produção vegetal nesses ambientes, sendo poucos os trabalhos que examinam a sua importância como fator de sobrevivência das plantas. Embora um aumento de produção seja de importância, do ponto de vista puramente econômico, o padrão de sobrevivência é a característica ecológica mais crucial, uma vez que é ela quem determina a composição de espécies das comunidades vegetais naturais (READ, 1991).

Na literatura consultada, são poucos os trabalhos que examinam com detalhes os fatores capazes de afetar a sobrevivência de fungos micorrízicos específicos em seus habitats naturais. Ao contrário, os efeitos de fatores físico-químicos sobre as plantas e, em especial, da temperatura são amplamente relatados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Poucas espécies vegetais sobrevivem sob temperaturas contínuas acima de 45°C. A temperatura é um fator predominante na distribuição geográfica dos organismos vivos. Em plantas mesofíticas típicas, um aumento da temperatura foliar 4-5°C acima da temperatura do ar ambiente pode ocorrer facilmente sob alta irradiância, especialmente se a velocidade do vento é baixa e um déficit hídrico no solo leva ao fechamento parcial dos estômatos (TAIZ e ZEIGER, 1991). Tanto a fotossíntese como a respiração são inibidas sob temperaturas supra-ótimas. Porém, à medida que a temperatura aumenta, a taxa fotossintética decresce mais rapidamente que a respiração (BJÖRKMAN et al., 1980).

A estrutura e a estabilidade das membranas celulares são importantes durante o estresse imposto por temperaturas elevadas. A fluidez excessiva dos lipídios de membranas em altas temperaturas é correlacionada com a perda da função fisiológica. Em plantas de *Nerium oleander*, a aclimatação a temperaturas supra-ótimas está associada ao maior grau de saturação dos ácidos graxos dos lipídios, o que torna as membranas menos fluidas (RAISON et al., 1982). A força das pontes de hidrogênio e das interações eletrostáticas entre os grupos polares da fase aquosa da membrana decresce, o que resulta numa associação mais forte entre as proteínas integrais da membrana e a sua fase lipídica (TAIZ e ZEIGER, 1991). Temperaturas elevadas causam, assim, modificações importantes na

composição e na estrutura de membranas, resultando em perda de íons e na inibição de processos metabólicos importantes, como fotossíntese e respiração.

Um aspecto comum aos organismos vivos, quando submetidos a fatores físico-químicos capazes de resultar em estresse, é a geração de formas ativadas do oxigênio, os radicais livres. Esses radicais são formados basicamente da doação de elétrons ou de energia para átomos de oxigênio. Esse elemento, no seu estado fundamental, pode ser considerado como um radical (com dois elétrons não-pareados de “spins” paralelos), mas é a forma mais estável do oxigênio. Os “spins” paralelos fazem com que o oxigênio aceite somente um elétron de cada vez e que reaja com não-radicais apenas lentamente, porque os elétrons de valência dos não-radicais são pareados e antiparalelos (FOYER et al., 1994). Oxigênio singleto é produzido pela adição de energia, sem que ocorra a adição de um elétron. O “spin” é antiparalelo e faz com que a capacidade de oxidação seja consideravelmente maior. A adição de um elétron ao oxigênio no estado fundamental resulta no radical superóxido, enquanto um elétron adicional produz o peróxido de hidrogênio (FOYER et al., 1994). Outro radical derivado do oxigênio, o radical hidroxil, é também altamente reativo (ASADA, 1994).

Radicais livres derivados do oxigênio são, pois, resultados de reações do oxigênio com os elétrons que escapam das cadeias de transporte de elétrons em mitocôndrias e em cloroplastos. Quando os sistemas de captação de luz do cloroplasto recebem um excesso de energia luminosa, há quatro rotas possíveis para dissipação do excesso de energia: ela pode ser perdida por dissipação térmica ou por emissão de fluorescência; pode ser absorvida pela cadeia de transporte de elétrons, caso esta esteja funcionando no seu potencial máximo; ou pode interagir com átomos de oxigênio, dando origem às diversas formas ativadas de oxigênio (SALIN, 1988).

A Figura 1 mostra uma visão simplificada de como os radicais livres podem ser gerados em cloroplastos. O oxigênio singleto resulta da absorção do excesso de energia das moléculas de clorofila. O radical superóxido origina-se da doação de elétrons que circulam via carregadores na cadeia de transporte de elétrons. A ação da enzima superóxido dismutase, na etapa inicial do sistema

antioxidativo, resulta na formação de peróxido de hidrogênio, enquanto o radical hidroxil é formado a partir do peróxido de hidrogênio nas reações de Fenton ou de Haber-Weiss (ASADA, 1994).

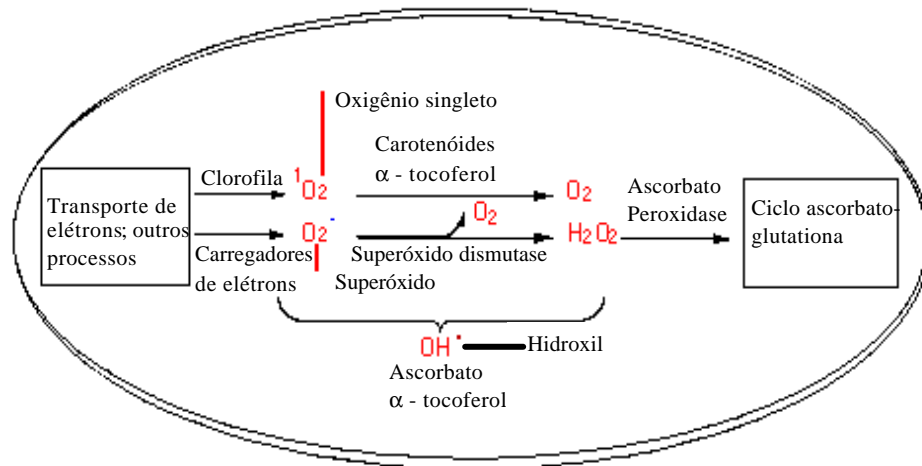


Figura 1 – Geração de formas ativadas de oxigênio e mecanismos de decomposição (adaptada de FOYER, LELANDAIS e KUNERT, 1994).

Espécies ativadas do oxigênio apresentam uma variedade de efeitos danosos às células. Os radicais hidroxil e oxigênio singlete são altamente reativos, podendo oxidar a maioria dos compostos orgânicos (IMLAY e LINN, 1988). O peróxido de hidrogênio, originado da ação da superóxido dismutase, deve ser removido rapidamente, porque muitas enzimas do ciclo de redução do CO_2 são sensíveis ao H_2O_2 , e a reação de fixação do CO_2 é inibida na presença desse radical (KAISER, 1976, 1979; ROBINSON et al., 1980). O peróxido de hidrogênio participa de sistemas de oxidação catalisados por metais, marcando proteínas para degradação (LEVINE et al., 1990; PACIFICI e DAVIES, 1990; STADTMAN e OLIVER, 1991).

Células vegetais fotossinteticamente ativas apresentam maior probabilidade de sofrerem danos oxidativos, dada a alta concentração de O_2

durante a fotossíntese e a abundância de pigmentos fotossensíveis e ácidos graxos poliinsaturados no envelope do cloroplasto e nos tilacóides (FOYER et al., 1994). Estima-se que cerca de 1% do oxigênio consumido pelas plantas é convertido em formas ativadas (ASADA e TAKAHASHI, 1987) em diferentes regiões subcelulares. O resultado cumulativo da geração de um excesso de radicais livres é a inibição da biossíntese e o comprometimento da estrutura do cloroplasto, sendo esses efeitos exacerbados por diferentes fatores de estresse ambiental.

Uma vez que os elétrons excitados e o excesso de energia são transferidos para o oxigênio, a formação de espécies ativadas de oxigênio funciona como um escoadouro de energia, protegendo o sistema de transporte de elétrons da super-redução, a qual resulta no processo de fotoinibição (FOYER et al., 1994). Desse modo, se as formas ativadas de oxigênio podem ser eliminadas eficientemente, o sistema antioxidativo pode ser considerado um importante componente da dissipação do excesso de energia.

2.1. Origem e formação das espécies ativadas de oxigênio

2.1.1. Oxigênio singlete

Oxigênio singlete pode ser formado química ou fotoquimicamente. Um exemplo de formação química é como um subproduto da atividade da lipoxigenase. É formado fotoquimicamente pela captação de energia da clorofila, especialmente quando um excesso de energia luminosa incide sobre o aparato fotossintético. Clorofila excitada no estado singlete, do sistema de captação de energia, é convertida em clorofila tripleto caso a energia de excitação não seja utilizada ou dissipada por transporte de elétrons, emissão de fluorescência ou dissipação térmica. A clorofila tripleto excitada converte então o oxigênio no estado fundamental em oxigênio singlete, pela elevação dos elétrons de valência a orbitais de maior energia e, subsequentemente, invertendo os “spins” para criar

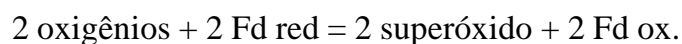
um par antiparalelo (FOYER et al., 1994). A produção de oxigênio singlete depende, assim, da taxa de dissipação térmica e do transporte de elétrons.

O oxigênio singlete é altamente destrutivo, porque é capaz de reagir com a maioria das moléculas orgânicas a taxas controladas quase totalmente pela difusão, ou seja, a reação é limitada apenas pela velocidade com que ele se difunde (CADENAS, 1989). Esse radical participa de reações de adição a enos e dienos, formando hidroperóxidos e endoperóxidos (FOOTE, 1979; KRINSKY, 1979), os quais propagam reações em cadeia de geração de radicais livres. Em sistemas biológicos, a peroxidação de lipídios resulta no enfraquecimento e na alteração das membranas.

2.1.2. Superóxido

O radical superóxido pode ser formado enzimaticamente por flavoproteína desidrogenases, ou não-enzimaticamente pela auto-oxidação de ferredoxinas, hidroquinonas, tióis e hemeoproteínas reduzidas (FRIDOVICH, 1986).

Como pode ser visto na Figura 2, a ferredoxina e outros carregadores de elétrons no lado redutor do Fotossistema 1 (FS1) possuem potenciais eletroquímicos suficientemente negativos para doar um elétron para o oxigênio (ASADA e TAKAHASHI, 1987). A maior parte da produção de superóxido nessa rota ocorre via ferredoxina (FURBANK e BADGER, 1983) e pela reação de Mehler:



A ação do superóxido sobre as células não é tão danosa quanto a de outras espécies ativadas de oxigênio, embora este radical esteja envolvido, possivelmente, com a peroxidação de lipídios, danos às membranas e quebras em fitas simples de DNA (FRIDOVICH, 1986). Mais importante é que ele pode reagir com o peróxido de hidrogênio, originando o radical hidroxil, na reação de Haber-Weiss catalisada por metais (ASADA, 1994). Causa, ainda, a inativação

da catalase e da glutathiona peroxidase, bem como a oxidação de NADPH e de epinefrina (FRIDOVICH, 1986).

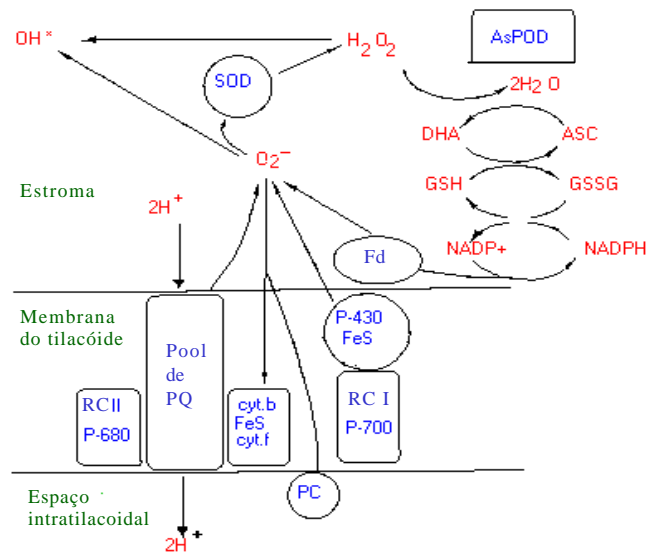


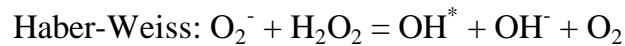
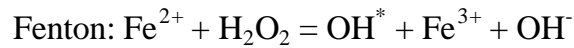
Figura 2 – Geração de oxiantermediários pelo cloroplasto e sistemas endógenos de proteção. (OH^*) radical hidroxil; (SOD) superóxido dismutase; (O_2^-) superóxido; (Fd) ferredoxina; (RCI e RCII) centros de reação dos Fotossistemas I e II; (Pc) plastocianina; (A) ascorbato peroxidase; (B) deidroascorbato redutase; (C) glutathiona redutase (adaptada de SALIN, 1988).

2.1.3. Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio pode ser produzido durante a oxidação do glicolato no peroxissoma (TAIZ e ZEIGER, 1991). É formado, ainda, pela ação da superóxido dismutase sobre o radical superóxido. O peróxido de hidrogênio é a mais estável das espécies de oxigênio. É um forte oxidante nucleofílico, embora relativamente não-reativo. É responsável pela inibição de enzimas do ciclo de Calvin (KAISER, 1976) e de outras enzimas, por meio da oxidação de pontes S-H. O peróxido de hidrogênio pode ser convertido em radical hidroxil por meio das reações de Fenton e de Haber-Weiss.

2.1.4. Radical hidroxil

O radical hidroxil é formado pela reação de Fenton, catalisada por metais, e pela de Haber-Weiss, como se segue:



O radical hidroxil é altamente reativo, oxidando a maioria dos compostos orgânicos a taxas controladas quase totalmente por difusão (ASADA, 1994). Dada a sua elevada reatividade, é um composto indiscriminado, reagindo com o primeiro substrato disponível. Possui, assim, um elevado potencial destrutivo e mutagênico. Membranas do cloroplasto são particularmente suscetíveis, por estarem intimamente ligadas ao local de formação desse radical (ASADA, 1994).

2.1.5. Sistemas antioxidativos

Em face da espontaneidade das reações envolvidas com a geração de radicais livres, os organismos que possuem um modo de vida aeróbio desenvolveram sistemas eficientes de remoção das espécies reativas de oxigênio.

A proteção dos cloroplastos contra o estresse oxidativo é, portanto, essencial e, em condições normais, uma proteção adequada é obtida pelo sistema antioxidativo das plantas (ASADA e TAKAHASHI, 1987). O radical superóxido é eliminado pela ação da superóxido dismutase (superóxido:superóxido oxidoreductase, E.C. 1.15.1.1); o peróxido de hidrogênio pela catalase (H_2O_2 : H_2O_2 oxidoreductase, E.C. 1.11.1.6), pela ascorbato peroxidase (ascorbato: H_2O_2 oxidoreductase, E.C. 1.11.1.7) e pelo ciclo ascorbato-glutationa; os radicais hidroxil e oxigênio singlete são eliminados não-enzimaticamente por meio de reações com ascorbato, carotenóides e α -tocoferol (ASADA, 1994).

A Figura 3 mostra a localização e a seqüência de parte da rota antioxidativa. É neste ponto, a seqüência de reação Mehler-peroxidase, que o sistema atua na regulação do transporte de elétrons, onde torna-se importante

como modulador do decréscimo na eficiência quântica dos fotossistemas (Neubauer e Schreiber, 1989, citados por DODD, 1996). Esse efeito resulta da geração de gradientes de prótons transtilacoidais, acoplada ao fluxo pseudocíclico. A seqüência de reação Mehler-peroxidase, juntamente com a fotorrespiração, é um componente importante do controle fotossintético, a regulação global do transporte fotossintético de elétrons (FOYER et al., 1990).

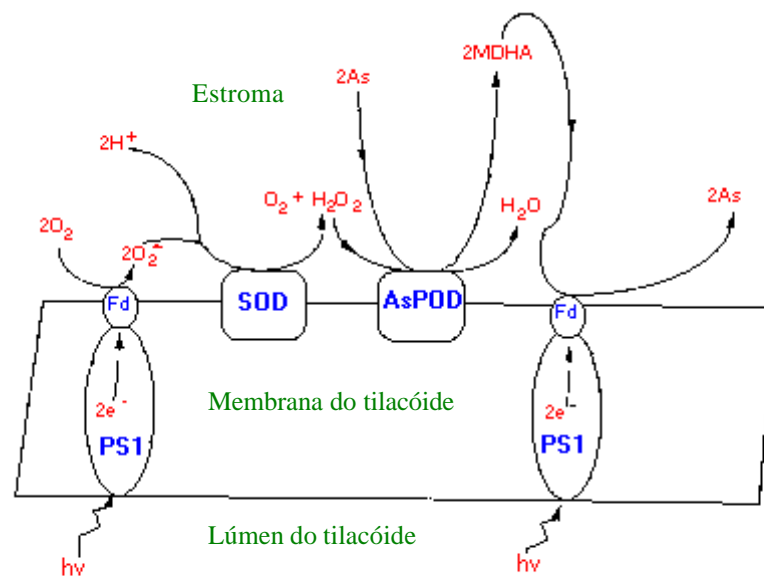


Figura 3 – Seqüência de reação Mehler-peroxidase associada à membrana do tilacóide: (Asc) ascorbato; (MDHA) monodeidroascorbato; (O_2^-) superóxido; (SOD) superóxido dismutase; (AsPOD) ascorbato peroxidase; (Fd) ferredoxina; (FSI) fotossistema I (adaptada de FOYER, LELANDAIS e KUNERT, 1994).

A Figura 4 mostra o ciclo ascorbato-glutationa. Este ciclo mantém um alto nível de ascorbato (50 mol m^{-3}) no estroma. O radical monodeidroascorbato (MDHA), formado a partir da oxidação do ascorbato, pode sofrer dismutação espontânea e formar ácido ascórbico reduzido (Asc) e deidroascorbato (DHA), ou ser enzimaticamente reduzido a Asc por MDHA redutase dependente de NAD(P)H (DALTON et al., 1992; HOSSAIN et al., 1984). Deidroascorbato é novamente reduzido a Asc não-enzimaticamente por glutatona reduzida, ou

enzimaticamente em uma reação catalisada por DHA redutase (glutaciona:deidroascorbato oxidoreductase, E.C. 1.8.5.1) (POLLE et al., 1992). Glutaciona na forma oxidada (GSSG), resultante dessa reação, é convertida novamente a GSH por glutaciona redutase dependente de NADPH (NADPH:glutaciona oxidada oxidoreductase, E.C. 1.6.4.2) (Foyer et al., 1991, citados por GOSSET et al., 1994). Ascorbato peroxidase, deidroascorbato redutase e glutaciona redutase participam da rota Halliwell-Asada, a qual remove H_2O_2 em cianobactérias, em cloroplastos e em nódulos radiculares (DALTON et al., 1986).

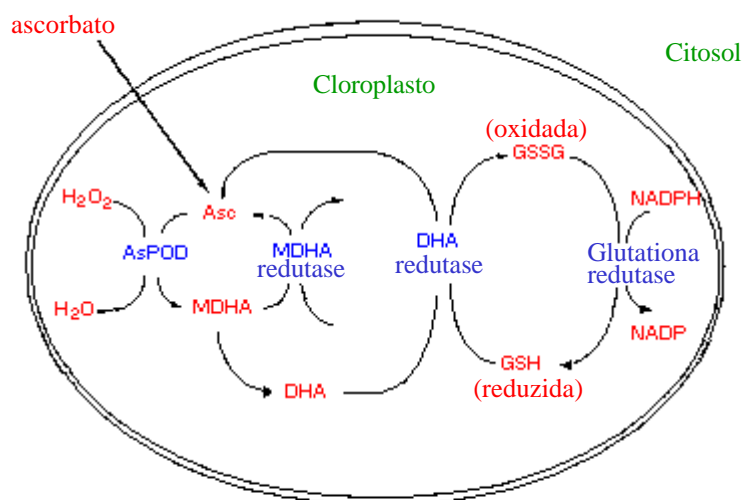


Figura 4 – O ciclo ascorbato-glutaciona (adaptada de FOYER, LELANDAIS e KUNERT, 1994).

O ascorbato pode ser também oxidado por reação direta com O_2^- , ou servir como redutor do radical α -cromoxil de α -tocoferol oxidado (Foyer et al., 1991, citados por GOSSET et al., 1994). As membranas do tilacóide são ricas em α -tocoferol, o qual interrompe as reações de peroxidação de lipídios não apenas por reagir com O_2^- , mas também por eliminar radicais hidroxil, peroxil e alcoxil (HALLIWELL, 1987). Compostos reativos a ácido tiobarbitúrico (TBA), como

malondialdeído, podem ser formados (PRYOR et al., 1976), caso a peroxidação em membranas não seja suficientemente inibida.

Quando as plantas são expostas a fatores físico-químicos extremos, a exemplo de alta intensidade luminosa, extremos de temperatura, seca, ozônio, tratamentos com herbicidas ou deficiência mineral, o balanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a atividade de antioxidantes é destruído, resultando normalmente em danos oxidativos (CAKMAC e MARSCHNER, 1992; DHINDSA e MATOWE, 1981; FANGMEIER et al., 1994; GOSSETT et al., 1994; HARPER e HARVEY, 1978; MONK e DAVIES, 1989; MORAN et al., 1994; POLLE et al., 1992; SPYCHALLA e DESBOROUGH, 1990; WISE e NAYLOR, 1987). Existem três modos pelos quais o estresse oxidativo pode ser exacerbado pelos fatores ambientais. Esses fatores podem estar diretamente ligados à produção de radicais livres, ou podem inibir o sistema de defesa antioxidativo, levando assim a um aumento indireto dos níveis de espécies reativas de oxigênio. O estresse ambiental pode, ainda, causar perturbações em rotas biossintéticas, afetando a capacidade de dissipação do excesso de energia e, assim, levar à geração das formas ativadas do oxigênio (SALIN, 1988).

Em geral, a exposição dos organismos a algum fator de estresse ambiental resulta no aumento da atividade do seu sistema antioxidativo (DHINDSA e MATOWE, 1981; GOSSETT et al., 1994; HARPER e HARVEY, 1978; MONK e DAVIES, 1989; SPYCHALLA e DESBOROUGH, 1990; WISE e NAYLOR, 1987). A consistência da resposta aos diferentes fatores de estresse indica a existência de uma rota comum para alterações celulares induzidas para a sua proteção.

O aumento da atividade das rotas antioxidativas não está relacionado apenas com o aumento da quantidade de enzimas, mas também com a maior afinidade das enzimas pelos seus substratos. Condições de estresse levam à produção de diferentes isoformas com diferentes afinidades pelo substrato (DRUMM-HERREL et al., 1989; EDWARDS et al., 1994; MATTERS e SCANDALIOS, 1986). O ajuste balanceado dos níveis das diferentes isoformas

com diferentes afinidades pode configurar-se como a estratégia mais significativa para a mobilização do sistema de defesa antioxidativo.

A literatura sobre danos oxidativos a plantas não inclui trabalhos avaliando o sistema antioxidativo de espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus*, relacionando-o a fatores de estresse específicos. Também os trabalhos sobre a atividade do sistema antioxidativo de fungos ectomicorrízicos, sob estresse ambiental, são escassos (MISZALSKI e BOTTON, 1996). Em plantas de *Pisum sativum*, a atividade da superóxido dismutase é maior no sistema radicular de plantas colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares (ARINES et al., 1994a). Essa maior atividade parece estar relacionada a um aumento da atividade específica das isoenzimas, uma vez que não se verificou o aparecimento de novas isoenzimas em micorrizas. ARINES et al. (1994b) sugerem que o aumento da sobrevivência e do vigor de plantas micropropagadas, quando associadas a fungos micorrízicos, pode estar relacionado com a regulação da expressão do sistema antioxidativo e, em especial, da superóxido dismutase. RUIZ-LOZANO et al. (1996) observaram um aumento significativo na atividade da superóxido dismutase em plantas micorrízicas de *Lactuca sativa* expostas a estresse hídrico, comparadas a plantas não-micorrízicas. A adição de sulfeto ao meio de crescimento, em concentrações variando entre 5 e 20 mol m⁻³, resultou na inibição do crescimento do fungo ectomicorrízico *Rhizopogon roseolus* e da atividade da superóxido dismutase (MISZALSKI e BOTTON, 1996).

Mais importante que a escassez de trabalhos sobre o funcionamento do sistema antioxidativo em fungos micorrízicos é a completa falta de informações do efeito de sua associação com a planta sobre a regulação desse sistema, assim como de sua importância como fator de sobrevivência do fungo em face das variações ambientais. Sabe-se, no entanto, que os fungos ectomicorrízicos são incapazes de completar o ciclo de vida em ambientes naturais, sem estarem associados a um hospedeiro específico (MARX, 1991; SMITH e READ, 1997).

Demonstrou-se, recentemente, que, durante o estabelecimento da associação micorrízica, ocorre uma alteração substancial da expressão de genes tanto na planta quanto no fungo. A colonização da planta hospedeira pelo fungo

micorrízico e a morfogênese dos tecidos simbióticos induzem a expressão de um grupo específico de proteínas do hospedeiro (MARTIN e HILBERT, 1991; MARTIN et al., 1997) e de alguns genes do micossimbionte (TAGU et al., 1993). Os produtos desses genes induzidos durante a infecção parecem estar envolvidos com o estabelecimento e a manutenção da interação compatível entre o fungo micorrízico e a planta.

Em *Eucalyptus*, o desenvolvimento das ectomicorrizas é acompanhado por um acúmulo diferencial de polipeptídios, podendo essas alterações serem divididas em três categorias distintas: (i) polipeptídios, principalmente de origem vegetal, presentes em menor quantidade nos tecidos simbióticos; (ii) um pequeno grupo de polipeptídios que se acumulam; e (iii) polipeptídios específicos da simbiose, os quais somente são expressos quando do estabelecimento da simbiose (HILBERT e MARTIN, 1988; HILBERT et al., 1991). As alterações na síntese de polipeptídios parecem estar ligadas à compatibilidade entre o fungo micorrízico e a planta hospedeira. Durante o desenvolvimento de micorrizas entre *Pisolithus tinctorius* e *Eucalyptus grandis*, ocorrem uma forte inibição da síntese de alguns polipeptídios vegetais, o acúmulo de alguns polipeptídios fúngicos e o aparecimento de polipeptídios específicos da simbiose, as chamadas “micorrizinas” (BURGESS et al., 1995). Os autores demonstraram que o isolado fúngico não-micorrízico não causou alterações na biossíntese de proteínas, mas, ao contrário, observaram essas alterações desde o contato inicial entre a raiz e o isolado fúngico mais infectivo. Também a regulação temporal da síntese de polipeptídios fúngicos relacionados com a simbiose correlacionou-se estreitamente com a infectividade do isolado. Uma revisão mais detalhada do assunto pode ser obtida em MARTIN et al. (1997).

Os fungos ectomicorrízicos utilizam algumas enzimas específicas durante o processo de colonização radicular (Hacskeylo, 1973, citado por MARX, 1981). Muitos isolados perdem a capacidade de colonizar a raiz da planta após períodos prolongados de cultivo em meio ágar (MARX e DANIEL, 1976). Os trabalhos que demonstram a regulação da expressão gênica na planta e no fungo durante o processo de colonização (MARTIN et al., 1997) suportam a

sugestão de que as enzimas adaptativas necessárias ao processo de colonização em culturas de fungos ectomicorrízicos podem estar expressando menor atividade (MARX, 1981). A constatação da existência de padrões distintos de síntese de proteínas durante o desenvolvimento das micorrizas sugere que, após o contato entre os simbiossiontes, muitos genes são ligados ou desligados nas células do fungo e da planta (GIANINAZZI-PEARSON e GIANINAZZI, 1989; MARTIN e HILBERT, 1991; TAGU et al., 1993).

Embora muitos dos produtos desses genes já tenham sido identificados (MARTIN et al., 1997), não há, aparentemente, relatos na literatura associando a alteração da expressão genética ao fato de as plantas micorrízicas serem mais tolerantes aos fatores ambientais de estresse. Mais importante é que não explicam o fato de os fungos ectomicorrízicos sobreviverem em ambientes naturais sob um arranjo de condições físico-químicas potencialmente de estresse, às quais são, em graus variáveis, extremamente sensíveis quando cultivados em laboratório.

2.2. Relação entre temperatura supra-ótima, formação de radicais livres e a redução da capacidade fotossintética: o fenômeno da fotoinibição

Níveis de radiação acima do requerido para saturar a fotossíntese causam uma severa redução da capacidade fotossintética (KYLE e OHAD, 1987), especialmente quando o excesso de radiação está associado a outros fatores ditos de estresse (BJÖRKMAN e POWLES, 1984; MASOJIDEK e HALL, 1992; POWLES, 1984). Por convenção, a inativação da fotossíntese por excesso de radiação é denominada fotoinibição. A fotoinibição crônica resulta do desbalanço entre a energia capturada pelo aparelho fotossintético e a energia utilizada durante a assimilação do CO₂ (OSMOND, 1994). Em condições em que a intensidade de fótons está acima da capacidade de sua utilização, o excesso de fótons resulta na produção de moléculas reativas nos cloroplastos, as quais são capazes de oxidar as moléculas-alvo e resultar no fenômeno de fotoinibição (ASADA, 1994). A proteína D1, do centro de reação do FSII, e diversas enzimas

do ciclo de Calvin, como bisfosfatase da frutose-1,6-bisfosfato e desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato, são o alvo primário do fenômeno da fotoinibição (ASADA, 1994). A inativação das moléculas-alvo primárias reduz a capacidade de utilização de fótons e potencializa a fotoprodução das moléculas reativas.

O fenômeno da fotoinibição associada a temperaturas supra-ótimas é atribuído a danos causados ao fotossistema II (FSII) (BERRY e RAISON, 1981; YORDANOV et al., 1986). Acredita-se que o aumento da temperatura leva, inicialmente, a um bloqueio dos centros de reação do FSII e, posteriormente, a uma separação entre os pigmentos de captação de luz periféricos e os complexos do FSII.

A inibição térmica inicial dos centros de reação do FSII é atribuída a alterações no sistema de decomposição de água/evolução de oxigênio (CHENIAE e MARTIN, 1970; NASH et al., 1985; YAMASHITA e BUTLER, 1968).

A estabilidade térmica de outros componentes da cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese (HAVAUX, 1993a), do envelope do cloroplasto (KRAUSE e SANTARIUS, 1975) e das enzimas do ciclo de Calvin localizadas no estroma do cloroplasto (BJÖRKMAN et al., 1976; SANTARIUS, 1975) é maior do que a do FSII. A temperatura na qual se observa a desnaturação do FSII varia em função de diversos fatores ambientais. Estresse hídrico (HAVAUX, 1992), salinidade (LARCHER et al., 1990) e intensidade luminosa moderada (SCHREIBER e BERRY, 1977; Havaux e Strasser, 1990, citados por HAVAUX, 1994) reduzem a sensibilidade térmica do FSII. A pré-aclimação da planta a uma temperatura supra-ótima, porém não-letal, resulta no aumento da estabilidade térmica do FSII (HAVAUX, 1993b, 1994). Além da adaptação lenta da fotossíntese a temperaturas supra-ótimas, na qual possivelmente há o envolvimento da síntese de novo de proteínas e de lipídios, existem processos adaptativos que modificam rapidamente a estabilidade térmica do aparato fotoquímico da fotossíntese (HAVAUX, 1993b, 1994; NISHIYAMA et al., 1993; SANTARIUS e MÜLLER, 1979).

Dentre os mecanismos relacionados com a proteção do aparato fotossintético em condições fotoinibitórias, a participação de proteínas induzidas por choque térmico codificadas no genoma nuclear, especialmente as de baixo peso molecular (Kruse e Kloppstech, 1992, citados por OHAD et al., 1994) associadas às membranas do cloroplasto, ou das proteínas intrínsecas da membrana do tilacóide induzidas por excesso de luz (ELIP), tem sido considerada um mecanismo adaptativo a condições fotoinibitórias. A elevada correlação entre a indução de ELIP em ervilha e sua persistência nas membranas do tilacóide durante a exposição a um excesso de luz (ADAMSKA et al., 1993) sugere que essa classe de proteínas está envolvida com o processo de giro da proteína D1 do FSII e com o fenômeno de ligação ou deslocamento de pigmentos (carotenóides ou clorofilas).

O deslocamento da clorofila do FSII para a fase lipídica da membrana do tilacóide, durante o processo de giro da proteína D1, pode ser potencialmente danoso. Durante a excitação por luz, moléculas livres de clorofila podem ser convertidas ao estado tripleto e reagir com o oxigênio, resultando na formação de oxigênio singlete (ASADA, 1994). Nesse caso, pode-se prever que os danos às membranas do tilacóide serão inespecíficos, uma vez que aquele radical é capaz de reagir indiscriminadamente com quaisquer moléculas orgânicas. A ocorrência desse tipo de dano não tem sido observada “in vivo” durante a fotoinibição, o que sugere que algumas dessas proteínas induzidas por estresse, de algum modo, são capazes de interagir com as moléculas de clorofila livres e bloquear a geração de oxigênio singlete durante o estresse luminoso e, ou, térmico (OHAD et al., 1994).

A presença de proteínas de choque térmico na região dos grana dos tilacóides de células de *Chlamydomonas* (SCHUSTER et al., 1988), ou em folhas de trigo (STAPEL et al., 1993), após pré-aclimação a 40-42°C por duas horas, correlaciona-se com a manutenção do valor da fluorescência variável da clorofila do FSII, após posterior exposição a uma combinação de excesso de irradiância e temperatura elevada.

Além do envolvimento de proteínas induzidas por temperaturas supra-ótimas, a reorganização da membrana do tilacóide parece estar também

relacionada com o mecanismo de termoproteção. A dissociação do FSII de alguns complexos de captação de luz tem sido observada em tilacóides isolados, após tratamento em temperaturas elevadas (GOUNARIS et al., 1984; SUNDBY et al., 1986). Sugere-se que o FSII dissociado é capaz de migrar lateralmente das regiões empilhadas para as não-empilhadas da membrana do tilacóide, deixando para trás o complexo proteína-clorofila livre. Alguns trabalhos indicam que essa reorganização da membrana induzida por temperaturas elevadas pode também ocorrer “in vivo” (ARMOND et al., 1980; SANE et al., 1984; WEIS, 1985), e representaria um mecanismo de prevenção da superexcitação e do posterior dano ao centro de reação do FSII em alta irradiância.

Em ambientes naturais, temperaturas elevadas estão normalmente associadas à alta irradiância solar. O excesso de luz resulta, normalmente, no agravamento do dano causado ao aparato fotossintético por temperaturas elevadas (HAVAUX, 1994).

O evento inicial da fotossíntese é a absorção dos fótons da radiação luminosa pelos complexos coletores de luz. A energia de excitação é, então, transferida aos centros de reação dos fotossistemas I e II (TAIZ e ZEIGER, 1991). A energia de excitação, canalizada para o centro de reação do FSII, é utilizada para a transferência de um elétron do P_{680} para a feofitina *a*, no processo conhecido como separação de carga. O elétron é transferido da feofitina *a* para a plastoquinona Q_A . Em situações em que o estoque de Q_A encontra-se totalmente reduzido, o centro de reação permanece num estado bloqueado, ou seja, incapaz de acoplar a energia de excitação à transferência de elétrons.

O elétron recebido por Q_A é transferido para a plastoquinona Q_B . Após receber dois elétrons, Q_B é capaz de receber dois prótons e se deslocar do centro de reação do FSII para o estoque de plastoquinonas. Após certo período na ausência de luz, todas as moléculas de Q_A transferiram seus elétrons e se encontram em estado oxidado. A posterior iluminação do aparato fotossintético resulta na emissão de fluorescência pelas moléculas de clorofila *a*, que, graficamente, pode ser representada por uma curva do tipo OI-DPSMT (WALKER, 1988). A fluorescência inicial (F_0) corresponde ao nível de

fluorescência \underline{Q} da curva OIDPSMT (VAN KOOTEN e SNEL, 1990). Em folhas previamente adaptadas à ausência de luz, F_0 representa a intensidade da fluorescência quando as moléculas de Q_A encontram-se totalmente oxidadas. Na fotoinibição clássica, geralmente se observa um aumento e posterior redução de F_0 (KRAUSE e WEIS, 1991). O aumento de F_0 parece estar associado à redução na eficiência de captura e transferência de energia pelo complexo coletor de luz do aparato fotossintético (KRAUSE e WEIS, 1991). De acordo com GUENTER e MELIS (1990), a fotoinibição resulta no desacoplamento entre o complexo coletor de luz e o centro de reação do FSII, impedindo a transferência de energia de excitação para o centro de reação, que, assim, deve ser perdida por emissão de fluorescência (aumento de F_0). Entretanto, quando o centro de reação do FSII encontra-se em estado inativo, contendo ainda a molécula de proteína D1 não-funcional, a energia de excitação transferida do complexo coletor de luz pode ser perdida na forma de calor (ARO et al., 1993). Nesse caso, o valor de F_0 tende a se manter inalterado.

A redução parcial de Q_A , após a iluminação, resulta no aumento da intensidade da fluorescência, que chega ao nível F_m (fluorescência máxima) quando o centro de reação encontra-se bloqueado (todas as moléculas de Q_A reduzidas). A diferença $F_m - F_0$ representa a fluorescência variável (F_v). A razão F_v/F_m é um importante indicador do estado funcional do aparato fotossintético, sendo uma estimativa da máxima eficiência quântica do FSII (BJÖRKMAN e DEMMIG, 1987; KITAJIMA e BUTLER, 1975). Fatores ambientais que resultam na redução da eficiência quântica do FSII causam uma redução nos valores de F_v/F_m , que, para a maioria das espécies, encontra-se em torno de $0,832 \pm 0,004$ (BJÖRKMAN e DEMMIG, 1987), quando as condições ambientais são favoráveis.

A avaliação da emissão de fluorescência pela clorofila *a* tem sido muito utilizada para se determinarem o estado fisiológico do FSII (KRAUSE e WEIS, 1991) e os efeitos de fatores físico-químicos sobre o funcionamento do aparato fotossintético (HAVAUX, 1993b, 1994; MARTINEZ y HUAMAN, 1995).

Recentemente, a técnica de avaliação da emissão de fluorescência tem sido utilizada para se determinarem os efeitos de fatores bióticos e abióticos sobre a capacidade fotossintética de plantas do gênero *Eucalyptus* (BALL et al., 1997; HOLLY et al., 1994; ÖGREN e EVANS, 1992; RODEN e BALL, 1996; RUTHERFORD et al., 1993). Entretanto, não se conhecem os efeitos da combinação entre alta temperatura e alta irradiância sobre a eficiência fotoquímica em plantas do gênero *Eucalyptus*, e nem de que forma as plantas se adaptam a essa condição potencialmente fotoinibitória.

2.3. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi verificar se o estabelecimento da associação micorrízica induz alterações qualitativas e quantitativas nos mecanismos de decomposição de radicais livres, e se essas alterações podem estar relacionadas com a maior tolerância dos organismos envolvidos na simbiose a temperaturas supra-ótimas. Adicionalmente, procurou-se avaliar se a associação micorrízica induz alterações fisiológicas que resultam em maior tolerância das plantas micorrízicas à fotoinibição, causada pela combinação entre temperatura e irradiância supra-ótimas.

CAPÍTULO 1

CINÉTICA DA FLUORESCÊNCIA EM PLANTAS MICORRÍZICAS DE *Eucalyptus grandis* SOB TEMPERATURA E IRRADIÂNCIA SUPRA- ÓTIMAS

1. INTRODUÇÃO

A produção primária, em diversos ecossistemas, está diretamente relacionada com a atividade fotossintética das plantas. A atividade de fotossíntese varia com as condições do ambiente, como luminosidade, temperatura, disponibilidade de água, de nutrientes, dentre outras (TAIZ e ZEIGER, 1991). Em situações em que um ou mais desses fatores encontram-se fora dos limites ideais para sustentar a atividade fotossintética, a produção primária do ecossistema tende a diminuir, afetando todas as demais reações que dependem da energia armazenada na forma de carbono orgânico (ATLAS e BARTHA, 1992).

Quando um excesso de radiação está associado a outros fatores ditos de estresse, as plantas sofrem uma severa redução da capacidade fotossintética (BJORKMAN e POWLES, 1984; MASOJIDEK e HALL, 1992; POWLES,

1984), um fenômeno convencionalmente conhecido por fotoinibição. Em cloroplastos, o excesso de energia da radiação luminosa pode reagir com átomos de oxigênio e levar à produção de radicais livres, os quais são capazes de oxidar alguns dos componentes do aparelho fotossintético e resultar no fenômeno de fotoinibição. A proteína D1 do centro de reação do FSII e diversas enzimas do ciclo de Calvin são o alvo primário do fenômeno da fotoinibição (ASADA, 1994). A inativação das moléculas-alvo primárias reduz a capacidade de utilização de fótons e potencializa a fotoprodução das moléculas reativas.

Temperaturas supra-ótimas podem aumentar os danos decorrentes do excesso de radiação por meio de mecanismos distintos. Um efeito direto está relacionado com o fechamento dos estômatos (TAIZ e ZEIGER, 1992) e, conseqüentemente, com a redução da disponibilidade de CO₂ para os cloroplastos. A energia absorvida pelo aparelho fotossintético não pode, neste caso, ser dissipada pela assimilação do CO₂, e a probabilidade da ocorrência da fotoinibição é maior (WALKER, 1988).

Temperaturas supra-ótimas podem, ainda, resultar em danos estruturais ao fotossistema II (FSII) (BERRY e RAISON, 1981; YORDANOV et al., 1986). A estabilidade térmica de outros componentes da cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese (HAVAUX, 1993a), do envelope do cloroplasto (KRAUSE e SANTARIUS, 1975) e das enzimas do ciclo de Calvin localizadas no estroma do cloroplasto (BJÖRKMAN et al., 1976; SANTARIUS, 1975) é bem maior do que a do FSII.

A pré-aclimação das plantas a uma temperatura supra-ótima, porém não-letal, resulta no aumento da estabilidade térmica do FSII (HAVAUX, 1993b, 1994). Além da adaptação lenta da fotossíntese a temperaturas supra-ótimas, na qual possivelmente há o envolvimento da síntese de novo de proteínas e de lipídios, existem processos adaptativos que modificam rapidamente a estabilidade térmica do aparato fotoquímico da fotossíntese (HAVAUX, 1993b, 1994; NISHIYAMA et al., 1993; SANTARIUS e MÜLLER, 1979).

Recentemente, a técnica de avaliação da emissão de fluorescência tem sido utilizada para se determinarem os efeitos dos fatores bióticos e abióticos

sobre a capacidade fotossintética das plantas, incluindo as do gênero *Eucalyptus* (BALL et al., 1997; HOLLY et al., 1994; ÖGREN e EVANS, 1992; RODEN e BALL, 1996; RUTHERFORD et al., 1993). Entretanto, não se conhecem os efeitos da combinação entre alta temperatura e alta irradiância sobre a eficiência fotoquímica em plantas do gênero *Eucalyptus*, e nem de que forma as plantas se adaptam a essa condição potencialmente fotoinibitória. Além disso, o efeito da associação ectomicorrízica sobre a atividade fotossintética de plantas de *E. grandis*, submetidas a essa condição ambiental, não foi até o momento relatada.

O objetivo deste trabalho foi examinar o efeito da combinação entre temperatura e irradiância supra-ótimas sobre a eficiência fotoquímica em plantas micorrízicas de *Eucalyptus grandis*, avaliada pela técnica de indução de fluorescência, e a ocorrência de mecanismos de termoproteção após aclimação a uma temperatura subletal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Plantas de *E. grandis* foram obtidas por germinação de sementes em bandejas, contendo areia lavada e esterilizada. Aos 20 dias, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos de 3 dm³, contendo o mesmo substrato. Os inóculos dos isolados de *Pisolithus sp.*, IS83 e RS24, foram preparados a partir da transferência de discos de ágar MNM (MARX, 1969), contendo o micélio fúngico, para placas de Petri, contendo ágar-água. Após quatro dias de incubação a 28°C, os discos que apresentavam crescimento micelial foram colocados no substrato em contato com as raízes das plântulas, no momento do transplante para os vasos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob luz natural por 100 dias. Semanalmente, aplicaram-se 100 mL de solução nutritiva, contendo ($\mu\text{mol L}^{-1}$): N, 4000; K, 800; Ca, 250; Mg, 250; S, 250; P, 40; Fe, 10; B, 10; Zn, 2; Mn, 2; Cu, 1; Mo, 0,1 (BRUNDRETT et al., 1996). Cinco dias antes das avaliações, as plantas foram transferidas para uma câmara de crescimento e mantidas sob irradiância de 400 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoper\u00edodo de 16 horas, temperatura de 24 ± 1 °C e umidade relativa do ar entre 50 e 75%.

2.2. Avaliação da emissão de fluorescência

Esta avaliação foi feita em discos de 10 mm de diâmetro, coletados de folhas dos ramos laterais localizados no terço superior das plantas. Foram utilizadas folhas do 1^o ou 2^o par, completamente expandidas, e que apresentavam uma relação F_v/F_m acima de 0,800.

Os discos foliares foram incubados em papel-filtro Whatman[®] N^o 4, umedecido com água destilada. O material foi transferido para placas metálicas mantidas em banho-maria com as seguintes combinações de temperatura/irradiância: (i) 25°C/1.200 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; (ii) 40°C/5 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; (iii) 40°C/1.200 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; (iv) 40°C/1.200 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, após incubação a 35°C/5 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 20 minutos. A iluminação foi proporcionada por lâmpadas incandescentes de 1.000 watts, colocadas acima de um tanque de vidro, contendo água circulante para evitar o sobreaquecimento do material vegetal.

A emissão de fluorescência foi avaliada durante 60 minutos após o início dos tratamentos, a cada 5 ou 10 minutos. Para cada tempo e combinação de temperatura/irradiância, utilizou-se um grupo de quatro discos foliares coletados de plantas diferentes. Os discos foram removidos e mantidos sob ausência de luz por 20 minutos, a 25°C, antes das medições. As avaliações da emissão de fluorescência foram feitas com um fluorômetro (Plant Efficiency Analyser, Hansatech, King's Lynn, Norkfolk, UK), que determina automaticamente os valores de F_0 , F_m , F_v e a razão F_v/F_m .

2.3. Aquisição de termotolerância após pré-aclimação à temperatura subletal e baixa irradiância

O efeito do tempo de incubação sob a combinação de temperatura supra-ótima, porém subletal, e baixa irradiância sobre a aquisição de termotolerância foi estudado utilizando-se o sistema descrito anteriormente.

Os discos foliares foram submetidos a uma combinação de 40°C/1.200 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 1 hora, após terem sido incubados a 35°C/5 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 20, 40 ou 120 minutos.

Para cada efeito de tempo, um grupo de quatro discos foi avaliado logo após os diferentes períodos de pré-aclimação. Um segundo grupo foi utilizado para as avaliações após o tratamento fotoinibitório. Esse procedimento foi adotado para se evitar que os efeitos da incubação a uma temperatura acima da de crescimento das plantas pudessem mascarar possíveis mecanismos de aclimação. Assim, os resultados obtidos após o tratamento fotoinibitório foram transformados em % dos valores encontrados imediatamente após os diferentes períodos de pré-aclimação a 35°C.

2.4. Avaliações de índices de dano celular

O efeito da temperatura supra-ótima sobre a peroxidação de lipídios e sobre o teor de pigmentos foi avaliado em discos foliares obtidos conforme descrito anteriormente. Os discos foram incubados em tampão (Tris-HCl, 20 mmol L^{-1} , pH 7,5; MgCl_2 , 5 mmol L^{-1} ; sacarose, 30 mmol L^{-1} ; cloranfenicol, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a 25°C/ 1.200 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por duas horas, a 40°C/ 1.200 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por uma hora, após incubação a 35°C/ 5 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por duas horas ou a 40°C/ 1.200 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por uma hora.

Os danos oxidativos a lipídios foram estimados como o conteúdo de substâncias reativas a 2-tiobarbitúrico (HENDRY et al., 1993). Clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides foram extraídos dos discos foliares em almofariz

contendo areia de quartzo e o meio de extração, composto de água desmineralizada, hidróxido de amônio e acetona na proporção de 90:1:409 (v:v), respectivamente. Os extratos foram diluídos no meio de extração, analisados espectrofotometricamente, e a concentração dos pigmentos foi estimada pelas fórmulas:

$$Cl a \mu\text{mol L}^{-1} = [(12,7 \times A_{663}) - (2,69 \times A_{645})] \times 1,119$$

$$Cl b \mu\text{mol L}^{-1} = [(22,9 \times A_{645}) - (4,68 \times A_{663})] \times 1,102$$

$$Cl Total \text{ mg L}^{-1} = (8,02 \times A_{663}) - (20,2 \times A_{645})$$

$$\text{Carot. } \mu\text{mol g M.Fr.}^{-1} = \frac{(A_{480} + 0,114 \times A_{663} - 0,638 \times A_{645}) \times V \times 10^3}{112,5 \times M}$$

em que V é o volume do extrato (litros) e M a massa fresca (gramas) (HENDRY e PRICE, 1993).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da emissão de fluorescência em resposta à temperatura e irradiância supra-ótimas

A exposição dos discos foliares a uma irradiância de $1.200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, bem acima da utilizada para a aclima\u00e7\u00e3o das plantas ($400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), resultou numa queda gradual e lenta do valor da raz\u00e3o F_v/F_m (Figuras 5 e 6) quando o material foi incubado sob temperatura semelhante \u00e0 de aclima\u00e7\u00e3o (25°C). Ao contr\u00e1rio, a combina\u00e7\u00e3o de alta irradi\u00e2ncia ($1.200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e alta temperatura (40°C) resultou em uma queda acentuada da raz\u00e3o F_v/F_m . A express\u00e3o do dano fotoinibit\u00f3rio foi extremamente r\u00e1pida, podendo ser observada j\u00e1 nos primeiros cinco minutos ap\u00f3s exposi\u00e7\u00e3o ao tratamento fotoinibit\u00f3rio (Figuras 5 e 6). A exposi\u00e7\u00e3o dos discos foliares a uma temperatura supra-\u00f3tima (40°C) n\u00e3o afetou significativamente a efici\u00eancia fotoqu\u00edmica do FSII, quando associada a uma condi\u00e7\u00e3o de baixa irradi\u00e2ncia ($5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

A pr\u00e9-aclima\u00e7\u00e3o dos discos foliares a uma condi\u00e7\u00e3o subletal ($35^\circ\text{C}/5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) n\u00e3o resultou em aumento da estabilidade t\u00e9rmica do FSII, ao contr\u00e1rio do que era de se esperar. A redu\u00e7\u00e3o da efici\u00eancia fotoqu\u00edmica do aparato fotossint\u00e9tico, ap\u00f3s transfer\u00eancia para a condi\u00e7\u00e3o fotoinibit\u00f3ria, foi similar \u00e0 observada para os discos foliares expostos diretamente a esse

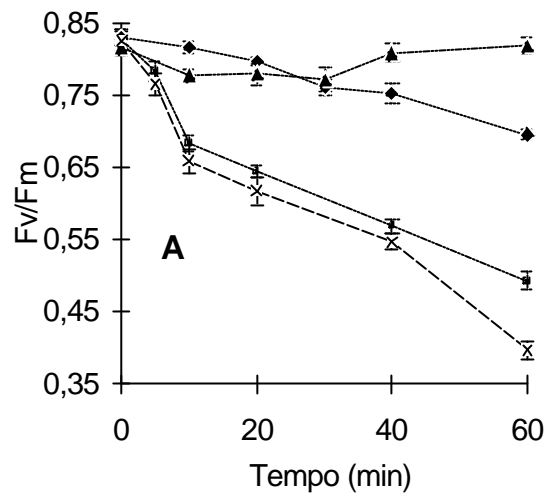


Figura 5 - Razão F_v/F_m em discos foliares de plantas não-micorrízicas de *Eucalyptus grandis*. Os discos foram incubados em placas metálicas mantidas em banho-maria, sobre papel-filtro, a $25^{\circ}\text{C}/1.200 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (---●---), a $40^{\circ}\text{C}/5 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (---▲---), a $40^{\circ}\text{C}/1.200 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (---■---), ou a $40^{\circ}\text{C}/1.200 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ após tratamento por 20 minutos a $35^{\circ}\text{C}/5 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (---×---). Os dados são a média de quatro repetições. As barras indicam o desvio-padrão da média .

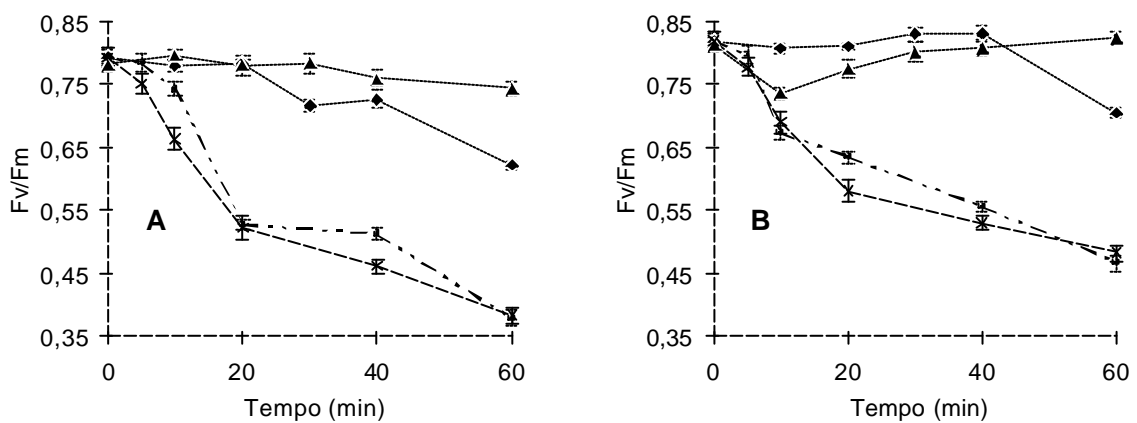


Figura 6 - Razão F_v/F_m em discos foliares de plantas micorrízicas de *Eucalyptus grandis*: (A) Plantas inoculadas com IS 83; (B) plantas inoculadas com RS 24. Os discos foram incubados em placas metálicas mantidas em banho-maria, sobre papel-filtro, a $25^{\circ}\text{C}/1.200 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (---●---), a $40^{\circ}\text{C}/5 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (---▲---), a $40^{\circ}\text{C}/1.200 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (---■---), ou a $40^{\circ}\text{C}/1.200 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ após tratamento por 20 minutos a $35^{\circ}\text{C}/5 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (---×---). Os dados são a média de quatro repetições. As barras verticais indicam o desvio-padrão da média .

tratamento (Figuras 5 e 6). As variações da razão F_v/F_m , em função das diferentes combinações temperatura/irradiância, foram semelhantes para plantas micorrízicas e não-micorrízicas (Figuras 5 e 6), de modo que os demais parâmetros da curva de indução de fluorescência (F_0 e F_v) são discutidos somente para as plantas não-micorrízicas.

Os diferentes tratamentos resultaram em padrões variados de valores de fluorescência inicial (F_0) (Figura 7). Discos mantidos a 25°C e 1.200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ apresentaram um aumento em torno de 20% no valor de F_0 aos 30 minutos de incubação, em relação ao tempo zero. Entretanto, a elevação da temperatura sob baixa irradiância teve um efeito negligível sobre o valor de F_0 (Figura 7), assim como o observado para os valores de F_v/F_m (Figura 5) e de fluorescência máxima (F_m) (Figura 8).

Os valores de F_0 em discos mantidos sob uma combinação de alta temperatura e alta irradiância (40°C/1.200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) mantiveram-se praticamente inalterados durante todo o período de incubação (Figura 7). Os valores mais extremos, observados aos 5 e aos 40 minutos, representam 92% e 112% do valor de F_0 no tempo zero, respectivamente.

A pré-aclimatação dos discos foliares a 35°C/5 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e a posterior transferência para a condição fotoinibitória resultaram em um padrão incomum dos valores de F_0 (Figura 7). Entretanto, apesar da aparente alternância de aumento e redução de F_0 com o tempo de incubação, os valores de F_0 nos pontos mais extremos da curva representaram uma variação pouco significativa em relação ao valor observado no tempo zero (115% aos 10 minutos e 90% aos 60 minutos).

As condições de incubação pouco influíram sobre os valores de F_0 , de modo que as variações observadas dos valores da razão F_v/F_m (Figura 5) foram atribuídas, essencialmente, às variações de F_m (Figura 8).

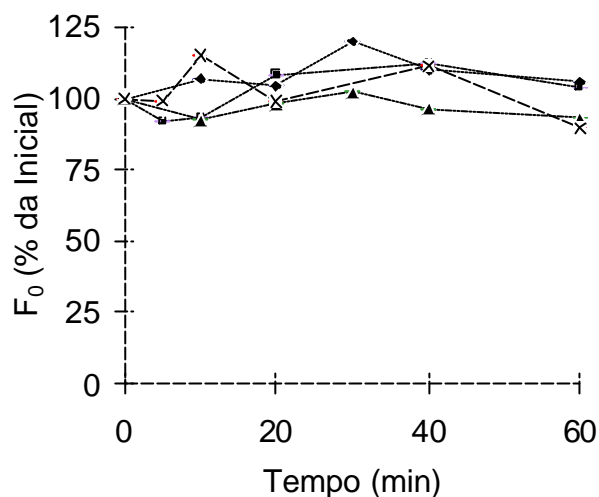


Figura 7 – Fluorescência Inicial em discos foliares de plantas não-micorrízicas de *Eucalyptus grandis*. Os discos foram incubados em placas metálicas mantidas em banho-maria, sobre papel-filtro, a 25°C/1.200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (◆), a 40°C/5 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (▲), a 40°C/1.200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (■), ou a 40°C/1.200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ após tratamento por 20 minutos a 35°C/5 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (x). Os dados s\u00e3o a m\u00e9dia de quatro repeti\u00e7\u00f5es.

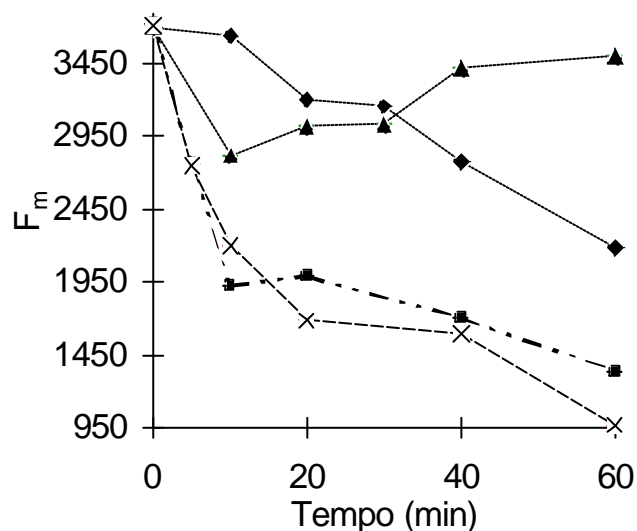


Figura 8 – Fluoresc\u00eancia m\u00e1xima (F_m) em discos foliares de plantas de *Eucalyptus grandis*. Os discos foram incubados em placas met\u00e1licas mantidas em banho-maria, sobre papel-filtro, a 25°C/1.200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (◆), a 40°C/5 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (▲), a 40°C/1.200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (■), ou a 40°C/1.200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ap\u00f3s tratamento por 20 minutos a 35°C/5 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (x). Os dados s\u00e3o a m\u00e9dia de quatro repeti\u00e7\u00f5es.

3.2. Aquisição de termotolerância em função do tempo de incubação sob temperatura supra-ótima e baixa irradiância

Conforme observado, a pré-incubação dos discos foliares a uma combinação de 35°C/5 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, por 20 minutos, não foi suficiente para a indução de mecanismos de proteção do FSII ao tratamento fotoinibitório (Figura 5). Em função deste resultado, procedeu-se a uma avaliação do efeito do tempo de exposição a 35°C sobre a aquisição de termotolerância.

Por conveniência, os dados são apresentados como a porcentagem da razão F_v/F_m inicial, avaliada após os diferentes tempos de incubação a 35°C (ver Material e Métodos).

A incubação por períodos de até 40 minutos não teve qualquer efeito sobre a sensibilidade do FSII ao posterior tratamento fotoinibitório. O decréscimo do valor da razão F_v/F_m , após transferência para a condição fotoinibitória, permaneceu em torno de 40% em relação ao valor obtido no tempo T_0 (Figura 9).

O prolongamento do período de incubação para duas horas, entretanto, foi suficiente para que se observasse menor sensibilidade do FSII ao tratamento fotoinibitório. Após a transferência dos discos foliares para a combinação de 40°C e 1.200 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a eficiência fotoquímica do FSII era, ainda, cerca de 80% do valor inicial (Figura 9).

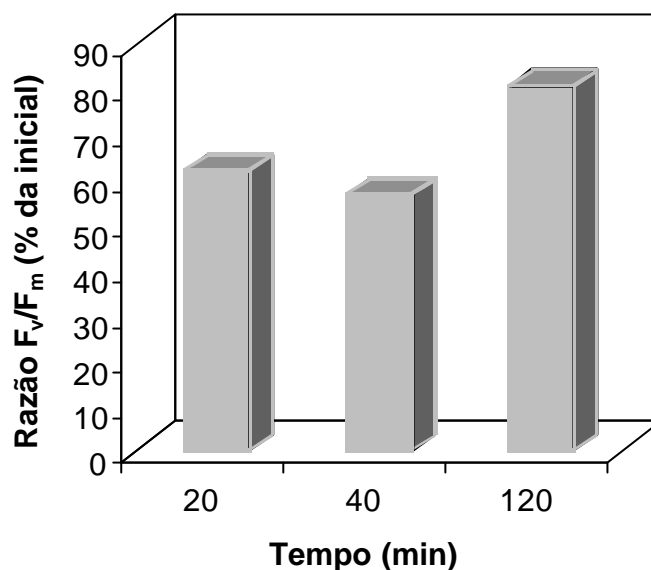


Figura 9 – Razão F_v/F_m (% da inicial) em discos foliares de plantas de *E. grandis*. Os discos foram mantidos a $40^\circ\text{C}/1.200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ap\u00f3s tratamento por 20, 40 ou 120 minutos a $35^\circ\text{C}/5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Os valores da raz\u00e3o F_v/F_m inicial, ap\u00f3s o tratamento a $35^\circ\text{C}/5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, foram 0,798 (20 min), 0,728 (40 min) e 0,713 (120 min). Os dados s\u00e3o a m\u00e9dia de quatro repeti\u00e7\u00f5es. O desvio-padr\u00e3o da m\u00e9dia variou entre 0,0046 e 0,0563.

3.3. Avalia\u00e7\u00f5es de \u00edndices de dano celular

A incubação dos discos foliares sob as diferentes combinações de temperatura e irradiância não foi acompanhada de grandes alterações nos teores de pigmentos ou de malondialdeído (Tabela 1). Efeito significativo do aumento da temperatura de incubação foi observado somente para o teor de clorofila *a*, que sofreu uma redução em torno de 25% após uma hora de incubação a 40°C (Tabela 1). A pré-aclimatação dos discos foliares à temperatura de 35°C e baixa irradiância não alterou o efeito da posterior exposição a 40°C sobre o teor de

clorofila *a* (Tabela 1). Houve também reduções não-significativas nos teores de clorofila total, nos dois tratamentos em que os discos foram expostos à temperatura de 40°C. Entretanto, observou-se um aumento não-significativo no teor de malondialdeído nos discos foliares expostos diretamente a 40°C. Em discos pré-aclimatados a 35°C e baixa irradiância, o teor de malondialdeído foi semelhante ao do tratamento-controle (Tabela 1).

Tabela 1 - Teores de clorofila *a* (Cl.a), clorofila *b* (Cl.b), clorofila total (Cl.Tot.), carotenóides (carot.) e de malondialdeído em discos foliares de *E. grandis*. Os discos foram retirados de folhas completamente expandidas de ramos laterais e incubados em tampão (Tris-HCl, 20 mmol L⁻¹, pH 7,5; MgCl₂, 5 mmol L⁻¹; sacarose, 30 mmol L⁻¹; cloranfenicol, 50 µg mL⁻¹) a 25°C/ 1.200 µmol fótons m⁻²s⁻¹ por duas horas (T1), a 40°C/ 1.200 µmol fótons m⁻²s⁻¹ por uma hora, após incubação a 35°C/ 5 µmol fótons m⁻²s⁻¹ por duas horas (T2) ou a 40°C/ 1.200 µmol fótons m⁻²s⁻¹ por uma hora (T3). Os números referem-se à média de quatro repetições

Tratamento	Cl.a (µmol g matéria fresca ⁻¹)	Cl.b (µmol g matéria fresca ⁻¹)	Cl. Tot. (mg g matéria fresca ⁻¹)	Carot. (µmol g matéria fresca ⁻¹)	Malondialdeído (nmol g matéria fresca ⁻¹)
T1	2,14 a	0,732	2,55	0,759	31,35
T2	1,69 b	0,664	2,12	0,751	32,95
T3	1,61 b	0,638	2,02	0,739	36,41

- médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

A estabilidade do centro de reação do FSII de plantas de *E. grandis* parece ser pouco afetada por excesso de irradiância ou de temperatura, desde que esses fatores atuem isoladamente. Após 60 minutos de exposição a uma irradiância de $1.200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a efici\u00eancia fotoqu\u00edmica m\u00e1xima do FSII, avaliada pela raz\u00e3o F_v/F_m , era ainda cerca de 84% do valor observado no tempo T_0 (Figura 5). O valor da raz\u00e3o F_v/F_m em discos foliares mantidos a 40°C e a $5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ n\u00e3o variou durante todo o per\u00edodo de incubac\u00e3o. A combina\u00e7\u00e3o de alta irradi\u00eancia e temperatura supra-\u00f3tima, entretanto, resultou em um decr\u00e9scimo acentuado da raz\u00e3o F_v/F_m e da fluoresc\u00eancia m\u00e1xima, especialmente nos primeiros 10 minutos de exposi\u00e7\u00e3o (Figura 5), o que \u00e9 indica\u00e7\u00e3o de dano severo ao FSII.

Assim, embora o excesso de radia\u00e7\u00e3o ou a temperatura supra-\u00f3tima, isoladamente, n\u00e3o exer\u00e7am um efeito pronunciado sobre a efici\u00eancia fotoqu\u00edmica do aparato fotossint\u00e9tico de *E. grandis*, o efeito sin\u00e9rgico observado entre esses dois fatores sugere a exist\u00eancia de um mecanismo importante de controle da fotoss\u00edntese em ambientes naturais porque, normalmente, o excesso de radia\u00e7\u00e3o \u00e9 acompanhado de uma eleva\u00e7\u00e3o da temperatura. A redu\u00e7\u00e3o de at\u00e9 80% na efici\u00eancia fotoqu\u00edmica do FSII em plantas de *Solanun tuberosum* em condi\u00e7\u00f5es fotoinibit\u00f3rias semelhantes \u00e0 utilizada neste trabalho (dados obtidos da

transformação dos valores apresentados como $\log F_v/F_m$) foi observada por HAVAUX (1994). Em plantas de *Alocasia*, a combinação de alta temperatura e alta irradiância ($40^\circ\text{C}/1900 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) resultou em um decr\u00e9scimo da raz\u00e3o F_v/F_m de 0,82 para 0,34, ou seja, uma redu\u00e7\u00e3o em torno de 60% da efici\u00eancia fotoqu\u00edmica do FSII (MULKEY e PEARCY, 1992). Essas redu\u00e7\u00f5es da efici\u00eancia fotoqu\u00edmica em *E. grandis* situam-se em apenas cerca de 40%, sugerindo maior toler\u00e2ncia dessa esp\u00e9cie a condi\u00e7\u00f5es potencialmente fotoinibit\u00f3rias. Essa observa\u00e7\u00e3o \u00e9 corroborada pela constata\u00e7\u00e3o de que o aumento da temperatura de incubac\u00e3o de 25°C para 40°C teve um efeito pouco significativo sobre os teores de pigmentos e sobre a peroxida\u00e7\u00e3o de lip\u00eddios (Tabela 1).

Os efeitos das diferentes combina\u00e7\u00f5es entre temperatura e irradi\u00e2ncia sobre a raz\u00e3o F_v/F_m foram semelhantes em plantas micorr\u00edzicas e n\u00e3o-micorr\u00edzicas (Figuras 5 e 6). Esse resultado indica que o efeito da associa\u00e7\u00e3o micorr\u00edzica sobre a maior toler\u00e2ncia da planta a extremos ambientais n\u00e3o pode, a princ\u00edpio, ser atribu\u00eddo a altera\u00e7\u00f5es na resposta do aparelho fotossint\u00e9tico aos fatores de estresse aqui estudados. Contudo, deve-se salientar que estes resultados foram obtidos de discos foliares isolados, de modo que um poss\u00edvel efeito da associa\u00e7\u00e3o micorr\u00edzica atuando em n\u00edvel do sistema radicular, como por exemplo um aumento no dreno de fotossintatos, n\u00e3o poderia se manifestar nestas condi\u00e7\u00f5es.

A pr\u00e9-aclima\u00e7\u00e3o dos discos foliares a uma temperatura moderada (35°C) e baixa luminosidade ($5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) por um per\u00edodo de 20 minutos n\u00e3o resultou em aumento da estabilidade t\u00e9rmica do FSII (Figura 5). Esse resultado \u00e9 diferente do obtido para *S. tuberosum* (HAVAUX, 1994). Nesse trabalho, o autor descarta o envolvimento da s\u00edntese de novo de prote\u00ednas no fen\u00f4meno de termoprote\u00e7\u00e3o, uma vez que o processo ocorre rapidamente e n\u00e3o \u00e9 afetado pela adi\u00e7\u00e3o de inibidores de s\u00edntese prot\u00e9ica ao meio de incubac\u00e3o. Em *E. grandis*, a pr\u00e9-incuba\u00e7\u00e3o dos disco foliares a uma temperatura moderada e baixa luminosidade confere um aumento da estabilidade do FSII a condi\u00e7\u00f5es fotoinibit\u00f3rias, desde que o per\u00edodo de pr\u00e9-aclima\u00e7\u00e3o seja em torno de duas

horas (Figura 9). A aquisição de termoproteção é, contudo, acompanhada de um decréscimo da eficiência fotoquímica do FSII, uma vez que se observou uma redução do valor da razão F_v/F_m de 0,82 para 0,72, durante as duas horas de incubação a 35°C e 5 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 8). Sugere-se que uma fotoinibição moderada reduz, posteriormente, a probabilidade de ocorrência de uma fotoinibição mais acentuada, possivelmente como resultado da ativação ou da aceleração de mecanismos de proteção (ÖGREN, 1994).

O tempo necessário para se observar um aumento da estabilidade do FSII (cerca de duas horas) resulta, provavelmente, do envolvimento da síntese protéica no mecanismo de termoproteção do FSII em *E. grandis*. Um dos alvos principais da fotoinativação da fotossíntese parece ser a proteína D1 localizada no centro de reação do FSII (OHAD et al., 1994), a qual apresenta um giro metabólico em torno de uma hora (Prasil et al., 1992, citados por HAVAUX, 1994).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram características importantes do processo de fotoinibição associado à temperatura supra-ótima em plantas de *E. grandis*. A redução da eficiência fotoquímica do FSII, avaliada pela razão F_v/F_m , foi acompanhada de uma redução considerável de F_m , sem que se observassem alterações significativas em F_0 (Figuras 5, 7 e 8). Esse comportamento foi observado durante todo o curso da fotoinibição e difere do fenômeno de fotoinibição clássica, que é geralmente associada a um aumento e à posterior redução de F_0 (KRAUSE e WEIS, 1991).

A estabilidade de F_0 em folhas de *E. grandis* submetidas a uma combinação de alta temperatura e alta irradiância indica a ocorrência de uma perturbação seletiva no centro de reação do FSII, uma vez que uma alteração no complexo coletor de luz implicaria a alteração dos valores de F_0 . A redução acentuada dos valores de F_m , associada à pouca variação de F_0 , é possivelmente o resultado do aumento da inativação térmica dos centros de reação do FSII (HAVAUX, 1994). Em razão dessa observação, pode-se concluir que a maior parte da energia de excitação transferida para os centros de reação foi dissipada na forma de calor sob uma combinação de alta temperatura e alta irradiância.

Resultados semelhantes também têm sido obtidos por outros autores (CLELAND et al., 1986; HAVAUX, 1994).

Os mecanismos pelos quais a pré-aclimação dos discos foliares a 35°C leva à transformação dos centros de reação do FSII em emissores de calor não são completamente conhecidos. Sabe-se, contudo, que a temperatura tem uma grande influência sobre as propriedades físico-químicas das membranas (TAIZ e ZEIGER, 1991). Levando-se em conta a importância das interações entre proteínas e lipídios para a organização dos fotossistemas (WEBB e GREEN, 1991), postula-se que um aumento da fluidez da membrana do tilacóide durante a pré-incubação a uma temperatura subletal de 35°C resultou em alterações conformacionais do FSII de *E. grandis*, protegendo o centro de reação dos efeitos danosos da combinação de alta temperatura e alta irradiância. A dissociação do FSII de alguns complexos de captação de luz tem sido observada em tilacóides isolados, após tratamento em temperaturas elevadas (GOUNARIS et al., 1984; SUNDBY et al., 1986), e, possivelmente, também ocorre “in vivo” (ARMOND et al., 1980; SANE et al., 1984; WEIS, 1985), representando um mecanismo de prevenção da superexcitação e posterior dano ao centro de reação do FSII sob alta irradiância.

Considerando, porém, que a estabilização do FSII foi observada somente após um período relativamente prolongado de pré-incubação a uma temperatura subletal (duas horas; Figura 9), observa-se que o envolvimento da síntese de proteínas não pode ser descartado como um mecanismo adicional de proteção do aparato fotossintético na condição fotoinibitória imposta às plantas neste trabalho.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE DOS SISTEMAS ANTIOXIDATIVOS EM PLANTAS DE *Eucalyptus grandis*, NO FUNGO ECTOMICORRÍZICO *Pisolithus* sp. E EM ECTOMICORRIZAS EM RESPOSTA À EXPOSIÇÃO À TEMPERATURA SUPRA-ÓTIMA

1. INTRODUÇÃO

Os organismos que possuem um modo de vida aeróbio são incapazes de evitar a formação de radicais livres nas células metabolicamente ativas. Radicais livres são formas ativadas de oxigênio, resultantes das reações deste elemento com elétrons que escapam de cadeias de transporte em mitocôndrias e em cloroplastos. Radicais como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), superóxido (O_2^-), peróxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) são constantemente produzidos durante as reações metabólicas normais das células. Essas formas são altamente reativas, sendo capazes de oxidar virtualmente todos os componentes celulares. As

reações de $^1\text{O}_2$ e de $\cdot\text{OH}$ são extremamente rápidas, sendo controladas apenas pela velocidade de sua difusão na célula (10^8 - $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (ASADA, 1994).

Para se protegerem dos efeitos adversos relacionados com a presença de radicais livres nas células, os organismos vivos desenvolveram um sistema eficiente de remoção desses compostos. Um dos componentes mais importantes do sistema de defesa contra os radicais livres é a superóxido dismutase (Sod) (superóxido:superóxido oxidoreductase, E.C. 1.15.1.1). Essa enzima constitui uma defesa primária importante das células contra o radical livre superóxido produzido em condições de estresse (BOWLER et al., 1992; FOYER et al., 1994; TSANG et al., 1991). A ação da Sod sobre o ânion superóxido resulta na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é posteriormente removido por ação da catalase (H_2O_2 : H_2O_2 oxidoreductase, E.C. 1.11.1.6), presente em muitos organismos vivos. Em cloroplastos, a decomposição do H_2O_2 gerado por ação da Sod é efetuada por um sistema peroxidase que utiliza ascorbato, que é oxidado a deidroascorbato por ação da ascorbato peroxidase (AscPod) (ascorbato: peróxido de hidrogênio oxidoreductase, E.C. 1.11.1.7) (NAKANO e ASADA, 1981). O deidroascorbato formado é novamente reduzido a ascorbato pela enzima deidroascorbato redutase (glutathiona:deidroascorbato oxidoreductase, E.C. 1.8.5.1). Glutathiona na forma oxidada (GSSG), resultante dessa reação, é convertida novamente a GSH por glutathiona redutase dependente de NADPH (NADPH:glutathiona oxidada oxidoreductase, E.C. 1.6.4.2) (Foyer et al., 1991, citados por GOSSET et al., 1994).

Em microrganismos e, em especial, em fungos formadores das associações ectomicorrízicas, os componentes do sistema antioxidativo não são bem conhecidos. Sabe-se, no entanto, que enzimas como catalase, peroxidases e superóxido dismutase participam dos sistemas de decomposição de radicais livres em fungos (CHARY e NATVIG, 1989; KAPOOR e SVEENIVASAN, 1988; WIESER et al., 1991). No fungo ectomicorrízico *Rhizopogon roseolus*, a redução da atividade das diferentes isoformas da Sod parece estar relacionada com o estresse oxidativo induzido por sulfeto (MISZALSKI e BOTTON, 1996) e por cádmio (MISZALSKI et al., 1996).

A exposição dos organismos a condições ambientais que excedam os limites toleráveis resulta, via de regra, no colapso do sistema antioxidativo, que se torna incapaz de eliminar o excesso de radicais livres produzidos durante essas situações ditas de estresse. Nesses casos, o balanço entre a produção de radicais livres e a capacidade de o sistema antioxidativo removê-los da célula é rompido, o que leva ao aumento da oxidação dos componentes celulares (MORAN et al., 1994).

Historicamente, as pesquisas têm demonstrado que o estabelecimento da associação micorrízica resulta no aumento da tolerância das plantas a fatores adversos do ambiente (DAVIES et al., 1993; GRIFFIOEN et al., 1994; MARX, 1981; OSONUBI, 1994; RINCON et al., 1993; ROSENDAHL e ROSENDAHL, 1991; TOBAR et al., 1994; VIDAL et al., 1992). Embora muitos dos efeitos sejam atribuídos a uma melhor nutrição da planta associada ao fungo micorrízico, pouco se sabe acerca dos mecanismos moleculares responsáveis por essa maior tolerância aos fatores de estresse ambiental.

Recentemente, tem crescido o interesse pelas alterações nos processos bioquímicos que ocorrem quando os fungos e as raízes de plantas se associam para formar as micorrizas (MARTIN et al., 1997). RUIZ-LOZANO et al. (1996) observaram um aumento significativo na atividade da superóxido-dismutase em plantas micorrízicas de *Lactuca sativa* expostas a estresse hídrico, comparadas a plantas não-micorrízicas. Também em plantas de *Pisum sativum*, a atividade da Sod é maior no sistema radicular de plantas micorrízicas (ARINES et al., 1994a).

Este trabalho teve como objetivos demonstrar que o estabelecimento da associação micorrízica resulta na expressão diferenciada de alguns componentes do sistema de decomposição de radicais livres dos organismos envolvidos, e que essa alteração pode resultar no aumento da tolerância tanto da planta quanto do fungo a fatores adversos do ambiente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Avaliação dos isolados fúngicos

Discos de 5 mm de ágar MNM (MARX, 1969), contendo micélio, foram retirados das bordas de colônias dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* (isolados IS83, Pt 90A, RS20, RS23, RV82), *Paxillus involutus* (PI) e *Cenococcum geophilum* (CGL) e inoculados em ágar MNM. As placas foram incubadas a 28°C. Após sete dias de incubação, foram impostos os seguintes tratamentos: (i) incubação a 28°C (controle); (ii) incubação a 30°C; (iii) incubação a 32°C; (iv) incubação a 35°C; (v) incubação a 30°C no dia 8; 32°C dia 9; 33°C dia 10; e 35°C a partir do dia 11; (vi) exposição à temperatura de 40°C duas vezes ao dia, durante 20 min (dia 8); 30 min (dia 9); 40 min (dia 10); 60 min (dia 11), seguindo-se incubação a 35°C a partir da última exposição a 40°C no dia 11. A avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre o crescimento dos fungos foi feita medindo-se os diâmetros das colônias a partir do 7^o dia, em intervalos de dois a três dias. Para cada isolado fúngico e cada tratamento de temperatura foram utilizadas três repetições.

2.2. Atividade do sistema antioxidativo e danos celulares em *Pisolithus* sp. em resposta à incubação à temperatura supra-ótima

Isolados de *Pisolithus* sp. (RS24 e IS83) foram inoculados em frascos erlenmeyer, contendo 50 mL de meio MNM, e incubados a 28°C. Aos 20 dias, o meio de cultura foi descartado e substituído por um meio recém-preparado. No dia seguinte, os frascos foram transferidos para banho-maria com temperatura regulada em 40°C e mantidos nessa condição por duas ou quatro horas. Frascos mantidos a 28°C serviram como tratamento-controle. Cada tratamento foi repetido 10 vezes. O micélio fúngico foi coletado, lavado em água Milli-Q, congelado em N₂ líquido e armazenado a -80°C para utilização posterior.

2.2.1. Determinação das atividades enzimáticas

As enzimas foram extraídas de 200 mg de micélio, por maceração em almofariz a 0-4°C, contendo 60 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP), areia de quartzo e 1 mL do tampão de extração (100 mmol L⁻¹ K-fosfato pH 7,0; 0,1 mmol L⁻¹ EDTA; 2 mmol L⁻¹ D⁺-isoascorbato e os inibidores de protease aprotinina, leupeptina, pepstatina-A e Fluoreto de Fenilmetilsulfonil).

Os extratos foram centrifugados a 20.000g, por 20 minutos, a 2°C, em centrífuga Sorvall RC-5, e os sobrenadantes usados para as análises enzimáticas e dosagem de proteínas (LOWRY et al., 1951). As avaliações foram realizadas em espectrofotômetro Pharmacia, modelo Ultrospec 3000, dotado de um sistema Peltier com temperatura regulada em 25°C (catalase, peroxidases não-específicas e ascorbato peroxidase), ou Beckman DU 640 (teor protéico e superóxido dismutase).

A atividade da catalase foi avaliada pelo decréscimo da absorvância a 240 nm, em uma mistura de reação contendo: fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹, pH 7,0; H₂O₂ 10 mmol L⁻¹ ($A_{240} \cong 0,520-0,550$) (2,9 mL); e extrato enzimático (0,1 mL). Nessas condições, uma unidade de catalase corresponde à quantidade de enzima capaz de decompor 1 micromol de H₂O₂ por minuto (SIGMA, 1998).

A atividade de peroxidases não-específicas (PÜTTER, 1974) foi avaliada pelo aumento da absorvância a 420 nm resultante da oxidação de pirogalol a purpurogalina, em uma mistura de reação contendo: fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹, pH 7,0; H₂O₂ 20 mmol L⁻¹; pirogalol 10 mmol L⁻¹; e extrato enzimático (60 µL, volume total da reação 3,1 mL). Uma unidade de peroxidases corresponde à quantidade de enzima capaz de converter 1 micromol de pirogalol por minuto a purpurogalina.

A atividade da superóxido dismutase (BECANA et al., 1989) foi avaliada pela capacidade da enzima inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), em uma mistura de reação contendo: fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹, pH 7,8; metionina 13 mmol L⁻¹; riboflavina 2 µmol L⁻¹; NBT 75 µmol L⁻¹; EDTA 100 nmol L⁻¹; e extrato enzimático (10-200 µL, volume total da reação 3,0 mL). A reação foi iniciada iluminando-se os tubos que continham a mistura com uma lâmpada fluorescente de 15 watts. Para isso, construiu-se uma câmara de incubação circular, contendo a lâmpada no centro. Os tubos de ensaio foram colocados em orifícios equidistantes da lâmpada. Após 10 minutos, a lâmpada foi desligada, e a produção do azul-de-formazana nos frascos-controle e naqueles contendo o extrato enzimático foi avaliada a 560 nm em um espectrofotômetro Beckman DU 640. Uma unidade de superóxido dismutase corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

2.2.2. Danos oxidativos “in vivo”

Os danos oxidativos a lipídios foram estimados como o conteúdo de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico. Essas substâncias foram extraídas de 100 mg de micélio com 0,6 ml de tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹, pH 7,0, e a sua concentração expressa como equivalentes de malondialdeído (HENDRY et al., 1993).

2.3. Avaliação do estresse oxidativo causado por temperatura supra-ótima em discos foliares de plantas de *Eucalyptus grandis*

Plantas de *E. grandis* com 80 dias, obtidas conforme descrito no Capítulo 1, foram transferidas para uma câmara de crescimento e mantidas a 25°C, 600 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 16 horas de fotoperíodo. Aos 90 dias, discos de 10 mm de diâmetro foram retirados do segundo par de folhas completamente expandidas de ramos laterais e incubados a 25°C, por duas horas, ou a 40°C, por duas ou quatro horas, em tampão Tris-HCl 20 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo sacarose 30 mmol L^{-1} , MgCl_2 5 mmol L^{-1} e cloranfenicol 50 mg L^{-1} .

2.3.1. Determinação das atividades enzimáticas

As enzimas foram extraídas macerando-se os discos foliares em almofariz de porcelana contendo PVPP (500 mg g^{-1} de matéria fresca), areia de quartzo e o tampão de extração (100 mmol L^{-1} K-fosfato pH 7,0; 0,1 mmol L^{-1} EDTA; 2 mmol L^{-1} D^+ -isoascorbato e os inibidores de protease aprotinina, leupeptina, pepstatina-A e Fluoreto de Fenilmetilsulfonil).

As atividades das enzimas catalase, superóxido dismutase e peroxidases não-específicas foram avaliadas conforme descrito anteriormente. A atividade da ascorbato peroxidase foi avaliada pelo decréscimo da absorvância a 290 nm, numa mistura de reação contendo: fosfato de potássio 50 mmol L^{-1} , pH 7,0; ascorbato 0,5 mmol L^{-1} ; e extrato enzimático (50 μL , volume total da reação 1 mL). A reação foi iniciada adicionando-se à cubeta 20 μL de H_2O_2 na concentração de 5 mmol L^{-1} (ASADA, 1984). Nessas condições, uma unidade de ascorbato peroxidase corresponde à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 micromol de ascorbato por minuto.

Para a avaliação das atividades da catalase e da ascorbato peroxidase, foi necessária a remoção de compostos interferentes contidos no extrato enzimático. A técnica de precipitação das proteínas com sulfato de amônio não se adequa ao extrato protéico de plantas de *E. grandis*, porque resulta na formação de um

complexo viscoso e heterogêneo que não permite a ressuspensão das proteínas nele contidas. Uma outra tentativa de remoção desses compostos interferentes foi feita utilizando-se carvão ativado ou XAD-7 (SIGMA), porém sem muito êxito. O uso de carvão ativado possibilitou a remoção efetiva dos interferentes, tornando possível a avaliação da catalase; porém, em extrato protéico de *E. grandis*, resulta na perda total da atividade da ascorbato peroxidase.

Em testes preliminares, a metodologia de precipitação das proteínas com acetona mostrou-se como a mais adequada para a remoção das substâncias interferentes no material em estudo. Ao extrato enzimático, adicionou-se vagarosamente um volume de acetona (-20°C) equivalente a uma concentração final de 70% (700 µL para 300 µL do extrato enzimático). A mistura foi incubada a -20°C por 30 minutos e centrifugada a 10.000 g por 10 minutos. O precipitado foi seco sob vácuo, em banho de gelo, por 30 minutos, e ressuspensionado em tampão de extração (250 µL por mL do extrato enzimático inicial). O extrato final foi centrifugado a 4.000 g por cinco minutos e o sobrenadante utilizado para a avaliação das atividades da catalase, da ascorbato peroxidase e para determinação do teor de proteínas (LOWRY et al., 1951).

2.3.2. Avaliação de danos oxidativos a lipídios

Os danos oxidativos a lipídios foram estimados como o conteúdo de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (HENDRY et al., 1993). A extração e quantificação foram feitas conforme descrito anteriormente (item 2.2.2).

2.4. Atividade da catalase, das peroxidases, da superóxido dismutase, danos oxidativos a lipídios e padrão eletroforético de isoenzimas de superóxido dismutase em raízes de *E. grandis*, ou em micorrizas formadas entre *E. grandis* e *Pisolithus* sp., em resposta à incubação à temperatura supra-ótima

2.4.1. Material biológico

Plantas de *E. grandis* foram obtidas por germinação de sementes em bandejas contendo areia lavada e esterilizada. Aos 20 dias, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos de 3 dm³ contendo o mesmo substrato. Os inóculos dos isolados de *Pisolithus* sp., IS83 e RS24, foram preparados a partir da transferência de discos de ágar MNM (MARX, 1969), contendo o micélio fúngico, para placas de Petri contendo ágar-água. Após quatro dias de incubação a 28°C, os discos que apresentavam crescimento micelial foram colocados no substrato em contato com as raízes das plântulas no momento do transplante para os vasos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 105 dias. Semanalmente, aplicaram-se 100 mL de solução nutritiva contendo ($\mu\text{mol L}^{-1}$): N, 4000; K, 800; Ca, 250; Mg, 250; S, 250; P, 40; Fe, 10; B, 10; Zn, 2; Mn, 2; Cu, 1; Mo, 0,1 (BRUNDRETT et al., 1996). No final desse período, as plantas foram transferidas para uma câmara de crescimento onde foram mantidas a 25°C, 600 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas.

Aos 110 dias, o sistema radicular foi coletado e lavado com água de torneira e água Milli-Q. Amostras de raízes finas ou de micorrizas foram retiradas e transferidas para frascos de vidro contendo meio MNM acrescido de cloranfenicol a 50 mg L^{-1} . Os frascos foram incubados a 25°C ou a 40°C por três horas, em banho-maria. As amostras foram recolhidas e lavadas em água Milli-Q, removendo-se o excesso de água com papel absorvente.

2.4.2. Extração das enzimas

Amostras contendo cerca de 200 mg de massa fresca foram maceradas em almofariz de porcelana contendo 100 mg de PVPP, na presença de nitrogênio líquido e areia de quartzo. O material foi homogeneizado em 2 mL de tampão de extração (100 mmol L^{-1} K-fosfato pH 7,0; $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ EDTA; 2 mmol L^{-1} D⁺-isoascorbato e os inibidores de protease aprotinina, leupeptina, pepstatina-A e Fluoreto de Fenilmetilsulfonil), transferido para tubos de centrifuga e centrifugado a 20.000 g , 2°C , por 20 minutos.

Parte do sobrenadante foi utilizada diretamente para a avaliação das peroxidases (PÜTTER, 1974), da superóxido dismutase (BECANA et al., 1989) e do teor de proteínas (LOWRY et al., 1951). O restante do material foi utilizado para a avaliação da atividade da catalase (SIGMA, 1998), após precipitação com acetona a -20°C para a remoção de compostos interferentes.

2.4.3. Avaliação de danos oxidativos a lipídios

Os danos oxidativos a lipídios foram estimados como o conteúdo de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (HENDRY et al., 1993). A extração e quantificação foram feitas conforme descrito anteriormente (item 2.2.2).

2.4.4. Padrão eletroforético de isoenzimas da superóxido dismutase

Os extratos enzimáticos utilizados para a avaliação da atividade da Sod e das peroxidases não-específicas foram misturados ao tampão da amostra (LAEMLI, 1970). A mistura foi submetida à eletroforese em gel não-desnaturante de poliacrilamida a 7,5 %, em minigéis (Mini-Protean II, Bio-Rad). A corrida eletroforética foi realizada a 4°C , 70 volts, por cerca de três horas.

As bandas correspondentes à atividade da Sod foram visualizadas, incubando-se os géis em uma solução que continha: tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹, pH 7,8; EDTA 0,1 mmol L⁻¹; Riboflavina 10 mg L⁻¹ ; NBT 25 mg L⁻¹. O conjunto gel-solução foi iluminado com lâmpada fluorescente de 15 watts até o aparecimento de bandas acromáticas correspondentes à atividade das isoenzimas da Sod (BEAUCHAMP e FRIDOVICH, 1971).

A diferenciação das isoenzimas foi feita utilizando-se inibidores específicos. Antes da coloração já descrita, os géis foram incubados por 30 minutos, a 25°C, em tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹, pH 7,8, contendo KCN a 2 mmol L⁻¹ ou H₂O₂ a 5 mmol L⁻¹. A Cu,Zn-Sod é inibida por KCN e por H₂O₂; Fe-Sod é resistente ao CN⁻, mas é inativada por H₂O₂ e a Mn-Sod é resistente aos dois inibidores (FRIDOVICH, 1986).

3. RESULTADOS

3.1. Efeito da temperatura de incubação sobre o crescimento micelial de fungos ectomicorrízicos

O crescimento micelial dos fungos micorrízicos *P. involutus* (Pi), *C. geophilum* (CGL) e dos isolados de *Pisolithus* sp. foi diferentemente afetado pela temperatura de incubação, podendo-se observar respostas distintas entre espécies e entre isolados da mesma espécie (Figuras 10 a 13). *P. involutus* e *C. geophilum* não apresentaram crescimento quando incubados sob temperaturas acima de 28°C (Figura 10). Dentre os isolados do *Pisolithus*, os mais afetados pela incubação a 35°C foram o RS23, o Pt 90A e o RS24 (Figuras 11 e 12). Entretanto, a elevação gradual da temperatura de incubação, de 28°C para 35°C, resultou em um aumento da tolerância do Pt 90A a essa temperatura. Efeito contrário ao descrito foi observado para o isolado IS83 (Figura 13).

Os isolados RS23 e RS24 do *Pisolithus* não foram capazes de crescer à temperatura de 35°C, quando expostos diretamente a essa condição ou quando a temperatura foi elevada gradualmente, de 28°C até 35°C (Figuras 11 e 12). O crescimento do isolado RS24 foi inibido mesmo quando a temperatura de incubação foi mantida a 32°C. No tratamento em que houve a imposição de dois choques térmicos de 40°C, constatou-se um aumento significativo da tolerância à temperatura de 35°C. Essa resposta foi mais expressiva para o isolado RS24.

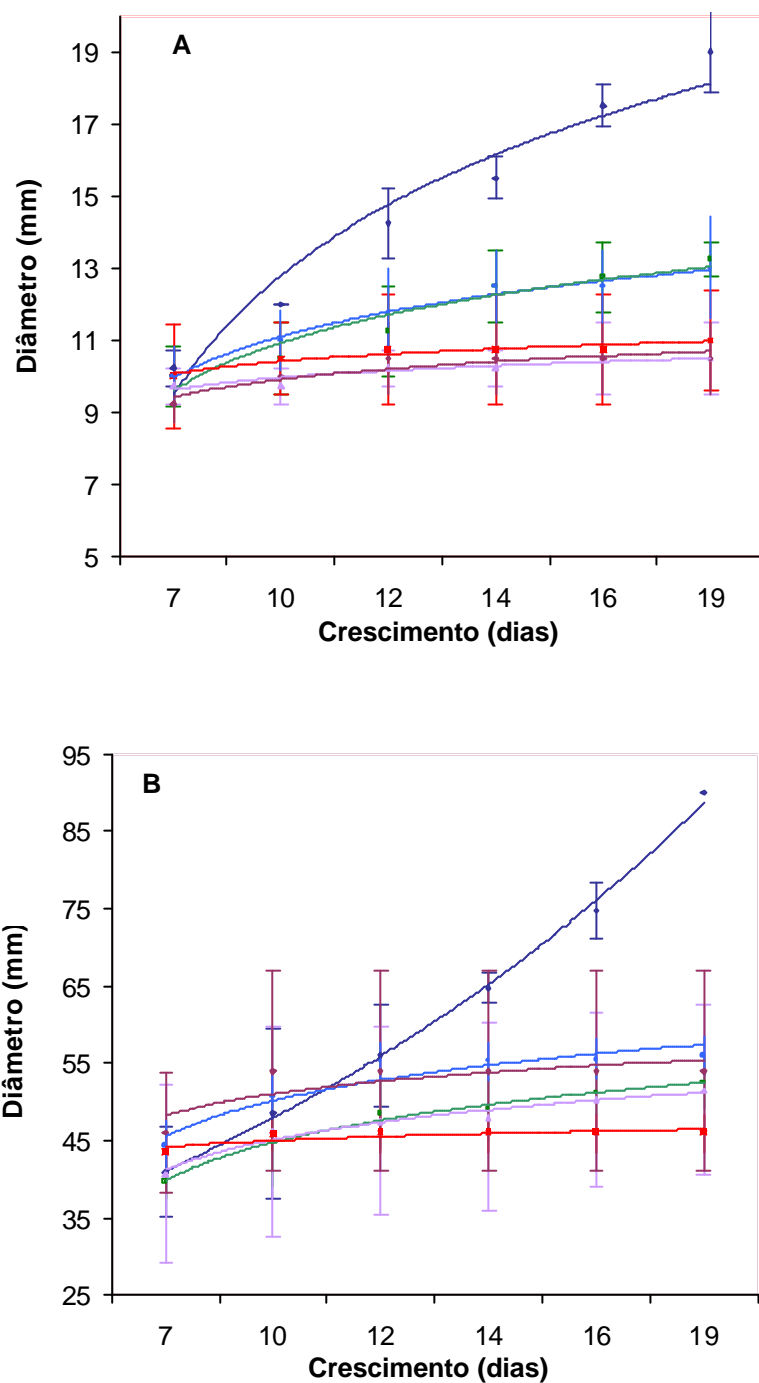


Figura 10 – Crescimento micelial dos fungos ectomicorrízicos *Cenococcum geophilum* (A) e *Paxillus involutus* (B) em resposta à variação da temperatura de incubação: (i) incubação a 28°C (◆); (ii) incubação a 30°C (■); (iii) incubação a 32°C (▲); (iv) incubação a 35°C (□); (v) incubação a 30°C no dia 8; 32°C dia 9; 33°C dia 10; 35°C a partir do dia 11 (◆); (vi) exposição à temperatura de 40°C duas vezes ao dia, durante 20 min (dia 8); 30 min (dia 9); 40 min (dia 10); 60 min (dia 11), seguindo-se incubação a 35°C a partir da última exposição a 40°C no dia 11 (◆). As barras verticais representam o desvio-padrão da média.

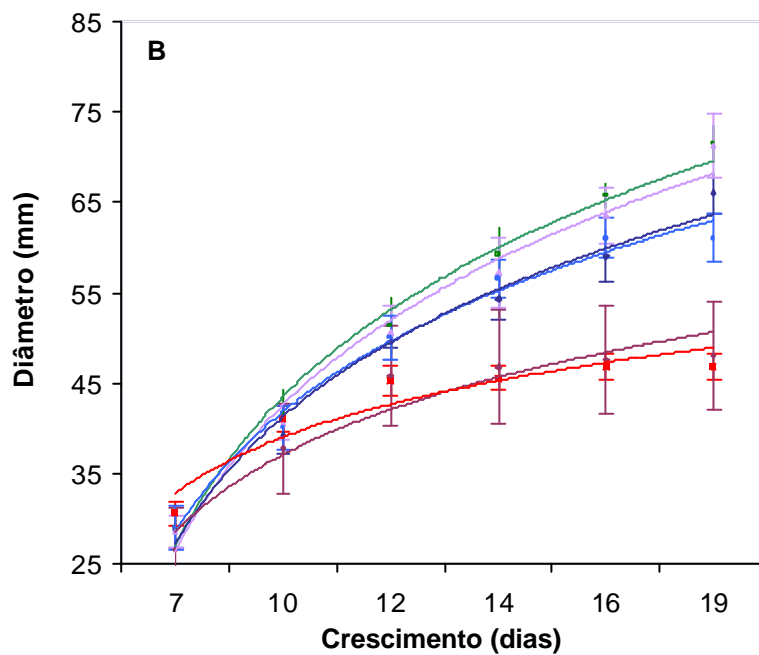
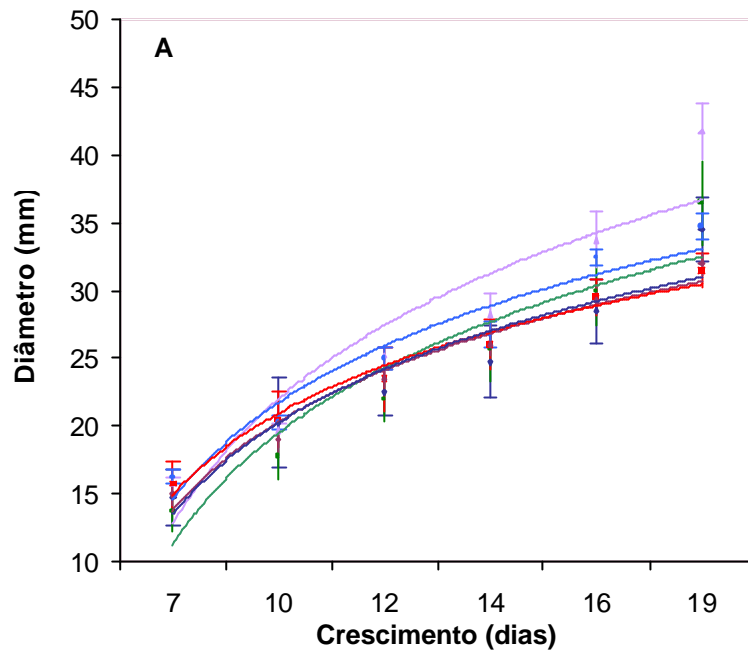


Figura 11 – Crescimento micelial dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus* sp., isolado RS20 (A) e isolado RS23 (B), em resposta à variação da temperatura de incubação (legenda como na Figura 10).

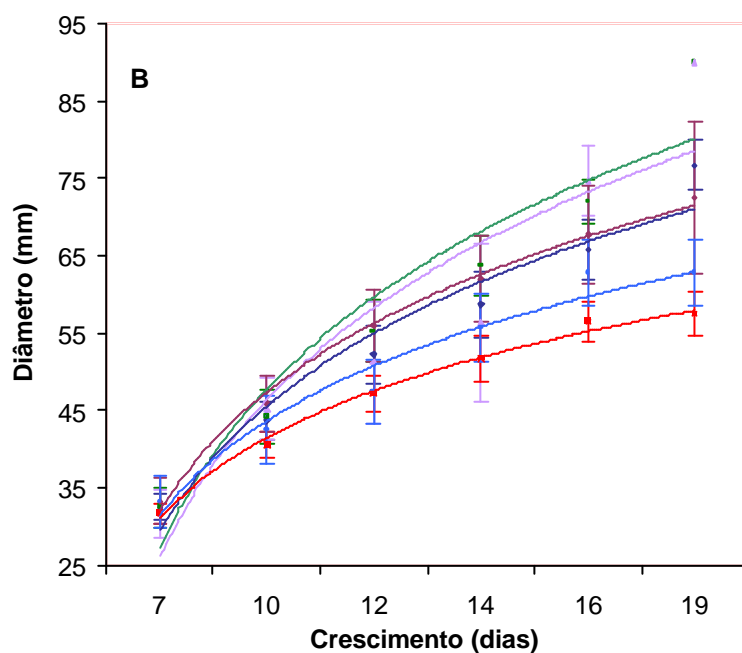
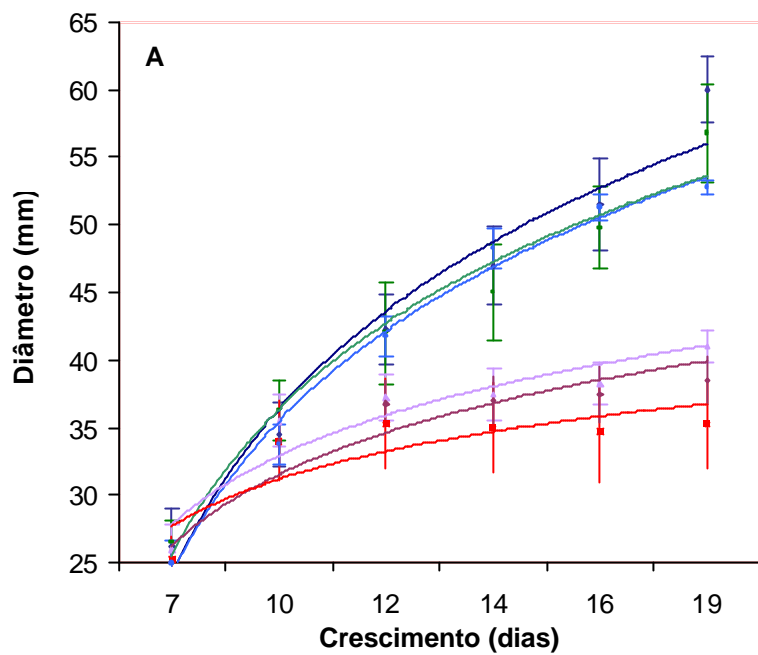


Figura 12 – Crescimento micelial dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus* sp., isolado RS24 (A) e isolado Pt90A (B), em resposta à variação da temperatura de incubação (legenda como na Figura 10).

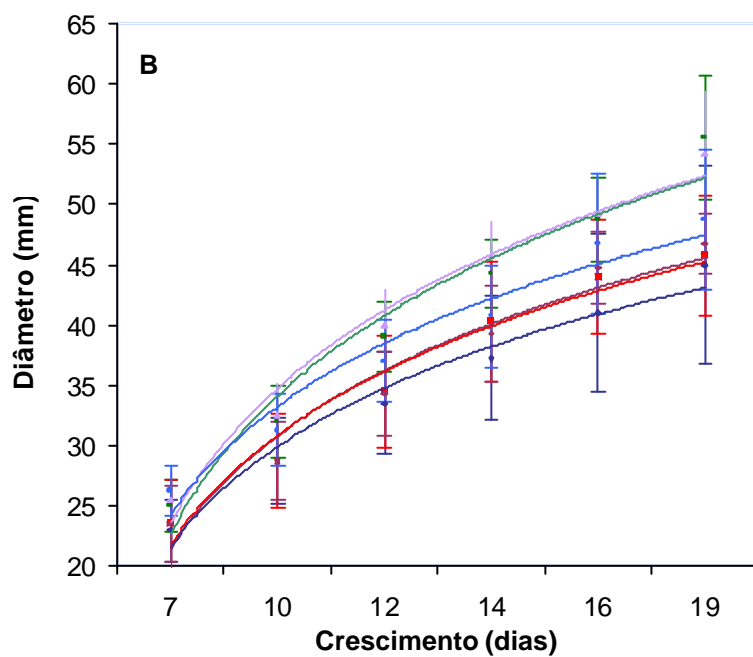
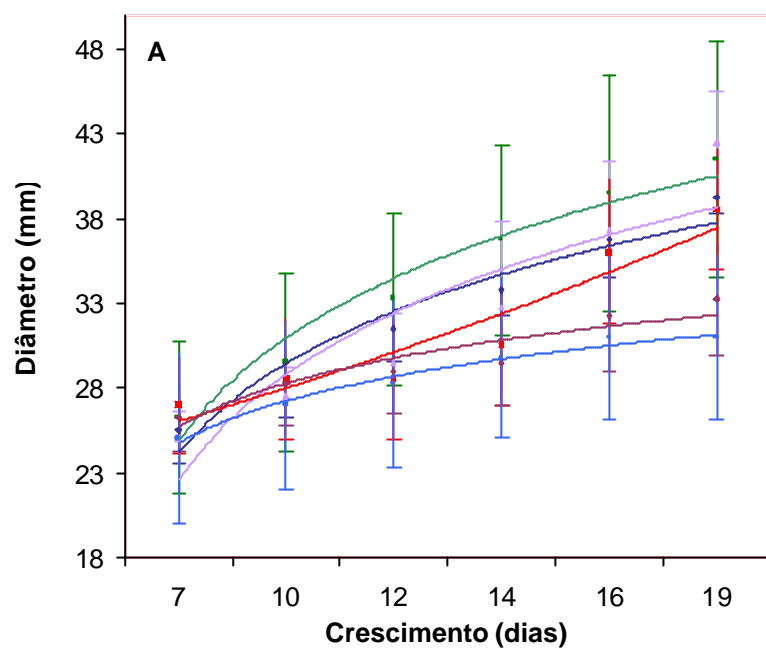


Figura 13 – Crescimento micelial dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus* sp., isolado IS83 (A) e isolado RV82 (B), em resposta à variação da temperatura de incubação (legenda como na Figura 10).

3.2. Atividade da catalase, das peroxidases, da superóxido dismutase e danos oxidativos a lipídios no micélio de *Pisolithus* sp., em resposta à exposição à temperatura supra-ótima

A incubação do micélio dos isolados de *Pisolithus*, IS83 e RS24, a 40°C, não resultou em alterações significativas na atividade específica das enzimas peroxidases e superóxido dismutase (Tabela 2). Alterações significativas foram, no entanto, observadas para os valores de atividade total (Tabela 3).

A atividade específica da catalase foi reduzida em cerca de 20% no micélio fúngico mantido a 40°C, por quatro horas. A incubação nessa temperatura por um período de duas horas não resultou em alteração significativa da atividade dessa enzima (Tabela 2).

Não houve alterações significativas do conteúdo de malondialdeído no micélio dos dois isolados fúngicos, em resposta à elevação da temperatura de incubação, de 28°C para 40°C (Tabela 2). Esse resultado é um indicativo de que os lipídios não foram o alvo principal dos danos celulares que resultaram na redução ou na paralisação do crescimento micelial, ocorrida sob temperaturas supra-ótimas (Figuras 11 e 12).

Tabela 2 - Atividade específica da catalase (Cat), das peroxidases (Pod), da superóxido dismutase (Sod) e concentração de malondialdeído no micélio de dois isolados de *Pisolithus* sp. em resposta à elevação da temperatura de incubação de 28°C (controle) para 40°C, por duas ou quatro horas. Os números referem-se à média de 10 repetições

Tratamento	Cat (unidades mg proteína ⁻¹)	Pod	Sod	Malondialdeído (nmol mg proteína ⁻¹)
RS24 controle	56,0 a	6,19	25,9	1,50
RS24 40°C/2 horas	54,6 a	6,38	25,9	1,49
RS24 40°C/4 horas	45,0 b	5,60	27,2	1,69
IS83 controle	31,8 a	3,08	18,2	1,75
IS83 40°C/2 horas	31,7 a	3,29	17,4	1,62
IS83 40°C/4 horas	25,9 b	2,66	17,4	1,65

- médias seguidas da mesma letra, para cada isolado fúngico, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Atividade total das peroxidases (Pod), da superóxido dismutase (Sod) e teor de proteínas no micélio de dois isolados de *Pisolithus* sp., em resposta à elevação da temperatura de incubação de 28°C (controle) para 40°C, por duas ou quatro horas. Os números referem-se à média de 10 repetições

Tratamento	Pod (unidades g de matéria fresca ⁻¹)		Sod		Proteína (mg g mat. fresca ⁻¹)	
	RS24	IS83	RS24	IS83	RS24	IS83
controle	143,6 a	65,0	519,2	297,92 a	19,22	18,35
40°C/2 h	124,2 ab	58,8	404,5	234,5 b	17,75	17,85
40°C/4 h	106,9 b	54,1	427,1	284,44 ab	18,90	18,23

- médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.3. Atividade da catalase, das peroxidases e da superóxido dismutase em folhas de *E. grandis* expostas à temperatura supra-ótima

A incubação de discos foliares de *E. grandis* a uma temperatura de 40°C, por duas horas, resultou em uma redução de aproximadamente 73% na atividade da catalase e de 51% na atividade das peroxidases (Tabela 4). A atividade dessas enzimas foi parcialmente recuperada quando se prolongou o tempo de incubação a 40°C por quatro horas (Tabela 4).

Não houve alterações significativas da atividade específica da Sod nos discos foliares, em resposta às variações das condições de incubação (Tabela 4).

A atividade específica da ascorbato peroxidase foi significativamente reduzida em cerca de 75% após a incubação dos discos foliares a 40°C por quatro horas (Tabela 4).

Na Tabela 5, são apresentados os valores da atividade total das peroxidases e da Sod. A variação das atividades enzimáticas, nesse caso, foi superior à observada quando as atividades enzimáticas são expressas com base no conteúdo protéico (atividade específica).

Tabela 4 - Atividade específica da catalase (Cat), das peroxidases (Pod), da superóxido dismutase (Sod) e da ascorbato peroxidase (AscPod) em discos foliares de *E. grandis*. Os discos foram retirados de folhas completamente expandidas de ramos laterais e incubados em tampão (Tris-HCl, 20 mmol L⁻¹, pH 7,5; MgCl₂, 5 mmol L⁻¹; sacarose, 30 mmol L⁻¹; cloranfenicol, 50 µg mL⁻¹) a 25°C por duas horas, ou a 40°C, por duas ou quatro horas. Os números referem-se à média de quatro repetições

Tratamento	Cat	Pod	Sod	AscPod (x 1000)
	(unidades mg proteína ⁻¹)			
25°C/2 h	162,0 a	0,447 a	1562,8	0,707 **
40°C/2 h	44,3 c	0,217 b	1577,8	n.a.
40°C/4 h	95,9 b	0,308 b	1380,0	0,176

- médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade;
- (**): médias entre linhas significativamente diferentes, pelo Teste F, a 1% de probabilidade;
- n.a.: não avaliado

Tabela 5 - Atividade total de peroxidases (Pod), da superóxido dismutase (Sod) e teor de proteínas em discos foliares de *E. grandis*. Os discos foram retirados de folhas completamente expandidas de ramos laterais e incubados em tampão (Tris-HCl, 20 mmol L⁻¹, pH 7,5; MgCl₂, 5 mmol L⁻¹; sacarose, 30 mmol L⁻¹; cloranfenicol, 50 µg mL⁻¹) a 25°C, por duas horas, ou a 40°C, por duas ou quatro horas. Os números referem-se à média de quatro repetições

Tratamento	Pod	Sod	Proteína
	(unidades g de matéria fresca ⁻¹)		(mg g de matéria fresca ⁻¹)
25°C/2 h	3,345 a	11.715 a	7,61 a
40°C/2 h	1.095 b	7.883 b	5,02 b
40°C/4 h	1,415 b	6.352 b	4,60 b

- médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

A atividade da Sod foi reduzida em 46% após a incubação a 40°C, por quatro horas (Tabela 5). O aumento da temperatura resultou também na redução do conteúdo protéico nas células, o que explica as diferenças de resultados quando se comparam as atividades enzimáticas com base no conteúdo protéico ou na matéria fresca.

3.4. Atividade da catalase, das peroxidases, da superóxido dismutase, danos oxidativos a lipídios e padrão eletroforético de isoenzimas de superóxido dismutase em raízes de *E. grandis* ou em micorrizas formadas entre *E. grandis* e *Pisolithus* sp., em resposta à incubação à temperatura supra-ótima

A atividade específica da catalase não variou significativamente em raízes ou em micorrizas, em resposta à elevação da temperatura de incubação, de 25°C para 40°C (Tabela 6). Contudo, nos valores experimentais, observou-se uma tendência de aumento na atividade dessa enzima, de cerca de 12%, nas micorrizas formadas com o isolado RS24 e uma redução de cerca de 17% nas micorrizas formadas com o isolado IS83.

A incubação a 40°C resultou em aumento significativo da atividade das peroxidases em micorrizas formadas com o isolado RS24, e da atividade da Sod em micorrizas formadas com IS83 (Tabela 6). Não se detectaram variações significativas para nenhuma das enzimas avaliadas em raízes.

As alterações nas atividades das peroxidases e da Sod refletiram-se no conteúdo de malondialdeído (Tabela 6). Houve uma redução significativa do seu teor em micorrizas formadas com o isolado IS83 e uma tendência de redução em torno de 11% em micorrizas formadas com o RS24. Ao contrário, o aumento do teor de malondialdeído foi de aproximadamente 23% em raízes não-micorrízicas (Tabela 6).

É importante ressaltar as alterações ocorridas na relação entre a atividade da Sod, responsável pela produção de H₂O₂, e as enzimas envolvidas na eliminação desse radical, catalase e peroxidases. No micélio fúngico (Tabela 2), a atividade específica da catalase foi reduzida em cerca de 20% nos dois isolados,

após a exposição a 40°C por quatro horas. A redução da atividade específica das peroxidases situou-se entre 10% e 14%. Em raízes (Tabela 6), não se observaram alterações significativas na atividade dessas enzimas. Entretanto, a atividade da catalase e das peroxidases aumentou em micorrizas formadas com o isolado RS24. Já nas micorrizas formadas com o IS83 ocorreu o inverso, constatando-se uma redução de 18% da atividade da catalase (Tabela 6). Em função dessas alterações, a relação entre a atividade da superóxido dismutase e a das enzimas responsáveis pela decomposição do H₂O₂ aumentou consideravelmente em micorrizas formadas com o IS83. A relação Sod:Cat subiu de 12,3:1, a 25°C, para 22,6:1, a 40°C; a relação Sod:Pod aumentou de 729:1, a 25°C, para 1087:1, a 40°C. Em micorrizas formadas com o isolado RS24, ocorreu uma resposta inversa: a relação Sod:Cat caiu de 19:1, a 25°C, para 15,2:1, a 40°C, enquanto a relação Sod:Pod reduziu de 980:1, a 25°C, para 661:1, a 40°C. O significado dessas diferenças, em nível celular, não pode ser inferido. Entretanto, essas alterações são importantes, porque revelam estratégias diferentes da regulação do sistema antioxidativo em dois isolados fúngicos da mesma espécie, em resposta a variações das condições ambientais.

A elevação da temperatura de incubação resultou em uma redução significativa dos teores de proteínas em raízes e em micorrizas formadas com o isolado IS83 (Tabela 7). Houve redução significativa também na atividade total das peroxidases em micorrizas formadas com o IS83, após a incubação a 40°C (Tabela 7), ao contrário do observado em micorrizas formadas com o RS24. A atividade total da Sod aumentou significativamente em micorrizas que continham o IS83.

Tabela 6 - Atividade específica da catalase (Cat), das peroxidases (Pod), da superóxido dismutase (Sod) e concentração de malondialdeído em raízes de *E. grandis* (NM) ou em micorrizas formadas entre *E. grandis* e dois isolados de *Pisolithus* sp. em resposta à elevação da temperatura de incubação, de 25°C para 40°C, por três horas. As amostras foram incubadas em meio MNM, contendo 50 µg mL⁻¹ de cloranfenicol. Os números referem-se à média de quatro repetições

Tratamento	Cat		Pod (unidades mg proteína ⁻¹)		Sod		Malondialdeído (nmol mg proteína ⁻¹)	
	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C
NM	54,9	54,9	0,43	0,46	1356	1396	0,80	0,98
RS24	50,0	56,2	0,97*	1,29	951	853	2,05	1,82
IS83	59,4	49,0	1,03	1,02	751*	1109	2,42**	1,90

(*): médias entre colunas significativamente diferentes, pelo Teste F, a 5% de probabilidade;

(**): médias entre colunas significativamente diferentes, pelo Teste F, a 1% de probabilidade.

Tabela 7 - Atividade total de peroxidases (Pod), da superóxido dismutase (Sod) e teor de proteínas em raízes de *E. grandis* (NM) ou em micorrizas formadas entre *E. grandis* e dois isolados de *Pisolithus* sp. em resposta à elevação da temperatura de incubação, de 25°C para 40°C, por três horas. As amostras foram incubadas em meio MNM, contendo 50 µg mL⁻¹ de cloranfenicol. Os números referem-se à média de quatro repetições

Tratamento	Pod (unidades g matéria fresca ⁻¹)		Sod		Proteína (mg g matéria fresca ⁻¹)	
	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C
NM	1,022	0,93	2710	2511	2,28*	1,81
RS24	9,120**	13,62	8718	8321	9,18	9,98
IS83	7,344*	5,93	5246*	6395	7,02*	5,82

(*): médias entre colunas significativamente diferentes, pelo Teste F, a 5% de probabilidade;

(**): médias entre colunas significativamente diferentes, pelo Teste F, a 1% de probabilidade.

A atividade específica das peroxidases nos fungos ectomicorrízicos, mantidos a 28°C (Tabela 2), foi 7 a 14 vezes maior do que nas raízes (Tabela 6), e 3 a 6 vezes maior do que nas micorrizas (Tabela 6). Já a atividade específica nas micorrizas foi cerca de 2,2 a 2,4 vezes maior do que nas raízes. Quando os resultados são comparados com base na atividade total, a atividade das peroxidases é de 63,6 a 140 vezes maior em fungos ectomicorrízicos (Tabela 3) do que nas raízes (Tabela 7) e, nas micorrizas (Tabela 7), é de 7,2 a 8,9 vezes maior do que nas raízes. Essa aparente discrepância se deve ao fato de que o teor de proteínas em fungos ectomicorrízicos (Tabela 3) e em micorrizas (Tabela 7) é maior do que o teor protéico nas raízes.

Mais importante do que as peroxidases parece ser a comparação entre a atividade específica e a total da Sod (Tabelas 2 a 7). Nesse contexto, a atividade específica da Sod, em raízes (Tabela 6), é cerca de 52 a 75 vezes maior do que no micélio fúngico (Tabela 2) e 1,4 a 1,8 vez maior do que nas micorrizas (Tabela 6). Não houve grandes diferenças entre a atividade específica da Sod em raízes (Tabela 6) ou na parte aérea (Tabela 4). Entretanto, quando os valores são comparados com base na atividade total, observa-se que a atividade dessa enzima na parte aérea (Tabela 5) é cerca de 4,3 vezes maior do que nas raízes (Tabela 7). A atividade total da Sod em raízes (Tabela 7) é cerca de 5,2 a 9,1 vezes superior à observada no micélio fúngico (Tabela 3).

A atividade total da Sod nas micorrizas não seguiu um padrão conservativo, considerando-se as contribuições individuais do micélio fúngico e das células vegetais para a atividade enzimática na estrutura composta pelos dois organismos (Tabelas 3 e 7). Ao contrário do aumento observado, esperava-se uma redução da atividade total da Sod nas micorrizas, comparativamente às raízes, porque o micélio fúngico contribui com menor atividade de Sod do que as células vegetais. Somente para fins de comparação, considerando que o tecido fúngico contribui com algo em torno de 40% da matéria fresca nas micorrizas, a atividade total da Sod em micorrizas formadas com o isolado RS24 seria: $[(2710 \times 0,6) + (519 \times 0,4)] = 1833,7 \text{ U g matéria fresca}^{-1}$ e, em micorrizas formadas com o isolado IS83, $[(2710 \times 0,6) + (298 \times 0,4)] = 1745 \text{ U g matéria fresca}^{-1}$.

Estes valores são inferiores à atividade total da Sod constatada nas micorrizas, a saber: 8718 U g matéria fresca⁻¹ e 5246 U g matéria fresca⁻¹ de micorrizas formadas com os isolados RS24 e IS83, respectivamente. Essa indução é também observada quando se comparam os valores da atividade total da Sod no material incubado a 40°C (Tabelas 3 e 7). Nesse caso, a atividade da Sod em micorrizas formadas com o isolado RS24 é 3,3 vezes maior do que em raízes e, em micorrizas formadas com o IS83, 2,5 vezes maior (Tabela 7).

O estudo da ocorrência de indução de isoformas de Sod após o estabelecimento da associação ectomicorrízica, avaliando-se o padrão eletroforético (Figura 13), demonstra o aparecimento de quatro a cinco novas isoenzimas de baixo peso molecular nas ectomicorrizas formadas entre *E. grandis* e *Pisolithus* sp., as quais não são expressas em raízes ou no micélio fúngico. Análises prévias com inibidores específicos indicam serem todas elas do tipo Mn-Sod. Não se observaram bandas relativas à atividade da Sod em raízes (Figura 14). Houve uma redução na intensidade das bandas *f1* e *f2* nas micorrizas. A intensidade da coloração do gel foi baixa, possivelmente como resultado da espessura reduzida do gel (1 mm), o que diminuiu o contraste das cores, e do procedimento de coloração adotado para visualização da atividade da Sod. Isso impediu uma avaliação quantitativa da intensidade das bandas e de sua contribuição individual para a atividade enzimática total. Não se detectou atividade em gel da Sod contida no extrato protéico de raízes (Figura 13). Esse resultado contrasta com a detecção de atividade da Sod “in vitro” (Tabelas 6 e 7). OKAMURA et al. (1993) relataram a ocorrência de dois compostos com elevada atividade de superóxido dismutase em extratos foliares de *Eucalyptus rostrata*, a saber: espiraeosídeo e quercetina 4'-glicosilgalato. É possível, nesse caso, que a atividade de Sod detectada “in vitro” esteja relacionada com a presença de compostos da mesma natureza e que, durante a corrida eletroforética, esses compostos tenham sido eluídos do gel.

Considerando o papel central desempenhado pela superóxido dismutase nos sistemas antioxidativos das células, pode-se inferir que, em ectomicorrizas formadas entre *E. grandis* e *Pisolithus* sp., não só a atividade enzimática total,

mas também a indução de novas isoenzimas da Sod parecem contribuir conjuntamente para as freqüentes observações de maior tolerância dos organismos envolvidos a diferentes fatores de estresse ambiental.

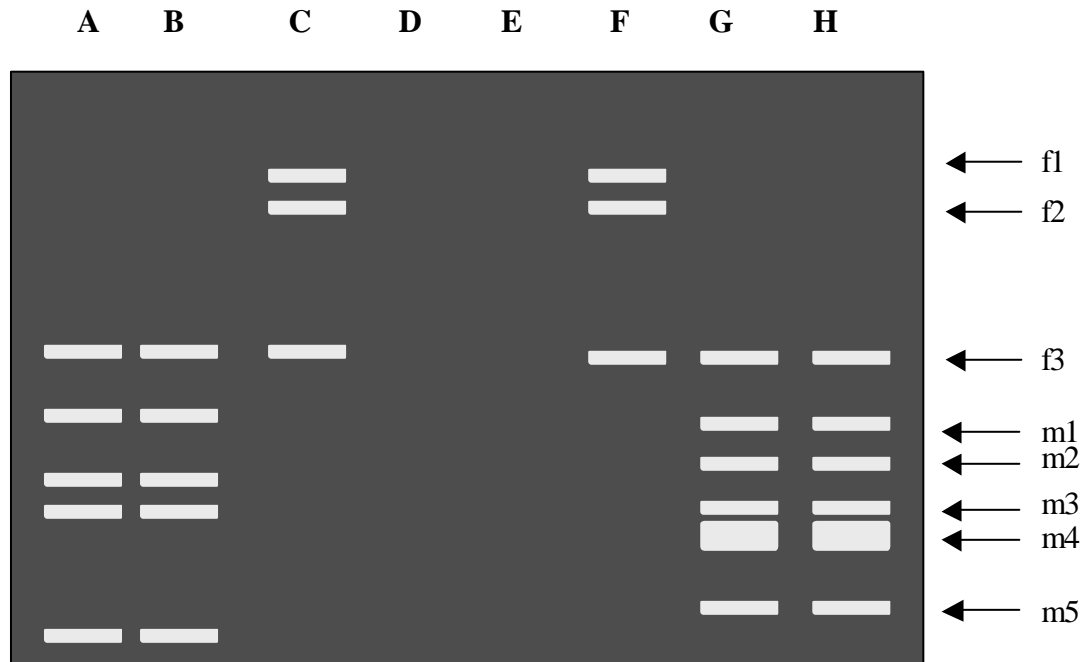


Figura 14 – Padrão eletroforético de isoenzimas de superóxido dismutase. Os extratos protéicos, equivalentes a 25 μ g de proteína, foram submetidos a uma eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida a 7,5%, utilizando-se voltagem constante de 80 V por, aproximadamente, 180 minutos. As letras *f* e *m* referem-se a isoenzimas observadas nos isolados de *Pisolithus* sp. ou em micorrizas, respectivamente: (A) micorrizas formadas com o isolado IS83, incubadas a 40°C por três horas; (B) mesmo que em (A), incubadas a 25°C; (C) micélio de IS83, incubado a 28°C; (D) raízes de *Eucalyptus grandis* incubadas a 25°C; (E) mesmo que em (D), incubadas a 40°C; (F) micélio de RS24, incubado a 28°C; (G) micorrizas formadas com o isolado RS24, incubadas a 25°C; (H) mesmo que em (G), incubadas a 40°C por três horas.

4. DISCUSSÃO

Os fungos ectomicorrízicos *Paxillus involutus*, *Cenococcum geophilum* e *Pisolithus* sp., quando cultivados isoladamente em meios de cultura artificiais, são pouco tolerantes a temperaturas moderadamente elevadas (Figuras 10 a 13). As temperaturas-limite de crescimento ativo foram maiores para os isolados de *Pisolithus* sp. e parecem estar relacionadas com a origem desses isolados. Os isolados de *Pisolithus*, IS83, RV82 e Pt90A, foram obtidos de plantios de eucalipto na região de Viçosa, MG, enquanto que RS20, RS23 e RS24 são originários do Rio Grande do Sul. *P. involutus* e *C. geophilum* foram isolados na França. As diferentes respostas entre os isolados de *Pisolithus* são condizentes com a ampla distribuição geográfica desse fungo (BRUNDRETT et al., 1996; MARX, 1977, 1991; SMITH e READ, 1997).

A pré-exposição dos fungos ectomicorrízicos a temperaturas crescentes de 28°C a 33°C, ou a choques térmicos de 40°C, por períodos entre 20 e 60 minutos, resultou em respostas variáveis dos isolados fúngicos, em razão de uma posterior incubação a 35°C (Figuras 10 a 14). Efeitos positivos da pré-exposição foram observados apenas para alguns dos isolados de *Pisolithus*, especialmente para RS23 (Figura 11) e RS24 (Figura 12). Os padrões de resposta observados podem resultar do envolvimento de proteínas induzidas por choque térmico (HSPs) na aquisição da termotolerância.

O modo pelo qual as HSPs conferem termotolerância à célula, assim como os fatores que regulam a síntese dessas proteínas, não foram até o presente completamente elucidados. A correlação positiva entre a síntese de HSPs e o desenvolvimento da termotolerância sugere ser o acúmulo dessas proteínas um componente essencial do processo de proteção das células (GERNER e SCHNEIDER, 1975; JINN et al., 1989, 1993; KIMPLE et al., 1990; LI GLORIA e WERB, 1982; LIN et al., 1984; PETERSEN e MITCHELL, 1981).

A possibilidade do envolvimento de HSPs na aquisição de termotolerância em alguns dos isolados de *Pisolithus* é reforçada pela observação de que não houve indução das enzimas que participam do sistema antioxidativo - catalase, peroxidases e superóxido-dismutase - após a exposição do micélio fúngico a 40°C (Tabelas 2 e 3). Neste tratamento, observou-se uma redução nas atividades específicas da catalase e das peroxidases (Tabela 2). A atividade da Sod manteve-se praticamente inalterada, o que, associado a uma redução da atividade das enzimas responsáveis pela decomposição do H₂O₂, pode resultar em aumento dos níveis intracelulares desse radical e, conseqüentemente, no aumento da peroxidação das biomoléculas, incluindo-se os lipídios. Entretanto, não se verificou aumento significativo nos níveis de malondialdeído, que é um indicador da peroxidação de lipídios na célula, mesmo após a exposição a 40°C, por quatro horas. A manutenção dos níveis normais de malondialdeído tem, neste caso, duas explicações possíveis: (i) as atividades da catalase e das peroxidases, mesmo tendo sido reduzidas após a incubação a 40°C, foram suficientes para assegurar a remoção eficiente do H₂O₂ produzido endogenamente; ou (ii) outros componentes do sistema antioxidativo não-analisados contribuíram para a redução dos níveis de radicais livres nas células.

A redução na atividade das enzimas que participam do sistema antioxidativo nos fungos estudados contradiz os resultados mais comumente observados de indução dos mecanismos de defesa em condições similares à utilizada neste trabalho. Em *Neurospora crassa*, o choque térmico resulta em altos níveis de atividade de peroxidases, mas não se observam alterações na atividade da superóxido dismutase (KAPOOR e SVEENIVASAN, 1988). A

atividade de duas das três isoformas de catalase identificadas em *N. crassa* aumentou significativamente em resposta ao choque térmico (CHARY e NATVIG, 1989). O choque térmico induziu a catalase citossólica T de *Sacharomyces cerevisiae*, enquanto a catalase A, localizada no peroxissoma, não sofreu alteração (WIESER et al., 1991). Deve-se ressaltar que os fungos micorrízicos são simbioses obrigatórios (SMITH e READ, 1997) e, em função disso, parecem ter perdido várias das características inerentes ao modo de vida livre (SMITH e READ, 1997). Portanto, o estudo do comportamento desses organismos quando cultivados isoladamente em meios artificiais deve ser avaliado com cautela.

O sistema antioxidativo na parte aérea (Tabela 4) e em raízes (Tabela 6) de *E. grandis* também não respondeu favoravelmente à exposição a uma temperatura supra-ótima. Ao contrário, observaram-se reduções severas das atividades da catalase, das peroxidases e da ascorbato peroxidase em discos foliares após a incubação a 40°C (Tabela 4), mas não da Sod.

As alterações nos teores de proteínas, após elevação da temperatura de incubação, de 25°C-28°C para 40°C, não podem ser subestimadas como um componente importante da resposta dos organismos à imposição de uma condição potencialmente de estresse. Essas alterações têm grande influência sobre os resultados das atividades enzimáticas, quando essas são expressas com base no conteúdo protéico. A comparação das atividades específicas da Sod na parte aérea (Tabela 4) e nas raízes (Tabela 6) permite inferir que esses dois órgãos não apresentam diferenças marcantes em termos de atividade dessa enzima. Entretanto, quando os valores são comparados com base na atividade total, observa-se que a atividade da Sod na parte aérea (Tabela 5) é cerca de 4,3 vezes maior do que nas raízes (Tabela 7), o que é consistente com o fato de que as células fotossinteticamente ativas são mais sujeitas à geração de radicais livres (FOYER et al., 1994).

A maior atividade das peroxidases em micorrizas (Tabelas 6 e 7) resultou, possivelmente, da maior atividade dessas enzimas no micélio fúngico (Tabelas 2 e 3). Estes resultados contrastam com aqueles obtidos por ALBRECHT et al.

(1994), que não observaram atividade de peroxidases em *Pisolithus* sp. Os autores concluíram que o aumento da atividade das peroxidases em ectomicorrizas resultou da indução de novas isoenzimas no tecido radicular após o estabelecimento da associação micorrízica. Essa parece não ser a explicação mais apropriada para os dados do presente trabalho. Simplesmente, a atividade das peroxidases em ectomicorrizas é maior do que nas raízes porque a estrutura contém o micélio fúngico, e este pode representar até 50% da massa fresca das ectomicorrizas formadas com isolados muito agressivos (ALBRECHT et al., 1994), em que a atividade dessas enzimas é maior. Isso explica, também, a relação linear obtida por aqueles autores entre a agressividade do isolado fúngico e a atividade das peroxidases nas micorrizas. Como a atividade no micélio é muitas vezes superior à das raízes, um aumento da proporção de tecido fúngico na micorriza leva, necessariamente, a um aumento proporcional na atividade enzimática. Deve-se considerar, porém, que, neste trabalho, não foi feita uma análise de isoenzimas de peroxidases no material em estudo. Portanto, não se pode concluir, em definitivo, que o estabelecimento da associação micorrízica não resulta em alterações na indução de isoenzimas específicas de peroxidases.

Aparentemente, a regulação do sistema antioxidativo em micorrizas é exercida de forma mais eficiente do que nos organismos individualmente (Tabelas 6 e 7). Destaca-se o aumento da atividade da superóxido dismutase nas micorrizas formadas com o isolado de *Pisolithus*, IS83, associado a uma redução altamente significativa do conteúdo de malondialdeído. Esse isolado foi coletado em uma plantação de *Eucalyptus* em Viçosa, MG, onde a temperatura média anual é superior à da região de origem do RS24, que foi isolado no Rio Grande do Sul. Esse resultado sugere que o sistema de decomposição de radicais livres é regulado mais eficientemente quando o organismo é exposto a condições ambientais às quais se encontra mais adaptado.

Uma outra diferença expressiva entre os dois isolados de *Pisolithus* foi observada quanto à relação entre a atividade da Sod, cuja atividade resulta na produção de H₂O₂ na célula, e as enzimas catalase (Cat) e peroxidases (Pod) (Tabelas 6 e 7). Enquanto as relações Sod:Cat e Sod:Pod aumentaram em

micorrizas formadas com o IS83, houve uma redução expressiva dessas relações nas micorrizas formadas com o RS24 após a incubação do material a 40°C. O modo pelo qual o manejo dessas relações, na célula, afeta a capacidade de aclimatação a uma condição desfavorável de temperatura, ou a outros fatores de estresse, não pôde ser inferido. Entretanto, essas alterações são importantes, porque revelam estratégias diferentes da regulação do sistema antioxidativo em dois isolados fúngicos da mesma espécie.

A atividade total da Sod nas micorrizas não seguiu um padrão conservativo, considerando-se as contribuições individuais do micélio fúngico e das células vegetais para a atividade enzimática (Tabelas 3 e 7). Ao contrário do aumento observado, esperava-se uma redução da atividade total da Sod nas micorrizas, comparadas às raízes, porque o micélio fúngico contribui com menor atividade de Sod do que as células da raiz. Esse aumento foi resultado não só da maior expressão das isoenzimas já presentes nos dois organismos, quando crescendo isoladamente, mas também da expressão de um novo conjunto de isoenzimas de baixo peso molecular (Figura 14).

Deve-se ressaltar que a Sod constitui uma defesa primária importante da célula contra o radical superóxido produzido sob estresse (BOWLER et al., 1992; FOYER et al., 1994; TSANG et al., 1991). Este é o primeiro relato da alteração na expressão de isoenzimas de Sod no sistema *Eucalyptus grandis*-*Pisolithus* sp., que leva a considerações importantes acerca do modo pelo qual a tolerância a estresses ambientais pode ser aumentada pela associação micorrízica. DODD (1996) sugere que não apenas o aumento da atividade total, mas também a indução de novas isoenzimas que participam do sistema antioxidativo, nos diferentes compartimentos celulares, é de grande importância para o aumento da tolerância a fatores ambientais adversos.

Em um estudo recente da associação *Trifolium pratense*-*Glomus mosseae*, Palma et al. (1993) relataram a presença de uma CuZn-SOD (*G.m.* CuZn-SOD) em esporos de *G. mosseae*. Eles observaram, ainda, que as raízes não-micorrízicas possuíam uma Mn-SOD (Mn-SOD I) e duas CuZn-SOD (CuZn-SOD I e CuZn-SOD II), enquanto as raízes micorrízicas apresentaram seis

isoenzimas de SOD; em adição às isoenzimas presentes no controle, foram detectadas uma outra Mn-SOD (Mn-SOD II) e duas novas CuZn-SODs (*G.m.* CuZn-SOD e *myc*CuZn-SOD) (PALMA et al., 1993).

Os resultados do presente trabalho são consistentes com relatos de alterações na regulação gênica, que ocorrem após o estabelecimento da associação micorrízica (ARINES et al., 1993; ARINES et al., 1994a; DUMAS et al., 1989; HILBERT e MARTIN, 1988; MARTIN et al., 1997; PACOVSKY, 1989; RUIZ-LOZANO et al., 1996; TAGU e MARTIN, 1996; TIMONEN e SEM, 1998). Também corroboram a sugestão de Arines et al. (1994b), ou seja, de que o aumento da sobrevivência de plantas micropropagadas e micorrízicas está associado à regulação da expressão da SOD durante a associação. Entretanto, considerando-se que as novas isoenzimas de Sod têm, possivelmente, origem fúngica, o efeito da associação como estratégia de sobrevivência parece ser mais importante para o fungo micorrízico do que para a planta.

3. RESUMO E CONCLUSÕES

Plantas de *Eucalyptus grandis* foram aclimatadas a 25°C e 400 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em câmara de crescimento, e posteriormente submetidas a uma combinação de temperatura e irradiância supra-ótimas, 40°C e 1200 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a fim de se avaliarem as respostas fisiológicas dessa espécie a uma condição potencialmente fotoinibitória. Não se observaram efeitos isolados da temperatura ou do excesso de irradiância sobre a eficiência fotoquímica do Fotossistema II (FS II), avaliada pela razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima (F_v/F_m). Observou-se um efeito sinérgico dos dois fatores, que resultou em um decréscimo acentuado da razão F_v/F_m . Essa redução foi consequência, primariamente, da redução da fluorescência máxima (F_m), uma vez que o efeito da temperatura sobre a fluorescência inicial (F_0) foi negligível. A pré-aclimação das folhas à temperatura de 35°C e baixa irradiância, 5 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por duas horas, resultou em aumento da tolerância à condição fotoinibitória. Esse efeito foi observado somente após duas horas de pré-aclimação. Considerando que a termotolerância foi adquirida somente após um tempo relativamente prolongado de aclimação a uma temperatura moderada, não se pode descartar o envolvimento da síntese de novo de proteínas neste processo.

O funcionamento de alguns componentes do sistema antioxidativo foi avaliado na parte aérea e nas raízes de *E. grandis*, em dois isolados do fungo ectomicorrízico *Pisolithus sp.* e no sistema *Eucalyptus-Pisolithus*, em resposta à elevação da temperatura, de 25°C-28°C para 40°C.

A atividade específica da catalase (Cat) foi reduzida significativamente no micélio dos dois isolados fúngicos após quatro horas de incubação a 40°C. A atividade total das peroxidases não-específicas (Pod) foi reduzida somente no micélio do isolado RS24. Entretanto, alterações significativas na atividade total da superóxido dismutase (Sod) foram observadas apenas no isolado IS83. Essas alterações traduzem-se em estratégias diferentes de regulação do sistema antioxidativo, especialmente quanto às relações entre a atividade da Sod, responsável pela produção de H₂O₂ na célula, e a das enzimas Cat e Pod.

Houve reduções significativas nas atividades específicas da Cat, das Pod e da ascorbato peroxidase (AscPod), da atividade total da Sod e do teor de proteínas solúveis em folhas de *E. grandis* após incubação a 40°C. Essas alterações foram acompanhadas de menor teor de clorofila *a* e do aumento do teor de malondialdeído, uma indicação de que houve peroxidação de lipídios.

Em raízes, não se observou efeito significativo da temperatura sobre as atividades de Cat, Pod e Sod. Não se detectou atividade da AscPod nesse órgão. Houve redução significativa do teor de proteínas solúveis e aumento do teor de malondialdeído após incubação a 40°C por três horas. O sistema antioxidativo não foi capaz de remover eficientemente o excesso de radicais livres resultantes da imposição dessa condição de estresse.

Nas micorrizas, as atividades específica e total das Pod foram maiores do que nas raízes. Este resultado é explicado pela maior atividade dessas enzimas no micélio do *Pisolithus* do que nas raízes. As relações Sod:Cat e Sod:Pod nas micorrizas seguiram o padrão de aumento ou de redução observado no micélio dos dois isolados fúngicos. As atividades específica e total das Pod aumentaram nas micorrizas formadas com o isolado RS24, após a incubação a 40°C. O mesmo foi observado para a atividade da Sod nas micorrizas que continham o IS83.

A atividade total da Sod nas micorrizas também foi maior do que nas raízes, a despeito da sua menor atividade nos micélios fúngicos. Este aumento resultou da indução de quatro a cinco novas isoenzimas de Sod do tipo Mn-Sod, todas de baixo peso molecular e com possível origem fúngica.

Analisados em conjunto, os resultados obtidos nesse trabalho permitem inferir que o controle do sistema de decomposição de radicais livres é exercido de forma mais eficiente nas micorrizas do que nos componentes individuais da associação mutualista. Esse controle pode ser um dos responsáveis pelo benefício mútuo decorrente da associação simbiótica, especialmente observado em condições ambientais pouco favoráveis à sobrevivência dos organismos que dela participam.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSKA, I., KLOPPSTECH, K., OHAD, I. Early light-inducible protein in pea is stable during light stress but is degraded during recovery at low light intensity. **J. Biol. Chem.**, v.268, n.8, p.5438-5444, 1993.
- ALBRECHT, C., BURGESS, T., DELL, B., LAPEYRIE, F. Chitinase and peroxidase activities are induced in *Eucalyptus* roots according to aggressiveness of Australian ectomycorrhizal strains of *Pisolithus* sp. **New Phytol.**, v.127, n.2, p.217-222, 1994.
- ARINES, J., PALMA, J.M., VILARIÑO, A. Comparison of protein patterns in non-mycorrhizal and vesicular arbuscular mycorrhizal roots of red clover. **New Phytol.**, v.123, n.4, p.763-768, 1993.
- ARINES, J., QUINTELA, M., VILARIÑO, A., PALMA, J.M. Protein patterns and superoxide dismutase activity in non-mycorrhizal and arbuscular mycorrhizal *Pisum sativum* L. plants. **Plant and Soil**, v.166, n.1, p.37-45, 1994a.
- ARINES, J., VILARIÑO, A., PALMA, J.M. Involvement of the superoxide dismutase enzyme in the mycorrhization process. **Agricultural Science in Finland**, v.3, n.3, p.303-307, 1994b.
- ARMOND, P.A., BJÖRKMAN, O., STAEHELIN, L.A. Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes of *Nerium oleander*. A manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. **Biochim. Biophys. Acta**, v.601, n. 3, p.433-442, 1980.

- ARO, E.M., VIRGIN, I., ANDERSON, B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1143, n.2, p.113-134, 1993.
- ASADA, K. Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. **Methods Enzymol.**, v.105, p.422-9, 1984.
- ASADA, K. Scavenging reactive molecules in chloroplasts. In: BAKER, N.R., BOWYER, J.R. (Ed.). **Photoinhibition of Photosynthesis**. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 1994. p.129-142.
- ASADA, K., TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: KYLE, D.J., OSMOND, C.B., ARNTZEN, C.J. (Ed.) **Photoinhibition: Topics in Photosynthesis**. Amsterdam: Elsevier, 1987. v. 9, p.227-287.
- ATLAS, R.M., BARTHA, R. **Microbial Ecology: fundamentals and applications**. Redwood City: The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc., 1992. 563p.
- BALL, M.C., EGERTON, J.J.G., LEUNING, R., CUNNINGHAM, R.B., DUNNE, P. Microclimate above grass adversely affects spring growth of seedling snow gum (*Eucalyptus pauciflora*). **Plant Cell Environ.**, v.20, n.2, p.155-166, 1997.
- BEAUCHAMP, C.O., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. **Anal. Biochem.**, v.44, n.1, p.276-287, 1971.
- BECANA, M., PARIS, F.J., SANDALIO, L.M., DEL RIO, L.A. Isoenzymes of superoxide dismutase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Plant Physiol.**, v.90, n.3, p.1286-92, 1989.
- BERRY, J.A., RAISON, J.K. Responses of macrophytes to temperature. In: LANGE, O., OSMOND, C.B., NOBEL, P.S. (Ed.) **Encyclopedia of Plant Physiology**. Berlin: Springer-Verlag, 1981. v.12A, p.277-338.
- BJÖRKMAN, O., DEMMIG, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, v.170, n.1, p.61-66, 1987.

- BJÖRKMAN, O., BADGER, M.R., ARMOND, P.A. Response and adaptation of photosynthesis to high temperatures. In: TURNER, N.C., KRAMER, P.J. (Ed.) **Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress**. New York: Wiley, 1980. p 233-249.
- BJÖRKMAN, O., BOYTON, J., BERRY, J. Comparison of the heat stability of photosynthesis, chloroplast membrane reactions, photosynthetic enzymes, and the soluble protein in leaves of heat-adapted and cold-adapted C₄ species. **Year B. - Carnegie Inst. Wash.**, v.75, p.400-407, 1976.
- BJÖRKMAN, O., POWLES, S.B. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. **Planta**, v.161, n.6, p.490-504, 1984.
- BOWLER, C., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.43, p.83-116, 1992.
- BOYER, J.S. Plant productivity and environment. **Science**, v.218, n.4571, p.443-448, 1982.
- BRUNDRETT, M., BOUGHER, N., DELL, B., GROVE, T., MALAJCZUK. **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture**. Canberra: Pirie Printers, 1996. 374p.
- BURGESS, T., LAURENT, P., DELL, B., MALAJCZUK, N., MARTIN, F. Effect of the fungal isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhiza. **Planta**, v.195, n.3, p.408-417, 1995.
- CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Ann. Rev. Biochem.**, v.58, p.79-110, 1989.
- CAKMAK, I., MARSCHNER, H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. **Plant Physiol.**, v.98, n.4, p.1222-1227, 1992.
- CHARY, P., NATVIG, D.O. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. **J. Bacteriol.**, v.171, n.4, p.2646-2652, 1989.
- CHENIAE, G.M., MARTIN, I.F. Sites of manganese within photosystem II. Roles in O₂ evolution and system II. **Biochim. Biophys. Acta**, v.197, n.2, p.219-239, 1970.

- CLELAND, R.E., MELIS, A., NEALE, P.J. Mechanism of photoinhibition: photochemical reaction center inactivation in system II of chloroplasts. **Photosynth. Res.**, v.9, n.1, p.79-88, 1986.
- DALTON, D. A., LONGEBERG, L., ROBBINS, M. Purification and characterization of monodehydroascorbate reductase from soybean root nodules. **Arch Biochem. Biophys.**, v.292, n.1, p.281-286, 1992.
- DALTON D. A., RUSSEL, S.A., HONUS, F.J., PASCOE, G.A., EVANS, H.J. Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.83, n.11, p.3811-3815, 1986.
- DAVIES Jr., F.T., POTTER, J.R., LINDERMAN, R.G. Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P concentration – response in gas exchange and water relations. **Physiol. Plant.**, v.87, n.1, p.5-53, 1993.
- DHINDSA, R.S., MATOWE, W. Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation. **J. Exp. Bot.**, v.32, n.126, p.79-91, 1981.
- DODD, J. Antioxidant systems. www.und.ac.za/und/icd/citte/paper/net1/asc.html, 1996.
- DUMAS, E., GIANINAZZI-PEARSON, V., GIANINAZZI, S. Production of new soluble proteins during VA endomycorrhiza formation. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v.29, n.1/4, p.111-114, 1989.
- DRUMM-HERREL, H., GERHAUBER, U., MOHR, H. Differential regulation by phytochrome of the appearance of plastidic and cytoplasmic isoforms of glutathione reductase in mustard (*Synapis alba* L.) cotyledons. **Planta**, v.178, n.1, p.103-109, 1989.
- EDWARDS, E.A., ENARD, C., CREISSEN, G.P., MULLINEAUX, P.M. Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. **Planta**, v.192, n.1, p.137-143, 1994.
- FANGMEIER, A., BRUNSCHÖN, S., JÄGER, H.J. Time course of oxidant stress biomarkers in flag leaves of wheat exposed to ozone and drought stress. **New Phytol.**, v.126, n.1, p.63-69, 1994.
- FOOTE, C.S. Quenching of singlet oxygen. In: WASSEMAN, H.H., MURRAY, R.W. (Ed.) **Singlet Oxygen**. New York: Academic Press, 1979. p. 129-171.

- FOYER, C.H., FURBANK, R.T., HARBINSON, J. HORTON, P. The mechanisms contributing to photosynthetic control of electron transport by carbon assimilation in leaves. **Photosynth. Res.**, v.25, n.1, p.83-100, 1990.
- FOYER, C.H., LELANDAIS, M., KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiol. Plant.**, v.92, n.4, p. 696-717, 1994.
- FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.247, n.1, p.1-11, 1986.
- FURBANK, R.T., BADGER, M.R. Oxygen exchange associated with electron transport and photophosphorylation in spinach thylakoids. **Biochim. Biophys. Acta**, v.723, n.3, p.400-409, 1983.
- GERNER, E.W., SCHNEIDER, M.J. Induced thermal resistance in HeLa cells. **Nature**, v.256, n.5516, p.500-502, 1975.
- GIANINAZZI-PEARSON, V., GIANINAZZI, S. Cellular and genetical aspects of interaction between hosts and fungal symbionts in mycorrhizae. **Genome**, v.31, n.1, p.336-341, 1989.
- GOSSETT. D.R., MILLHOLLON, E.P., LUCAS, M.C. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. **Crop Sci.**, v.34, n.3, p.706-714, 1994.
- GOUNARIS, K., BRAIN, A.R.R., QUINN, P.J., WILLIAMS, W.P. Structural reorganization of chloroplast thylakoid membranes in response to heat-stress. **Biochim. Biophys. Acta**, v.766, n.1, p.198-208, 1984.
- GRIFFIOEN, W.A.J., IETSWAART, J.H., ERNST, W.H.O. Mycorrhizal infection of an *Agrostis capillaris* population on a copper contaminated soil. **Plant and Soil**, v.158, n.1, p.83-89, 1994.
- GUENTER, J.E., MELIS, A. The physiological significance of photosystem II heterogeneity in chloroplasts. **Photosynth. Res.**, v.23, n.1, p.105-109, 1990.
- HALLIWELL, B. Oxidative damage, lipid peroxidation, and antioxidant protection in chloroplasts. **Chem. Physics Lipids**, v.44, n.4, p.327-440, 1987.
- HARLEY, J.L., SMITH, S.E. **Mycorrhizal Symbiosis**. London: Academic Press, 1983. 483p.

- HARPER, D.B., HARVEY, B.M.R. Mechanisms of paraquat tolerance in perennial ryegrass. II. Role of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase. **Plant Cell Environ.**, v.1, n. 3, p.211-215, 1978.
- HAVAUX, M. Stress tolerance of photosystem II in vivo: antagonistic effects of water, heat and photoinhibition stresses. **Plant Physiol.**, v.100, n.1, p.424-432, 1992.
- HAVAUX, M. Characterization of thermal damage to the photosynthetic electron transport system in potato leaves. **Plant Sci.**, v.94, n.1, p.19-33, 1993a.
- HAVAUX, M. Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. **Plant Cell Environ.**, v.16, n.4, p.461-467, 1993b.
- HAVAUX, M. Temperature-dependent modulation of the photoinhibition-sensitivity of photosystem II in *Solanum tuberosum* leaves. **Plant and Cell Physiol.**, v.35, n.5, p.757-766, 1994.
- HENDRY, G.A.F., PRICE, A.H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G.A.F., GRIME, J.P. (Ed.) **Methods in Comparative Plant Ecology: a laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. p.148-152.
- HENDRY, G.A.F., THORPE, P.C., MERZLYAK, M.N. Stress indicators: lipid peroxidation. In: HENDRY, G.A.F., GRIME, J.P. (Ed.) **Methods in Comparative Plant Ecology: a laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. p.154-156.
- HILBERT, J. L., MARTIN, F. Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of ectomycorrhiza-specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. **New Phytol.**, v.110, p.339-346, 1988.
- HILBERT, J. L., COSTA, G., MARTIN, F. Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. Early ectomycorrhizins and polypeptide cleansing in eucalypt ectomycorrhizas. **Plant Physiol.**, v.97, n.3, p. 977-984, 1991.
- HOLLY, C., LAUGHLIN, G.P., BALL, M.C. Cold-induced photoinhibition and design of shelters for establishment of eucalypts in pasture. **Aust. J. Bot.**, v.42, n.2, p.139-147, 1994.

- HOSSAIN, M., NAKANO, K., ASADA, K. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in the regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. **Plant and Cell Physiol.**, v.25, n.3, p.385-395, 1984.
- IMLAY, J.A., LINN, S. DNA damage and oxygen radical toxicity. **Science**, v.240, n.4857, p.1302-1309, 1988.
- JINN, T.L., WU, S.H., YEH, C.H., HSIEH, M.H., YEH, Y.C., CHEN, Y.M., LIN, C.Y. Immunological kinship of Class I low molecular weight heat shock proteins and thermostabilization of soluble proteins in vitro among plants. **Plant and Cell Physiol.**, v.34, n.7, p.1055-1062, 1993.
- JINN, T.L., YEH, Y.C., CHEN, Y.M., LIN, C.Y. Stabilization of soluble proteins in vitro by heat shock proteins-enriched ammonium sulfate fraction from soybean seedlings. **Plant and Cell Physiol.**, v.30, n.4, p.463-469, 1989.
- KAISER, W.M. The effect of hydrogen peroxide on CO₂ fixation of isolated intact chloroplast. **Biochim. Biophys. Acta**, v.440, n.3, p.475-482, 1976.
- KAISER, W.M. Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. **Planta**, v.145, n.3, p.377-382, 1979.
- KAPOOR, M., SVEENIVASAN, G.M. The heat shock response of *Neurospora crassa*: stress-induced thermotolerance in relation to peroxidase and superoxide dismutase levels. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.156, n.3, p.1097-1102, 1988.
- KIMPLE, J.A., NAGAO, R.T., GOEKJIAN, V., KEY, J.L. Regulation of the heat shock response in soybean seedlings. **Plant Physiol.**, v.94, n.3, p.988-995, 1990.
- KITAJIMA, M., BUTLER, W.L. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry by dibromothymoquinone. **Biochim. Biophys. Acta**, v.376, n.1, p.105-115, 1975.
- KRAUSE, G.H., SANTARIUS, K. Relative thermostability of the chloroplast envelope. **Planta**, v.127, n.3, p.285-299, 1975.
- KRAUSE, G.H., WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **Plant Mol. Biol.**, v.42, p.313-349, 1991.

- KRINSKY, N. Biological roles of singlet oxygen. In: WASSEMAN, H.H., MURRAY, R.W. (Ed.) **Singlet Oxygen**. New York: Academic Press, 1979. p. 129-171.
- KYLE, D.J., OHAD, I. The mechanism of inhibition in higher plants and green algae. In: STAEHELIN, L.A., ARNTZEN, C.J. (Ed.) **Encyclopedia of Plant Physiology**. Berlin: Springer-Verlag, 1987. V.19, p.468-475.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.
- LARCHER, W., WAGNER, J., THAMMATHAWORN, A. Effects of superimposed temperature stress on in vivo chlorophyll fluorescence of *Vigna unguiculata* under saline stress. **J. Plant Physiol.**, v.136, n.1, p. 92-102, 1990.
- LEVINE, R.L., GARLAND, D., OLIVER, C., AMICI, A., CLIMENT, I., LENZ, A., AHN, B., SHALTIEL, S., STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.**, v.186, p.464-478, 1990.
- LI GLORIA, C., WERB, Z. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in chinese hamster fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.79, n.10, p.3218-3222, 1982.
- LIN, C.Y., ROBERTS, J.K., KEY, J.L. Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings: synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. **Plant Physiol.**, v.74, n.1, p.152-160, 1984.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDOLL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, n.1, p.265-275, 1951.
- MARTIN, F., HILBERT, J. L. Morphological, biochemical and molecular changes during ectomycorrhiza development. **Experientia**, v.47, n.4, p.321-331, 1991.
- MARTIN, F., LAPEYRIE, F., TAGU, D. Altered gene expression during ectomycorrhizal development. In: CARROL, G., TUDZUNSKI (Ed.) **The Mycota. Plant Relationships**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. v.5, p. 223-242.
- MARTINEZ y HUAMAN, C.A. **Efeitos dos estresses hídrico, luminoso e oxidativo em diferentes espécies de batata (*Solanum* spp.)**. Viçosa, MG:UFV, 122p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa, 1995.

- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, v.59, n.2, p.153-163, 1969.
- MARX, D.H. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Can. J. Microbiol.**, v.23, n.3, p.217-223, 1977.
- MARX, D.H. Variability in ectomycorrhizal development and growth among isolates of *Pisolithus tinctorius* as affected by source, age, and reisolation. **Can. J. For. Res.**, v.11, n.1, p.168-174, 1981.
- MARX, D.H. The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment. In: **ECOPHYSIOLOGY OF ECTOMYCORRHIZAE OF FOREST TREES**, 7, 1991, Stockholm. **Proceedings...** Falun: Marcus Wallenberg Foundation, 1991. p.54-90.
- MARX, D.H., DANIEL, W.J. Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. **Can. J. Microbiol.**, v.22, n.3, p.338-341, 1976.
- MASOJIDEK, J., HALL, D.O. Salinity and drought stresses amplified by high irradiance in sorghum. **Photosynthetica**, v.27, n.2, p.159-171, 1992.
- MATTERS, G.L., SCANDALIOS, J.G. Effect of the free radical generating herbicide paraquat on the expression of superoxide dismutase (SOD) genes in maize. **Biochim. Biophys. Acta**, v.882, n.1, p.29-38, 1986.
- MISZALSKI, Z., BOTTON, B. Effect of sulfite on superoxide dismutase activity in the mycorrhizal fungus *Rhizopogon roseolus*. **Mycorrhiza**, v.6, n.1, p.73-75, 1996.
- MISZALSKI, Z., BOTTON, B., TURNAU, K. New SOD isoform in *Rhizopogon roseolus* (Corda in Sturm) in the presence of cadmium. **Acta Physiol. Plant.**, v.18, n.2, p.129-134, 1996.
- MONK, L.S., DAVIES, H.V. Antioxidant status of the potato tuber and Ca⁺⁺ deficiency as a physiological stress. **Physiol Plant.**, v.75, n.3, p.411-416, 1989.
- MORAN, J.F., BECANA, M., ITURBE-ORMAETXE, I., FRECHILLA, S., KLUCAS, R.V., APARICIO-TEJO, P. Drought induces oxidative stress in pea plants. **Planta**, v.194, n.3, p.346-352, 1994.

- MULKEY, S.S., PEARCY, R.W. Interactions between acclimation and photoinhibition of photosynthesis in a tropical rain forest understory herb, *Alocasia macrorrhiza*, during simulated canopy gap formation. **Funct. Ecol.**, v.6, n.6, p.719-729, 1992.
- NAKANO, Y., ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiol.**, v.22, n.5, p.867-880, 1981.
- NASH, D., MIYAO, M., MURATA, N. Heat inactivation of oxygen evolution in photosystem II particles and its acceleration by chloride depletion and exogenous manganese. **Biochim. Biophys. Acta**, v.807, n.2, p.127-133, 1985.
- NISHIYAMA, Y., KOVÁCS, E., LEE, C.B., HAYASHI, H., WATANABE, T., MURATA, N. Photosynthetic adaptation to high temperature associated with thylakoid membranes of *Synechococcus* PCC7002. **Plant and Cell Physiol.**, v.34, n.2, p.337-343, 1993.
- OHAD, I., KEREN, N., ZER, H., GONG, H., MOR, T.S., GAL, A., TAL, S., DOMOVICH, Y. Light-induced degradation of the photosystem II reaction center D1 protein in vitro: an integrative approach. In: BAKER, N.R., BOWYER, J.R. (Ed.). **Photoinhibition of Photosynthesis**. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 1994. p.161-177.
- ÖGREN, E. The significance of photoinhibition for photosynthetic productivity. In: BAKER, N.R., BOWYER, J.R. (Ed.). **Photoinhibition of Photosynthesis**. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 1994. p.433-447.
- ÖGREN, E., EVANS, J.R. Photoinhibition of photosynthesis in situ in six species of *Eucalyptus*. **Aust. J. Plant Physiol.**, v.19, n.3, p.223-232, 1992.
- OKAMURA, H., MIMURA, A., YAKOU, Y., NIWANO, M., TAKAHARA, Y. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. **Phytochemistry**, v.33, n.3, p.557-561, 1993.
- OSMOND, C.B. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: BAKER, N.R., BOWYER, J.R. (Ed.). **Photoinhibition of Photosynthesis**. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 1994. p.1-24.
- OSONUBI, O. Comparative effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation and phosphorus fertilization on growth and phosphorus uptake of maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L.) plants under drought-stressed conditions. **Biol. Fertil. Soils**, v.18, n.1, p.55-59, 1994.

- PACIFICI, R.E., DAVIES, K.J.A. Protein degradation as an index of oxidative stress. **Methods Enzymol.**, v.186, p.485-502, 1990.
- PACOVSKY, R.S. Carbohydrate, protein and amino acid status of *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium symbiosis*. **Physiol. Plant.**, v.75, n.3, p.346-354, 1989.
- PALMA, J.M., LONGA, M.A., DEL RÍO, L.A., ARINES, J. Superoxide dismutase in vesicular-arbuscular red clover plants. **Physiol. Plant.**, v.87, n.1, p.77-83, 1993.
- PETERSEN, N.S., MITCHELL, H.K. Recovery of protein synthesis after heat shock: prior heat-treatment affects the ability of cells to translate mRNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.78, n.3, p.1708-1711, 1981.
- POLLE, A., CHAKRABARTI, K., CHAKRABARTI, S., SEIFERT, F., SCHRAMMEL, P., REENEBERG, H. Antioxidants and manganese deficiency in needles of norway spruce (*Picea abies* L.) trees. **Plant Physiol.**, v.99, n.3, p.1084-1089, 1992.
- POWLES, S.B. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v.35, p.15-44, 1984.
- PRYOR, W.A., STANLEY, J.P., BLAIR, E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids. II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. **Lipids**, v.11, n.5, p.370-379, 1976.
- PÜTTER, J. Peroxidases. **Methods Enzymatic Anal.**, v.2, p.685-690, 1974.
- PYRONZINSK, K.A., MALLOCK, D.W. The origin of land plants: a matter of mycotrophy. **Biosystems**, v.6, n.3, p.153-164, 1975.
- RAISON, J.K., PIKE, C.S., BERRY, J.A. Growth temperature-induced alterations in the thermotropic properties of *Nerium oleander* membrane lipids. **Plant Physiol.**, v.70, n.1, p.215-218, 1982.
- READ, D.J. Mycorrhizal fungi in natural and semi-natural plant communities. In: **ECOPHYSIOLOGY OF ECTOMYCORRHIZAE OF FOREST TREES**, 7, 1991, Stockholm. **Proceedings...** Falun: Marcus Wallenberg Foundation, 1991. p.27-53.
- RINCON, E., HUANTE, P., RAMIREZ, Y. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on biomass production by the cactus *Pachycereus pecten-aboriginum*. **Mycorrhiza**, v.3, n.2, p.79-81, 1993.

- ROBINSON, J.M., SMITH, M.G., GIBBS, M. Influence of hydrogen peroxide upon carbon dioxide photoassimilation in the spinach chloroplasts. **Plant Physiol.**, v.65, n.4, p.755-759, 1980.
- RODEN, J.S., BALL, M.C. The effect of elevated [CO₂] on growth and photosynthesis of two *Eucalyptus* species exposed to high temperatures and water deficits. **Plant Physiol.**, v.111, n.3, p.909-919, 1996.
- ROSENDAHL, C.N., ROSENDAHL, S. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus spp.*) on the response of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to salt stress. **Environ. Exp. Bot.**, v.31, n.3, p.313-318, 1991.
- RUIZ-LOZANO, J.M., AZCÓN, R., PALMA, J.M. Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. **New Phytol.**, v.134, n.2, p.327-333, 1996.
- RUTHERFORD, M.C., MIDGLEY, G.F., DAVIS, G.W. Covert symptoms of pollution stress in introduced vegetation near Cape Town. **S. Afr. J. Sci.**, v.89, n.1, p.50-51, 1993.
- SALIN, M.L. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. **Physiol. Plant.**, v.72, n.3, p.681-689, 1988.
- SANE, P.V., DESAI, T.S., TATAKE, V.G., GOVINDJEE. Heat induced reversible increase in Photosystem I emission in algae, leaves and chloroplasts: spectra, activities, and relation to state changes. **Photosynthetica**, v.18, n.4, p.439-444, 1984.
- SANTARIUS, K.A. Sites of heat sensitivity in chloroplasts and differential inactivation of cyclic and noncyclic photophosphorylation by heat. **J. Therm. Biol.**, v.1, n.1, p.101-107, 1975.
- SANTARIUS, K.A., MÜLLER, M. Investigations on heat resistance of spinach leaves. **Planta**, v.146, n.4, p.529-538, 1979.
- SCHREIBER, U., BERRY, J.A. Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of the photosynthetic apparatus. **Planta**, v.136, n.3, p.233-238, 1977.
- SCHUSTER, G., EVEN, D., KLOPPSTECH, K., OHAD, I. Evidence for protection by heat shock proteins against photoinhibition during heat shock. **EMBO J.**, v.7, n.1, p.1-6, 1988.

- SIGMA. St. Louis: Sigma-Aldrich, 1998. p. 246.
- SMITH, S.E., READ, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 603p.
- SÖDERSTRÖM, B. The fungal partner in the mycorrhizal symbiosis. In: **ECOPHYSIOLOGY OF ECTOMYCORRHIZAE OF FOREST TREES**, 7, 1991, Stockholm. **Proceedings...** Falun: Marcus Wallenberg Foundation, 1991. p.5-26.
- SPYCHALLA, J.P., DESBOROUGH, S.L. Superoxide dismutase, catalase, and alpha-tocopherol content of stored potato tuber. **Plant Physiol.**, v.94, n.3, p.1214-1218, 1990.
- STADTMAN, E.R., OLIVER, C.N. Metal-catalyzed oxidation of proteins: Physiological consequences. **J. Biol. Chem.**, v.266, n.3, p.2005-2008, 1991.
- STAPEL, D., KRUSE, E., KLOPPSTECH, K. The protective effect of heat shock proteins against photoinhibition under heat shock in barley (*Hordeum vulgare*). **J. Photochem. Photobiol.**, v.21, n.2, p.211-217, 1993.
- SUNDBY, C., MELIS, A., MÄENPÄÄ, P., ANDERSON, B. Temperature-dependent changes in the antenna size of Photosystem II. Reversible conversion of Photosystem II_a to Photosystem II_b. **Biochim. Biophys. Acta**, v.851, n.3, p.475-483, 1986.
- TAGU, D., MARTIN, F. Molecular analysis of cell wall proteins expressed during the early steps of ectomycorrhizal development. **New Phytol.**, v.133, n.1, p.73-85, 1996.
- TAGU, D., PYTHON, M., CRÉTIN, C., MARTIN, F. Cloning symbiosis-related cDNAs from eucalypt ectomycorrhizas by PCR-assisted differential screening. **New Phytol.**, v.125, n.2, p.339-343, 1993.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood City: Benjamin/Cummings Publishing, 1991. 559p.
- TIMONEN, S., SEM, R. Heterogeneity of fungal and plant enzyme expression in intact Scots pine-*Suillus bovinus* and -*Paxillus involutus* mycorrhizospheres developed in natural forest humus. **New Phytol.**, v.138, n.2, p.355-366, 1998.

- TOBAR, R.M., AZCÓN, R., BAREA, J.M. The improvement of plant N acquisition from an ammonium-treated, drought-stressed soil by the fungal symbiont in arbuscular mycorrhizae. **Mycorrhiza**, v.4, n.1, p.105-108, 1994.
- TSANG, W.T., BOWLER, C., HEROUART, D., VAN CAMP, W., VILLARROEL, R., GENTELLO, C., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. **Plant Cell**, v.3, n.8, p.783-792, 1991.
- VAN KOOTEN, O., SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynth. Res.**, v.25, n.2, p.147-150, 1990.
- VIDAL, M.T., AZCON AGUILAR, C., BAREA, J.M., PLIEGO ALFARO, F. Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. **HortScience**, v.27, n.7, p.785-787, 1992.
- WALKER, D. **The use of oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis**. 2.ed. Sheffield: Oxygraphics, 1988. 188p.
- WEBB, M.S., GREEN, B.R. Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1060, n.2, p.133-158, 1991.
- WEIS, E. Light - and temperature - induced changes in the distribution of excitation energy between Photosystem I and Photosystem II in spinach leaves. **Biochim. Biophys. Acta**, v.807, n.2, p.118-126, 1985.
- WIESER, R., ADAM, G., WAGNER, A., SCHULLER, C., MARCHLER, G., RUIS, H., KRAWIEC, Z., BILINSKI, T. Heat shock factor-dependent heat control of transcription of the CTT1 gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v.266, n.19, p.12406-12411, 1991.
- WISE, R.R., NAYLOR, A.W. Chilling-enhanced photooxidation: Evidence for the role of singlet oxygen and endogenous antioxidants. **Plant Physiol.**, v.83, n.2, p.278-282, 1987.
- YAMASHITA, T., BUTLER, W.L. Inhibition of chloroplasts by UV-irradiation and heat treatment. **Plant Physiol.**, v.43, n.12, p.2037-2040, 1968.
- YORDANOV, I., DILOVA, S., PETKOVA, R., PANGELOVA, T., GOLTSEV, V., SÜSS, K.-H. Mechanisms of the temperature damage and acclimation of the photosynthetic apparatus. **Photobiochem. Photobiophys.**, v.12, n.1/2, p.147-155, 1986.