

CARLOS LÚCIO DE LACERDA VASCONCELOS E SOUZA

**METODOLOGIAS NÃO-INVASIVAS E BIOQUÍMICAS USADAS NA
DETECÇÃO DE EFEITOS FISIOLÓGICOS CAUSADOS POR
SALINIDADE, CÁDMIO E FLÚOR EM TOMATEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003**

CARLOS LÚCIO DE LACERDA VASCONCELOS E SOUZA

**METODOLOGIAS NÃO-INVASIVAS E BIOQUÍMICAS USADAS NA
DETECÇÃO DE EFEITOS FISIOLÓGICOS CAUSADOS POR
SALINIDADE, CÁDMIO E FLÚOR EM TOMATEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título *Magister Scientiae*.

Aprovada: 10 de março de 2003

Prof. José Cambraia
(Conselheiro)

Prof. Carlos Alberto Martínez y Huaman
(Conselheiro)

Profa. Rosane Maria de Aguiar Euclides

Prof. Juraci Alves de Oliveira

Prof. Marco Antonio Oliva Cano
(Orientador)

Ominia mea mecun porto

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr. Marco Antonio Oliva Cano, pela confiança, atenção, incansável disposição em ajudar nos momentos difíceis, pela orientação e sobretudo pela amizade.

Ao Prof Dr. José Cambraia, pela revisão do texto, orientação, cessão do laboratório para execução das análises enzimáticas.

Ao Prof Dr. Carlos Alberto Martinez y Huaman pela revisão do texto e orientação.

Ao Profa Dra. Rosane Maria de Aguiar Euclides pela participação na banca examinadora e pelas sugestões.

Ao Prof Dr. Juraci Alves de Oliveira pela participação na banca examinadora e pelas sugestões.

Ao funcionário da Unidade de Crescimento de Plantas/DBV/UFV, Rogério Gomide, pela boa vontade e a inigualável disposição para auxiliar na execução e análise dos experimentos.

Aos funcionários João Bosco da Unidade de Crescimento de Plantas/DBV/UFV, Celso e José Carmo, do Horto Botânico/DBV/UFV, pela ajuda na execução dos experimentos.

Ao colega de curso Carlos André Gonçalves, que me trouxe para o curso de Fisiologia Vegetal.

Aos colegas da UCP, Francisco Lobo, Rogério Mauro Machado Alves, Luzimar Silva, Carmem Eugenia e Alan Carlos Costa pela convivência amistosa.

Aos meus pais que mesmo nos momentos difíceis me estimularam a continuar.

A Ana Maria Camargo Braga, pela paciência durante este dois anos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	16
3 SÍMBOLOS, NOMENCLATURAS, ABREVIACÕES E UNIDADES USADAS	21
CAPÍTULO 1	22
RESUMO	23
ABSTRACT	24
1.1 INTRODUÇÃO	25
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	27
1.2.1 MATERIAL VEGETAL E PARÂMETROS MEDIDOS	27
1.2.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL OSMÓTICO	28
1.2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	28
1.2.3.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	28
1.2.3.2 ATIVIDADE DAS POXS	29
1.2.3.3 ATIVIDADE DAS SODS	29
1.2.4 DETERMINAÇÃO DO COMPLEXO MDA-TBA	29
1.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
1.4 CONCLUSÕES	40

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO 2	45
RESUMO	46
ABSTRACT	47
2.1 INTRODUÇÃO	48
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.2.1 MATERIAL VEGETAL E PARÂMETROS MEDIDOS	50
2.2.2 DETERMINAÇÃO DO CÁDMIO PRESENTE NAS RAÍZES E NAS FOLHAS	51
2.2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	51
2.2.3.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	51
2.2.3.2 ATIVIDADE DAS POXS	52
2.2.3.3 ATIVIDADE DAS SODS	52
2.2.4 DETERMINAÇÃO DO COMPLEXO MDA-TBA	52
2.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
2.4 CONCLUSÕES	63
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
CAPÍTULO 3	69
RESUMO	70
ABSTRACT	71
3.1 INTRODUÇÃO	72
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	75
3.2.1 MATERIAL VEGETAL E PARÂMETROS MEDIDOS	75

3.2.2 DETERMINAÇÃO DO FLÚOR PRESENTE NAS FOLHAS	76
3.2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	76
3.2.3.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	76
3.2.3.2 ATIVIDADE DAS POXS	77
3.2.3.3 ATIVIDADE DAS SODS	77
3.2.4 DETERMINAÇÃO DO COMPLEXO MDA-TBA	77
3.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	78
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3.4 CONCLUSÕES	88
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

RESUMO

SOUZA, Carlos Lúcio de Lacerda Vasconcelos, M.S, Universidade Federal de Viçosa, março 2003. **Metodologias não-invasivas e bioquímicas usadas na detecção dos efeitos fisiológicos causados por salinidade, cádmio e flúor em tomateiro.** Orientador: Marco Antônio Oliva Cano. Conselheiros: Carlos Alberto Martinez y Huaman e José Cambraia.

Plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) com sete dias de idade, cultivadas em solução nutritiva de Hoagland, foram expostas às concentrações de $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$ de 0, 50, 100 e 150 mol m^{-3} ou de cádmio de 0, 10, 30 e 50, $\mu\text{mol L}^{-1}$ de flúor de 0, 1, 3 e 5, $\mu\text{g L}^{-1}$, na forma de chuvas simuladas diárias, com a finalidade de avaliar os danos fisiológicos causados por estes agentes estressores, por meio de metodologias não-invasivas e pela atividade de certas enzimas ligadas a um possível estresse oxidativo. Após quatorze dias de exposição aos tratamentos com flúor ou cádmio e vinte um dias para o tratamento salino, foram avaliados, os teores de clorofila, a assimilação de carbono, a condutância estomática, a transpiração, a relação Ci/Ca , a fluorescência rápida e lenta, o teor dos agentes estressores na planta, as atividades das enzimas SODs e POXs e a peroxidação de lipídeos. As plantas submetidas aos tratamentos com $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$ tiveram o potencial osmótico das folhas e raízes, bem como os teores de clorofilas *a*, *b*, total e carotenóides diminuídos, sendo que a relação clorofila *a/b* não foi alterada. A assimilação de carbono, a relação carbono interno/externo, a condutância estomática, a transpiração, a taxa relativa de transporte de elétrons e o q_p diminuíram enquanto que a relação F_v/F_m e o q_N não sofreram alterações significativas. As atividades das SODs e das POXs foram aumentadas significativamente pelo estresse, sendo também observado um aumento na peroxidação de lipídeos, pelo incremento da quantidade do malonaldeído formado. As plantas submetidas aos diversos tratamentos com cádmio tiveram os teores do metal presentes nas raízes e folhas aumentados, os teores de clorofilas *a*, *b*, total e carotenóides, diminuídos sensivelmente a relação clorofila *a/b* não foi alterada. A assimilação de carbono diminuiu, a relação carbono interno/externo aumentou, a condutância estomática e a transpiração não sofreram alterações significativas. Os parâmetros de fluorescência, F_v/F_m , q_p e q_N e a taxa relativa de transporte de elétrons foram alterados pelo cádmio. As atividades das SODs e POXs foram aumentadas pelo estresse, também foi observado um aumento significativo na peroxidação de lipídeos. As plantas expostas às chuvas simuladas

com diversas concentrações de flúor tiveram elevados teores deste íon nas folhas. Os teores de clorofilas *a*, *b*, total, carotenóides, e a relação clorofila *a/b* não foram alterados. A assimilação de carbono, a relação carbono interno externo, a condutância estomática e a transpiração, não sofreram alterações significativas. Os parâmetros de F_v/F_m , q_p , q_N e a taxa relativa de transporte de elétrons não foram alterados. O flúor nas quantidades aplicadas, não foi capaz de produzir um estresse oxidativo, não ocorrendo um aumento significativo das atividades das SODs e POXs e da peroxidação de lipídeos. A associação do IRGA, fluorômetro e medidor SPAD, foram capazes de detectar alterações no metabolismo das plantas tratadas com cloreto de sódio e cádmio e de sugerir possíveis causas destas alterações. Os efeitos dos agentes causadores de estresse, nas plantas, foram evidenciados pela diminuição dos teores de clorofila, eficiência do fotossistema II e assimilação de carbono, pelo aumento das atividades das POXs e SODs e pelo aumento da peroxidação dos lipídeos. A quantidade de flúor usado foi insuficiente para causar injúrias as plantas, o que foi demonstrado pela associação do IRGA, do fluorômetro e do medidor SPAD.

ABSTRACT

SOUZA, Carlos Lúcio de Lacerda Vasconcelos, M.S, Universidade Federal de Viçosa, march 2003. **Non invasive and biochemistries methodologies used the detect of the physiological effects due by salinity, cadmium and fluoride in tomato plants.** Advisor: Marco Antonio Oliva Cano. Committee members: Carlos Alberto Martinez y Huaman e José Cambraia.

Seven days old tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill) were grown in Hoagland solution and exposed to different concentrations of Na⁺ Cl⁻, cadmium and fluorine simulated rain. The main goal was to evaluate the physiological damages due to the stressors elements through non invasive methods and enzymatic activity related to oxidative stress. At the end of the exposure period parameters were measured, such as, chlorophylls content, carbon assimilation, stomatal conductance, transpiration, Ci/Ca ratio, fluorescence characteristics, ions content, SOXs and PODs activity and lipids peroxidation. Plants submitted to Na⁺ Cl⁻ treatment had their leaves and roots osmotic potential decreased. The concentrations of chlorophyll *a*, *b*, total and carotenoids decreased but the chlorophyll *a/b* ratio did not change. All gas exchange parameter, electron transport rate and q_p decreased, while the F_v/F_m ratio and q_N did not suffer any significant changes. POXs and SODs activity showed a significantly increase due to the saline stress. Similarly, the lipid peroxidation was observed by an increment on *malaldehyd* formation. The plants on cadmium treatment showed a high content of the metal on leaves and roots concomitantly with the applied doses. The content of chlorophylls *a*, *b*, total, and carotenoids decreased while the chloroiphyll *a/b* ratio did not change. The carbon assimilation rate decreased despite the fact that the no significant alterations were observed on Ci/Ca ratio, stomatal conductance and transpiration rate. The fluorescence traits, F_v/F_m , q_p , q_N , and the electron transport rate were altered by cadmium. POXs and SODs acticity, as well as lipids peroxidation increased significantly under the cadmium treatment. The plants exposed to simulated acid rain containing fluorine showed a high concentration of the element on the leaves. The gas exchange parameters, in this treatment, were not significantly affected. It had supposed that the applied doses of fluorine were not enough to induce an oxidative stress, since the SODs and POxs activity and lipid peroxidation were not affected. The combined use of IRGA, fluorometer and SPAD reader was able to detect the physiological alterations on plants treated with NaCl and cadmium, showing thus, a potential as a non invasive methodology. The metabolic effects of the elements were evident by a decrease

on chlorophylls content, carbon assimilation rate, and PSII efficiency while the activity of SODXs and POXs and lipids peroxidation increased .The treatment with fluorine acid rain, was not effective to produce detectable physiological changes, as showed by the non invasive screening, probably due to the applied doses.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Estressores abióticos e bióticos do ambiente, antropogênicos ou não, podem afetar a eficiência fotossintética nas plantas via indução de estresses oxidativos, degradação de clorofilas e de outras modificações nocivas ao aparelho fotossintético (BALL *et al.*, 1994; KRUPA & MONIAK, 1998; JONES, 1998; CHO & PARK, 2000). Dos principais estresses antropogênicos, são motivos de estudos, os efeitos do cloreto de sódio, do cádmio e do flúor nas plantas e nos ecossistemas. Atualmente, é possível realizar avaliações fisiológicas dos efeitos desses compostos, mediante o uso de métodos não-invasivos e não-destrutivos, como a utilização de analisadores de gás no infravermelho (IRGAS) e fluorômetros.

Um dos fatores estressantes, mais comuns nos sistemas agrícolas, é a salinidade, podem ser resultantes de um manejo inapropriado da irrigação. Estima-se que 20% dos solos cultivados, no mundo, tenham algum tipo de problema com salinidade (ZHU, 2001). Regiões com alta demanda evaporativa e uso intensivo da irrigação, como algumas áreas do nordeste brasileiro, desenvolvem estresses salinos que podem afetar a produção agrícola. Uma das soluções para o problema é a dessalinização do solo ou o cultivo de plantas resistentes ao estresse salino. Altas concentrações de sal interferem na permeabilidade das membranas, na atividade de várias enzimas, na absorção de nutrientes e no funcionamento do aparelho fotossintético (ZHU, 2001). Poderá ainda, ocorrer fechamento estomático, afetando as taxas de troca de CO₂ e O₂. (CUARTERO & FERNANDEZ-MUNOZ, 1999; RAJGURU *et al.*, 1999; ZHU, 2001; HERNÁNDEZ & ALMANSA, 2002). Estas alterações no metabolismo nem sempre produzem danos visíveis e imediatos, sendo comuns injúrias latentes, que muitas vezes se manifestarão apenas no fim do ciclo das plantas.

O cádmio é um elemento não essencial, reconhecido como um dos mais perigosos metais pesados, devido a sua toxicidade para animais e vegetais. No ambiente, suas concentrações são geralmente baixas, mas com o aumento de atividades antropogênicas, tais como mineração de zinco, indústria siderúrgica, o uso de adubos fosfatados, utilização de lodo de esgoto como fertilizante e a queima de combustíveis fósseis, as quantidades disponíveis para as plantas têm aumentado cada vez mais (PAGE & BINGHAM, 1973).

Esse metal é prontamente absorvido pelas plantas e translocado para seus órgãos aéreos (OLIVEIRA *et al.*, 2001), facilitando, assim, sua entrada na cadeia alimentar (DAS *et al.*, 1997). Ele afeta o crescimento, o vigor e a produtividade das plantas quando presente em doses sub-letais (MENDELSSOHN *et al.*, 2001). O cádmio pode alterar a estrutura, a atividade e a composição do aparelho fotossintético, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta e do tempo de exposição (TUKENDORF *et al.*, 1997). Na literatura são descritos efeitos desse metal sobre a transpiração, a síntese de pigmentos, a fotossíntese, a respiração, a translocação através do floema, a morfologia de organelas e sobre a estrutura e da função das membranas celulares (PRASAD, 1997). Em cloroplastos isolados, o cádmio interfere no fotossistema II (PSII) e em plantas intactas, altera a reação de Hill e o intercâmbio de CO₂ (LEE *et al.*, 1976; WEIGEL, 1985; SHEORAN *et al.*, 1990; ATAL, *et al.*, 1991; NASCIMENTO & PEREIRA, 1997).

Efluentes gasosos como flúor, provenientes da produção de alumínio e de fertilizantes ou elementos residuais de ampla aplicação na indústria, como cádmio, podem alterar significativamente o aproveitamento da energia luminosa pelas plantas e causar injúrias letais à vegetação (ALVES *et al.*, 1990; MARKERT, 1993; ARNDT *et al.*, 1995; FIGUEIREDO *et al.*, 1997). Com a expansão das atividades industriais no terceiro mundo (incineradores, fundição de alumínio, produção de adubos como o superfosfato e a fabricação de vidro e cerâmica), o flúor ganhou destaque como poluente. Sob a forma de ácido fluorídrico ou de tetrafluoreto de silício, o flúor é o mais fitotóxico dos poluentes atmosféricos. O flúor é capaz de causar danos às plantas em concentrações de até 1 mg m⁻³, enquanto outros poluentes, como o dióxido de enxofre (SO₂) e o ozônio (O₃), somente causam injúrias a partir de concentrações de 100 mg m⁻³ (ARNDT *et al.*, 1995). O flúor interfere no crescimento e no acúmulo de massa seca, produz lesões, cloroses e amolecimento das folhas (ARNDT *et al.*, 1995). Plantas de arroz expostas a altas concentrações de flúor na atmosfera não produzem grãos, sendo conhecidos ainda, aumentos nas atividades das peroxidases e nos níveis de fenóis (SUN & SU 1985; FIGUEIREDO *et al.*, 1997). Além das injúrias visíveis, o flúor causa alterações bioquímicas e fisiológicas importantes. Os cloroplastos, seguidos das mitocôndrias, são os principais sítios de acumulação do fluoreto. Conforme o flúor se acumula nos cloroplastos, uma série de enzimas como a ATP sintase, a rubisco e a sacarose sintase, têm suas atividades reduzidas, o conteúdo das clorofilas é diminuído, ocorrendo um aumento na resistência estomática. Este conjunto de fatores reduz sensivelmente a fotossíntese das

plantas expostas (KELLER, 1974; MILLER & MILLER 1974; BUSTAMANTE, 1993; BOESE *et al.*, 1995; WEINSTEIN, 1997; DIVAN, 2002).

A quantidade de radiação fotossinteticamente ativa convertida em energia química é limitada em qualquer planta. Ela depende de fatores intrínsecos e extrínsecos as plantas, como taxa de transporte de elétrons, fotoproteção, número de moléculas de clorofila disponíveis nos tilacóides, eficiência da rubisco e também, de várias condições do ambiente, incluindo algum tipo de estresse, natural, como a luz ou a água ou antropogênico, como metais pesados, flúor e salinidade. (ALVES *et al.*, 1990; ATAL, 1991; BAKER, 1994; HUNER *et al.*, 1998; ROGER & WEISS, 2001). Conhecendo a importância do processo fotossintético, saber onde e quais os processos afetados por agentes causadores de estresse, podem fornecer dados importantes sobre o impacto desses agentes sobre o metabolismo da planta.

Quando excitadas, as clorofilas nos fotossistemas podem realizar trabalho fotoquímico, este processo pode induzir o aquecimento e emissão de fluorescência, sendo esse um processo complexo de dissipação de energia (KRAUSE & WEISS 1991; STRASSER *et al.*, 2000). Uma das resultantes desse processo é a emissão de fluorescência da clorofila *a*, que pode ser usada como indicador da intensidade do estresse (BALL *et al.*, 1994; ROGER & WEISS, 2001). Um fator estressante pode afetar as plantas, causando a fotoinibição, que pode se manifestar por alterações nas características da fluorescência, redução do rendimento quântico do FOTOSSISTEMA II (FSII) e do transporte de elétrons e, conseqüentemente, assimilação do CO₂. (AMESZ, 1995; CHAUMONT *et al.*, 1995; HUNER *et al.*, 1998; VERHOEVEN *et al.*, 1998; NIYOGI, 1999; GUIDI *et al.*, 2000). Dados obtidos pela técnica de determinação da fluorescência sugerem que o principal alvo do dano fotoquímico é o fotossistema II (PSII). O decréscimo na razão fluorescência variável/ fluorescência máxima (F_v/F_m) é geralmente atribuído à inibição do centro de reação do PSII ou à redução da capacidade de transportar elétrons entre os fotossistemas. Isso protege o aparelho fotossintético dos possíveis danos, que possam ocorrer naturalmente, ou que sejam induzidos por poluentes (KRAUSE & WEISS, 1991; KOLBER, *et al.*, 1998; RALPH & BURCHETT, 1998).

Os estresses, suas inter-relações com as plantas e com o meio ambiente, podem, em várias situações, serem avaliados por meio da medição da fluorescência da clorofila *a*. Em plantas saudáveis e não estressadas, a relação F_v/F_m (rendimento quântico potencial do fotossistema II) tem um valor aproximadamente de 0,83. Todavia, quando as plantas se

encontram sob condições adversas de meio-ambiente, essa relação decresce progressivamente. O declínio no rendimento quântico da fotossíntese em folhas fotoinibidas é avaliado por um correspondente decréscimo na relação F_v/F_m (KRAUSE & WEISS, 1991; FOYER, 1996; JONES, 1998).

Outros parâmetros fisiológicos, como, por exemplo, a dissipação fotoquímica (q_p), tem sido usada como um indicador da redução de capacidade operacional do PSI/PSII em converter radiação fotossinteticamente ativa em NADPH/ATP (KRAUSE & WEISS, 1991). A dissipação não-fotoquímica (q_n) indica a ação de processos fotoprotetivos (dissipação de calor), sendo seu incremento, traduzido como um sinal de proteção do aparelho fotossintético, contra os efeitos causados pelo excesso de energia luminosa ou por efeitos secundários como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), quando as plantas são expostas a certos agentes estressores (BOWLER *et al.*, 1992; ARO *et al.*, 1994; KRAUSE, 1994; KRAUSE, 1998).

Existe hoje, grande demanda por metodologias não-invasivas e não-destrutivas para se avaliar impactos ambientais. As plantas vêm sendo cada vez mais usadas como bioindicadores passivos e ativos, uma vez que, em geral são muito sensíveis às modificações que ocorrem no meio e, de maneira geral, alterando parte de seu metabolismo. Cada vez mais parâmetros fisiológicos não-invasivos (fluorescência da clorofila *a*, a taxa relativa de transporte de elétrons, a assimilação de carbono e a condutância estomática) e invasivos (a quantificação da atividade de enzimas envolvidas nos processos de estresse e os teores de clorofila) têm sido utilizado para demonstrar a ação de fatores estressantes em organismos vegetais isolados ou em seu habitat (KELLER, 1974; ALVES *et al.*, 1990; HENDRY, 1993; MARKERT, 1993; BALL *et al.*, 1994; JONES, 1998; KRUPA & MONIAK 1998; MAZHOUDI *et al.*, 1997; RALPH & BURCHETT, 1998; GUIDI *et al.*, 2000; CHO & PARK 2000; MENDELSSOHN, 2001; DIVAN, 2002).

A fluorescência da clorofila *a* e medidas de fixação de carbono, tem sido utilizado em conjunto para explicar a reação das plantas aos fatores causadores de estresse, bem como as possíveis defesas desenvolvidas a fim de minimizar esse estresse (BOWLER *et al.*, 1992; KRUPA & MONIAK 1998).

2. BIBLIOGRAFIA GERAL

- ALVES, P.L. C.A.; OLIVA, M. A.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R. Efeitos da chuva ácida simulada e de um solo de Cubatão (SP) sobre os parâmetros relacionados com a fotossíntese e a transpiração de plantas de soja. *Revista Brasileira Fisiologia de Vegetal*, v.2, p.7-14, 1990.
- AMESZ, J. Developments in classical optical spectroscopy. In: Amesz, J.; Hoff, S. J. (Eds), Series: Advances in photosynthesis (Series Editor: Govindjee) *Biophysical techniques in photosynthesis*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995, 258 pp.
- ARNDT, U.; FLORES, F.; WEINSTEIN, L. Efeitos do flúor sobre as plantas: Diagnose de danos na vegetação do Brasil. Porto Alegre: UFRGS, 1995, 155 pp.
- ARO, E. M.; MCCAFFERY, S.; ANDERSSON, J. M. Recovery from photoinhibition in peas acclimated to varying growth irradiances: role of D1 protein-turnover. *Plant Physiology*, v. 104, p.1033-1041, 1994.
- ATAL, N.; SARADHI, P.; MOHANTY, P. Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedlings with low concentrations of cadmium: Analysis of electron transport actives and changes in fluorescence yield. *Plant Cell Physiology*, v.32, p.943-951, 1991.
- BAKER N. R. Chilling stress and photosynthesis. In: Foyer, C.H; Mullineaux, P.M. (Eds), *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994, p.127-154.
- BALL, M.C.; BUTTERWORTH J.A.; RODEN, J.S.; CHRISTIAN, R.; EGERTON, J.J.G. Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.22, p.311-319, 1994.
- BOESE, S. R.; MACLEAN, D. C.; EL-MOGAZI, D. Effects of fluoride on chlorophyll fluorescence in spinach. *Environmental Pollution*, v.89, p.203-208, 1995.
- BOWLER, C. M.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.43, p. 83-116, 1992.

- BUSTAMANTE, M.; OLIVA, M. A.; SANT'ANNA, R.; LOPES, N. F. Sensibilidade da soja ao flúor. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.5, p.151-157, 1993.
- CHAUMONT, M.; MOROT-GAUDRY, J. F.; FOYER, C. H. Effects of photoinhibitory treatment on CO₂ assimilation, quantum yield of CO₂ assimilation, D1, protein, ascorbate glutathione and xanthophylls contents and the electron transport rate in vine leaves. *Plant, Cell and Environment*, v.18, p.1358-1366, 1995.
- CHO, U.; PARK, J.O. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science*, v.156, p.1-9, 2000.
- CUARTERO, J; FERNANDEZ-MUNOZ, R. Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae*, v.78, p.83-125, 1999.
- DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution*, v.98, p.29-36, 1997.
- DIVAN, A. M. Jr. Impactos das emissões de flúor em Ouro Preto, MG, avaliados mediante bioindicadores vegetais ativos e passivos. Viçosa: UFV, 2002, 80p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- FIGUEIREDO, J. G.; OLIVA, M.A.C.; SOUZA, M.M. Bioindicação do flúor mediante gramíneas tropicais. In: Martos, H.L.; Maia, N. B.(Eds) *Indicadores ambientais*. Sorocaba, 1997, 191 pp.
- FOYER, C.H. Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. In: Scandalios, J. (Eds) *Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, p. 587-621.
- GUIDI, L.; TONINI, M.; SOLDATINI, M. F. Effects of high light and ozone fumigation on photosynthesis in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.38, p. 717-725, 2000.
- HENDRY, G.A.F.; THORPE, P.C.; MERZLYAK, M.N. Stress indicators-lipid peroxidation. In: Hendry, G.A.F.; Grime, J.P. (Eds), *Methods in comparative plant ecology*. London: Chapman and Hall, 1993, pp.154-156.
- HERNÁNDEZ, J.A.; ALMANSA, M.S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum*, v.115, p.251-257, 2002.
- HUNER, N.P.A.; ÖQUIST G.; SARHAN, F. Energy balance and acclimatation to light and cold. *Trends in Plant Science*, v.3, p.224-230, 1998.

- JONES, H. G. Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *Journal of Experimental Botany*, v.4, p. 387-398, 1998.
- KELLER, T. The use of peroxidase activity for monitoring and mapping air pollution areas. *European Journal of Forest Pathology*, v.4, p. 11-19, 1974.
- KOLBER, S. Z.; PRÁŠIL, O.; FALKOWSKI, P. G. Measurement's variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1367, p.88-106, 1998.
- KRAUSE, G. H.; WEISS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.42, p.313-349, 1991.
- KRAUSE, G. H. The role of oxygen in photoinhibition of photosynthesis. In: Foyer, C.H; Mullineaux, P.M. (Eds), *Causes of photooxidative stress and amelioration of defenses systems in plants*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994, p. 43-76.
- KRAUSE, G. H. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiologia Plantarum*, v.7, p.566-574, 1998.
- KRUPA, Z.; MONIAK, M. The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity. *Plant Science*, v.138, p.149-156, 1998.
- LEE, K.C.; CUNNINGHAM, B.A.; PAULSEN, G.M.; LIANG, G.H.; MOORE, R.B. Effects of cadmium on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings. *Physiologia Plantarum*, v.36, p. 4-6, 1976.
- MARKERT, B. Plants as Biomonitors: indicators for heavy metals in the terrestrial environment. Weinheim: Verlagsgesellschaft VCH, 1993, 1100pp.
- MAZHOUDI, S.; CHAOUI, A. GHORBAL; M. H., EL-FERJANI, E. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Science*, v.127, p.129-137, 1997.
- MENDELSSOHN, I.A.; MCKEE, K.L.; KONG, T. A comparison of physiological indicators of sub lethal cadmium stress in wetland plants. *Environmental and Experimental Botany*, v.46, p.263-275, 2001.
- MILLER, J. E.; MILLER, G. W. Effects of fluoride on mitochondrial activity in higher plants. *Physiologia Plantarum*, v.32, p.115-121, 1974.
- NASCIMENTO, C.W.A.; PEREIRA, J.B.M. Absorção e distribuição de cádmio e micronutrientes em cultivares de feijoeiro expostas a doses de cádmio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.32, p.1303-1308, 1997.

- NIYOGI, K.K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.50, p. 333–359, 1999.
- OLIVEIRA, J.A.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M.A.; JORDÃO, C.P. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e salvinia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.13, p.329-341, 2001.
- PAGE, A. L.; BINGHAM, F.T. Cadmium residues in the environment. *Residue Reviews*, v.48, p.1-44, 1973.
- PRASAD, M. N.V. Plant ecophysiology. New York: John Willey & Sons, 1997, 542pp.
- RAJGURU, S.N.; BANKS, S.W.; GOSSETT, D.R.; CRAN LUCAS, M.; FOWLER, T.E.; MILLHOLLON, E.P. Antioxidant response to salt stress during fiber development in cotton ovules. *Journal of Cotton Science*, v.3, p.11-18, 1999.
- RALPH, P. J.; BURCHETT, M. D. Impact of petrochemical on the photosynthesis of *Halophila ovalis* using chlorophyll fluorescence. *Marine Pollution Bulletin*, v.36, p. 429-436, 1998.
- ROGER, M. J. R.; WEISS, O. Fluorescence techniques. In: Roger, M. J. R. (Ed), *Handbook of plant ecophysiology techniques*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001, p.155-171.
- SHEORAN, I.S.; AGGAARWAL, N.; SINGH, R. Effects of cadmium and nickel on “*in vivo*” carbon dioxide exchange rate of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Plant and Soil*, v.129, p.243-249, 1990.
- STRASSER R. J.; SRIVASTAVA A.; TSIMILLI-MICHAEL M. The fluorescent transient as a tool estrous characterizes and screens photosynthetic samples. In: Yunus, M.; Pathre, U.; Mohanty, P. (Eds), *Probing photosynthesis mechanisms, regulation and adaptation*. London- New York: Taylor and Francis, 2000.
- SUN, E.J.; SU, H.J. Fluoride injury to rice plants caused by air pollution emitted from ceramic and brick factories. *Environmental Pollution*, v.37, p.335-342, 1985.
- TUKENDORF, A.; SKÓRZYNSKA-POLIT, E.; BASZYNSKI, T. Homophytochelatin accumulations in Cd treated runner bean plants is related to their growth stage. *Plant Science*, v.129, p.21-28, 1997.
- VERHOEVEN, A. S.; ADAMS III, W. W.; DEMMING-ADAMS. Two forms of sustained xanthophylls cycle-dependent energy dissipation in overwintering *Euonymus kiautschovicus*. *Plant Cell and Environment*, v.21, p.893-903, 1998.
- WEIGEL, H. J. The effect of Cd⁺² on photosynthetic reactions of mesophyll protoplasts.

Physiologia Plantarum, v.63, p.192-200, 1985.

WEINSTEIN, L. H. Fluoride and plant life. *Journal of Occupational Medicine*, v.1, p. 49-78, 1997.

ZHU, J.K. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, v.6, p.66-71, 2001.

3. SÍMBOLOS, NOMENCLATURAS, ABREVIACÕES E UNIDADES USADAS

<i>A</i>	Taxa fotossintética	$\mu\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}$
<i>C_i/C_a</i>	Relação carbono interno externo	
<i>E</i>	Taxa transpiratória	$\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
ETR	Taxa relativa de transporte de elétrons	
<i>F_v/F_m</i>	Relação fluorescência variável/ máxima	
<i>F_v</i>	Fluorescência variável	
<i>F_m</i>	Fluorescência máxima	
<i>g_s</i>	Condutância estomática	$\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
IRGA	Analisador de gás no infravermelho	
<i>q_P</i>	Dissipação fotoquímica	
<i>q_N</i>	Dissipação não fotoquímica	
POXs	Peroxidases	
SODs	Dismutases do superóxido	
MDA-TBA	Complexo Malonaldeído-Ácido Tiobarbitúrico	
ψ_s	Potencial osmótico	MPa

Capítulo 1

METODOLOGIAS NÃO-INVASIVAS E BIOQUÍMICAS USADAS NA DETECÇÃO DOS EFEITOS FISIOLÓGICOS CAUSADOS POR SALINIDADE EM TOMATEIRO

RESUMO

SOUZA, Carlos Lúcio de Lacerda Vasconcelos, M.S, Universidade Federal de Viçosa, março 2003. **Metodologias não-invasivas e bioquímicas usadas na detecção dos efeitos fisiológicos causados por salinidade em tomateiro.** Orientador: Marco Antonio Oliva Cano. Conselheiros: Carlos Alberto Martinez y Huaman e José Cambraia.

Plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) com sete dias de idade e cultivadas em solução nutritiva de Hoagland, foram expostas às concentrações de $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$ de 0, 50, 100 e 150 mol m^{-3} , com a finalidade de avaliar os danos fisiológicos da salinidade por meio metodologias não-invasivas e da atividade de certas enzimas ligadas a um possível estresse oxidativo, causado pelo estresse primário. Após vinte e um dias de exposição ao estresse salino, foram determinados, os potenciais osmóticos das folhas e raízes, os teores de clorofila, a assimilação de carbono, a condutância estomática, a transpiração, a relação Ci/Ca , os parâmetros de fluorescência rápida e lenta, as atividades das enzimas SODs e POXs e a peroxidação de lipídeos. Os potenciais osmóticos das folhas e raízes foram reduzidos, os teores de clorofilas *a*, *b* total e carotenóides reduzidos, a relação clorofila *a/b* não foi alterada. A assimilação de carbono, relação carbono interno externo, condutância estomática, transpiração, foram reduzidas. A relação F_v/F_m e o q_N não sofreram alterações significativas, a taxa relativa de transporte de elétrons e o q_P foram reduzidos significativamente. As atividades das SODs e das POXs foram aumentadas pelo estresse, foi também observado um aumento na peroxidação de lipídeos pelo incremento na quantidade de malonaldeído formado. O processo fotossintético foi afetado severamente, tanto em sua constituição, demonstrada pelos teores das clorofilas, quanto na sua capacidade em assimilar carbono. A atividade antioxidante e protetora das SODs e POXs não foram suficientes para a manutenção dos níveis de assimilação de carbono, nas maiores concentrações de $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$. O IRGA, fluorômetro modulado e medidor SPAD, foram capazes de demonstrar as alterações no metabolismo das plantas e sugerir suas causas. As alterações no metabolismo captadas pelo método não invasivo foram evidenciadas pelas atividades enzimáticas medidas e pela peroxidação de lipídeos.

ABSTRACT

SOUZA, Carlos Lúcio de Lacerda Vasconcelos, M.S, Universidade Federal de Viçosa, march 2003. **Non invasive and biochemistries methodologies used the detect of the physiological effects due by salinity in tomato plants.** Advisor: Marco Antonio Oliva Cano. Committee members: Carlos Alberto Martinez y Huaman e José Cambraia.

Seven days old tomato seedlings (*Lycopersicum esculentum* Mill) were grown in Hoagland solution supplied with 0, 50, 100 or 150 mol m⁻³ Na⁺ Cl⁻. The afterwards physiological damages due to the salinity were evaluated through non invasive methods and activity of enzymes involved on oxidative stress pathway, 21 days after the treatments the plants were screened for osmotic potential of leaves and roots, chlorophylls content, carbon assimilation, stomatal conductance, transpiration, Ci/Ca ratio, fluorescence traits, SODs and POXs activity and lipids peroxidation. The osmotic potential of leaves and roots decreased as well as the contents of chlorophylls *a*, *b*, total and carotenoids while the chlorophyll *a/b* ratio did not alter. Carbon assimilation, Ci/Ca ratio, transpiration and stomatal conductance were significantly reduced. The F_v/F_m ratio and q_N did not suffer any significant change but the electron transport and q_P were significantly reduced. POXs and SODs showed high activity and the malaldehyd content increased due to lipids peroxidation. The photosynthesis process was highly affected either by reduction on chlorophyll content or by carbon assimilation capacity. Under the higher Na⁺ Cl⁻ concentrations the antioxidant capacity of SODs and POXs were unable to maintain adequate carbon assimilation. The non invasive procedure performed with IRGA, fluorometer and SPAD reader was able to point out metabolic changes and suggest its causes. The value of this non invasive methodology was supported by the results obtained with enzymatic activity and lipids peroxidation.

1.1 INTRODUÇÃO

A salinidade dos solos é um problema antigo da agricultura agravada pelo emprego de práticas agrícolas inadequadas, dentre as quais a irrigação. Hoje cerca de 20% das áreas irrigadas no mundo apresentam problemas devido à elevada salinidade dos solos (ZHU, 2001).

Altas concentrações de sal afetam a homeostase das plantas, causando mudanças no equilíbrio hídrico e iônico, danos moleculares, celulares, alterações no crescimento e, até mesmo, morte das plantas (MARSCHNER, 1995; ZHU, 2001, HERNÁNDEZ & ALMANSA, 2002). Elevadas concentrações de Na^+ na solução do solo alteram a disponibilidade de K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , absorção destes íons, o desbalanço nutricional, toxidez pelos íons Na^+ e Cl^- e estresse hídrico (KRAMER & BOYER, 1995). O estresse salino, interfere ainda na integridade estrutural e funcional das membranas celulares por meio de alterações na composição de lipídeos, e na atividade das enzimas como as lipoxigenases e H^+ -ATPase (RODRIGUEZ-ROSALES *et al.*, 1999). A absorção de água pelas raízes é dificultada pelo baixo potencial hídrico da solução do solo, ocasionando redução no potencial de turgescência das células e, conseqüentemente, redução do crescimento das plantas (CUARTERO & FERNANDEZ-MUNOZ, 1999).

A fotossíntese também é afetada pelo estresse salino, que causa desbalanço nutricional, redução na turgescência das folhas e conseqüentemente o fechamento estomático, com aumento na resistência a difusão do CO_2 (BRUGNOLI & LAUTIERI, 1991). É comum ocorrer inibição não estomática da fotossíntese, pela diminuição da atividade de algumas enzimas e queda na concentração de pigmentos fotossintéticos e na quantidade de fotossistemas ativos (CHANDRASHEKAR & SANDHYARANI, 1996; ROSSI *et al.*, 1997; MELONI *et al.*, 2003). A combinação do estresse hídrico e iônico favorece, adicionalmente, a formação de espécies reativas de oxigênio que podem alterar os centros de reação do fotossistema II pela degradação de clorofilas e carotenóides.

As alterações causadas nas plantas pelo estresse salino dependem diretamente da concentração dos íons Na^+ e Cl^- no meio de cultivo das plantas (MELONI *et al.*, 2003). Entretanto as plantas podem não apresentar sintomas visuais, tais como cloroses e necroses. Isto pode acontecer porque as plantas possuem certa capacidade de manter a homeostase, por simples regulação de processos fisiológicos e bioquímicos, como

ajustamento osmótico e regulação estomática, ou por possuírem genes, que uma vez ativados, codificam transportadores seletivos de Na⁺ e proteínas de estresse como por exemplo a RD29A, que possibilitam a planta voltar ao seu equilíbrio dinâmico (ZHU, 2001).

Plantas em crescimento são particularmente susceptíveis a agentes estressores, sofrendo alterações no seu metabolismo que se manifestam antes que sintomas visíveis sejam notados (KOZLOWSKI, 1980). O reconhecimento preventivo dos danos, visíveis e/ou latentes, é vantajoso, especialmente quando eles são irreversíveis. As desordens fisiológicas latentes são complexas e para serem corretamente mensuradas necessitam de procedimentos de difícil execução, caros, muitas vezes destrutivos e cujos resultados demoram a serem obtidos. Certas espécies de plantas e a utilização de algumas metodologias simples, rápidas, baratas e não-invasivas permitem, muitas vezes a avaliação de efeitos de agentes estressores, o que pode ser utilizado como indicador de futuras alterações nas práticas de manejo ou mesmo sugerindo o emprego de outras metodologias de estudo (LOUZADA *et al.*, 2000).

Este estudo pretende avaliar algumas das principais alterações fisiológicas precoces em tomateiro submetido diversos níveis de salinidade mediante o emprego de metodologias não-invasivas, tais como o uso de IRGAS, fluorômetros e medidor de clorofila SPAD. Avaliações das atividades de algumas enzimas ligadas ao estresse oxidativo, acompanharam este estudo de para a se avaliar a extensão possíveis danos decorrentes do estresse salino.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Material vegetal e variáveis medidas

O ensaio foi realizado em casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa, localizada a 20° 45' S e 42° 51' W, no estado de Minas Gerais, Brasil, durante os meses de setembro e outubro de 2002.

Sementes de tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill (cv. Santa Clara 5600 VF, da empresa Agroflora/Sakata), foram colocadas para germinar em bandejas com areia lavada e esterilizada, em câmara de germinação do tipo BOD, com condições ambientais controladas, por cerca de sete dias. Nesse período, as plântulas foram submetidas a 16 horas de luz ($250 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 8 horas de escuro e sob temperatura média de 30°C.

Quando as plântulas alcançaram, aproximadamente, 10 cm de altura e duas folhas expandidas, foram transferidas para recipientes de isopor, recobertos com sacos de polietileno, contendo 7,0 litros de solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON, 1950), com metade da força iônica. A solução nutritiva foi arejada constantemente e o pH foi corrigido diariamente, para $6,5 \pm 0,1$ pela adição de hidróxido de potássio ou ácido sulfúrico. Após três dias, as plântulas foram transferidas para uma solução nutritiva de mesma composição mas com força iônica total. A partir 7º dia de cultivo, o cloreto de sódio passou a ser adicionado em incrementos de 50 mol m^{-3} a cada 24 horas, até atingir as concentrações de 0, 50, 100 e 150 mol m^{-3} . No 21º dia após o início da aplicação do estresse o experimento foi encerrado, sendo neste dia medidos os parâmetros fotossintéticos e de fluorescência, coletadas amostras de folhas para determinação de clorofila e o resto material congelado para a determinação posterior das atividades enzimáticas e do potencial osmótico de folhas e raízes.

A taxa fotossintética líquida (A), a condutância estomática (g_s), a transpiração (E) e a concentração interna de CO_2 (C_i) foram medidas nas duas primeiras folhas totalmente expandidas, de todas as plantas, com um analisador de gases no infravermelho (LCI 6400, LI-Cor Inc, Lincoln, Nebraska, USA). As medições foram realizadas entre às 8:00 e 11:30h da manhã, sob uma intensidade luminosa de $1000 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 25°C.

Nas mesmas folhas foram medidas, a relação F_v/F_m , a dissipação fotoquímica (q_p), a dissipação não-fotoquímica (q_N) e taxa de transporte de elétrons (ETR) utilizando-se um analisador de rendimento fotossintético Walz (Mini PAM, Heinz Walz, Effeltrich, GmbH).

Os teores de clorofila total foram determinados, *in vivo* mediante o uso de um aparelho portátil SPAD (SPAD-502 Minolta Chlorophyll Meter, Minolta, Japão) e espectrofotometricamente, *in vitro*, pelo método de ARNON (1949). Neste caso, foram obtidos extratos cetônicos, nos quais foram determinados os teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides.

1.2.2 Determinação do potencial osmótico

Amostras de folhas e raízes das plantas de tomateiro foram lavadas com água desmineralizada e enxugadas com toalhas de papel, acondicionadas em sacos plásticos e congeladas. O material descongelado foi prensado e o suco obtido, centrifugado a 3.000xg por 15 min. O potencial osmótico (ψ_s) foi determinado no sobrenadante, mediante a utilização de um microsmômetro (Precision Osmete, Precision Systems Inc., Natick, MA, USA).

1.2.3 Determinação da atividade enzimática

1.2.3.1 Obtenção do extrato enzimático

Trezentas miligramas de tecidos foliares congelados foram triturados na presença de nitrogênio líquido e, então, homogeneizados com 10 mL de uma solução extratora constituída de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,8. O homogeneizado foi filtrado através de 8 camadas de gaze e centrifugado a 13.000 xg por 15 min. O sobrenadante obtido foi utilizado nos ensaios enzimáticos. Todas as operações, utensílios e reagentes foram mantidos em temperatura entre 0 a 4 °C.

A dosagem de proteínas, no extrato enzimático bruto foi feita pelo método de BRADFORD (1976).

1.2.3.2 Peroxidases (POX,s 1.11.1.7)

A atividade das peroxidases foi determinada segundo o método proposto por KAR & MISHRA (1976), que consiste adição de uma alíquota de 100 µL de extrato enzimático bruto a um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20mM. A absorvância a 420 nm foi monitorada durante dois minutos e atividade das peroxidases calculada pela inclinação da reta e expressa em µmoles de purpurugalina formada por minuto por mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ (CHANCE & MAEHLEY, 1954).

Um branco foi conduzido paralelamente utilizando-se meio de reação e uma alíquota de 100 µL do meio de extração.

1.2.4.2 Dismutases do superóxido (SODs, EC 1.15.1)

A atividade das superóxidos dismutases foi determinada adicionando-se 50 µL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de um meio de reação, constituído de metionina 13 mM, azul de *p*-nitrotetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 100 nM e riboflavina 2 µM, em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8. A reação, iniciada colocando-se os tubos em uma caixa com tampa perfurada e revestida por um filme do alumínio, dotada de uma lâmpada fluorescente de 25 W, foi paralisada após 15 minutos com o desligamento da lâmpada (GIANNOPOLITIS & RIES, 1977). A formazana azul resultante da fotorredução do NBT foi medida pelo incremento da absorvância a 560 nm. Um branco foi obtido mantendo-se o meio de reação no escuro. Uma unidade das SODs foi definida como a quantidade de enzimas necessária para inibir 50% a fotorredução do NBT (BEUACHAMP & FRIDOVICH, 1971).

1.2.5 Determinação do complexo MDA-TBA

A determinação da quantidade de malonaldeído (MDA) formado foi realizada segundo o método proposto por DHINDSA *et al.*, (1981).

Trezentas miligramas de tecidos foliares foram trituradas na presença de nitrogênio líquido, então se adicionou 5 mL de ácido tricloroacético a 0,1%. O homogeneizado foi filtrado através 8 camadas de gaze e centrifugado a 10.000 xg por 5 min. Uma alíquota de 1

mL do sobrenadante foi adicionada a 4 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% em ácido tricloroacético 20% e a mistura colocada em banho-maria a 90° C por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram retirados, imersos em banho de gelo e centrifugados a 10.000 xg por 10 min e as absorbâncias dos sobrenadantes lidas a 532 nm e a 600nm (absorbância não-específica). A quantidade do complexo MDA-TBA formado, foi calculada utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (HEATH & PACKER, 1968).

1.2.5 Análise estatística

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado: um cultivar de tomateiro e quatro concentrações de Na⁺ Cl⁻ de 0, 50, 100 e 150 mol m⁻³ com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância com um $\alpha= 5\%$ e quando os valores de F foram significativos, uma comparação de médias foi realizada, utilizando-se para isso o teste de Tukey, com 5% de probabilidade.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial osmótico (ψ_s) nas raízes foi alterado pelas concentrações de $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$ presentes na solução nutritiva (Quadro 1.1). O valor do ψ_s das raízes do controle, foi 2,3 vezes maior que o do maior tratamento, sendo que nos tratamentos de 100 e 150 mol m^{-3} os valores de ψ_s , não diferiram significativamente. Nas folhas, o aumento na concentração de $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$ na solução nutritiva resultou em uma redução do ψ_s , de aproximadamente 3,5 vezes. A modificação do ψ_s das folhas sugere um ajustamento osmótico da parte aérea da planta. Este incremento, contudo, não foi suficiente para manter uma taxa fotossintética alta.

O ψ_s das folhas e das raízes foram similares aos obtidos por ALLIAN *et al.*, (2000), que testou quatro diferentes genótipos comerciais de tomateiro. Ressalta-se que, neste caso observou-se uma grande variação observada entre estes genótipos. A elevação significativa dos ψ_s das folhas e raízes indica que os íons Na^+ e Cl^- presente na solução nutritiva, penetraram e provocaram alterações significativas no status hídrico da planta.

Quadro 1.1 - Potencial osmótico (ψ_s) em MPa em raízes e folhas de plantas de tomateiro, cultivadas em diferentes concentrações de $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$

NaCl (mol m^{-3})	Raiz	Folhas
0	$-0,33 \pm 0,01$ a ¹	$-0,68 \pm 0,02$ a ¹
50	$-0,53 \pm 0,01$ b	$-1,09 \pm 0,01$ b
100	$-0,64 \pm 0,06$ c	$-1,74 \pm 0,11$ c
150	$-0,70 \pm 0,03$ c	$-2,27 \pm 0,03$ d

¹ Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey, para $P < 0,05$

Os teores das clorofilas *a*, *b* e carotenóides diminuíram significativamente na presença dos íons Na^+ e Cl^- na solução de cultivo (Quadro 1.2), reduções estas que se intensificaram com o aumento das concentrações. A relação clorofila *a/b*, entretanto, não foi modificada pelo aumento na concentração dos íons Na^+ e Cl^- , indicando que o efeito salino foi aproximadamente igual sobre as duas formas de clorofilas.

Quadro 1.2 - Teores de clorofilas e carotenóides em extrato cetônico presentes em folhas de plantas de tomateiro, cultivadas sob diferentes concentrações de Na⁺Cl⁻

NaCl (mol m ⁻³)	Clorofila <i>a</i> (μg g ⁻¹ MF)	Clorofila <i>b</i> (μg g ⁻¹ MF)	Carotenóides (μg g ⁻¹ MF)	Clorofila <i>a/b</i>
0	1,44 ± 0,03 a ¹	0,61 ± 0,01 a	191,22 ± 5,64 a	2,37 ± 0,02 a
50	0,83 ± 0,03 b	0,36 ± 0,02 b	105,56 ± 1,43 b	2,34 ± 0,04 a
100	0,54 ± 0,06 c	0,21 ± 0,02 c	95,38 ± 5,22 c	2,54 ± 0,02 a
150	0,32 ± 0,03 d	0,13 ± 0,01 d	70,06 ± 7,02 d	2,55 ± 0,03 a

¹ Médias seguidas da mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey para P<0,05

Já o teor clorofila total, avaliados pela extração cetônica e pelo medidor SPAD sofreram reduções significativas. Com o aumento das concentrações de Na⁺ e Cl⁻ na solução de cultivo os teores de clorofilas totais avaliados por meio do uso do extrato cetônico, foram reduzidos quando comparados ao controle em, 1,72, 2,73 e 4,55 vezes respectivamente. Utilizando-se o medidor SPAD, as reduções observadas foram de 1,18, 1,37 e 1,76 vezes, quando os tratamentos de 50, 100 e 150 mol m⁻³ Na⁺ Cl⁻, foram comparados ao controle (Quadro 1.3). Estas reduções demonstram os efeitos do estresse salino aplicado sobre os pigmentos avaliados.

Quadro 1.3 - Teores de clorofilas total em extratos cetônicos e em folhas intactas e pelo medidor de clorofilas SPAD, em plantas de tomateiro, cultivadas em diferentes concentrações de Na⁺ Cl⁻

NaCl (mol m ⁻³)	Clorofila Total (μg g ⁻¹ MF)	Clorofila Total (unidades SPAD)
0	2,05 ± 0,04 ¹ a	44 ± 1,65 a
50	1,19 ± 0,05 b	37 ± 0,82 b
100	0,75 ± 0,08 c	32 ± 1,51 c
150	0,45 ± 0,04 d	25 ± 1,93 d

¹ Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey para P<0,05

A análise de regressão entre os valores obtidos pelo uso da extração cetônica e o medidor SPAD (Figura 1.1), indica uma forte correlação entre os grupos de dados, mostrando que os dois métodos apresentaram a mesma variação e sensibilidade em discriminar os diversos. Neste ensaio, o teor de clorofila total avaliados pelo emprego do medidor SPAD (Quadro 1.3 e Figura 1.1), apresentou a mesma tendência daquela indicada pela extração cetônica, o que sugere, que este equipamento seja uma forma razoavelmente segura, rápida e não invasiva, para se avaliar o teor de clorofila total em plantas estressadas.

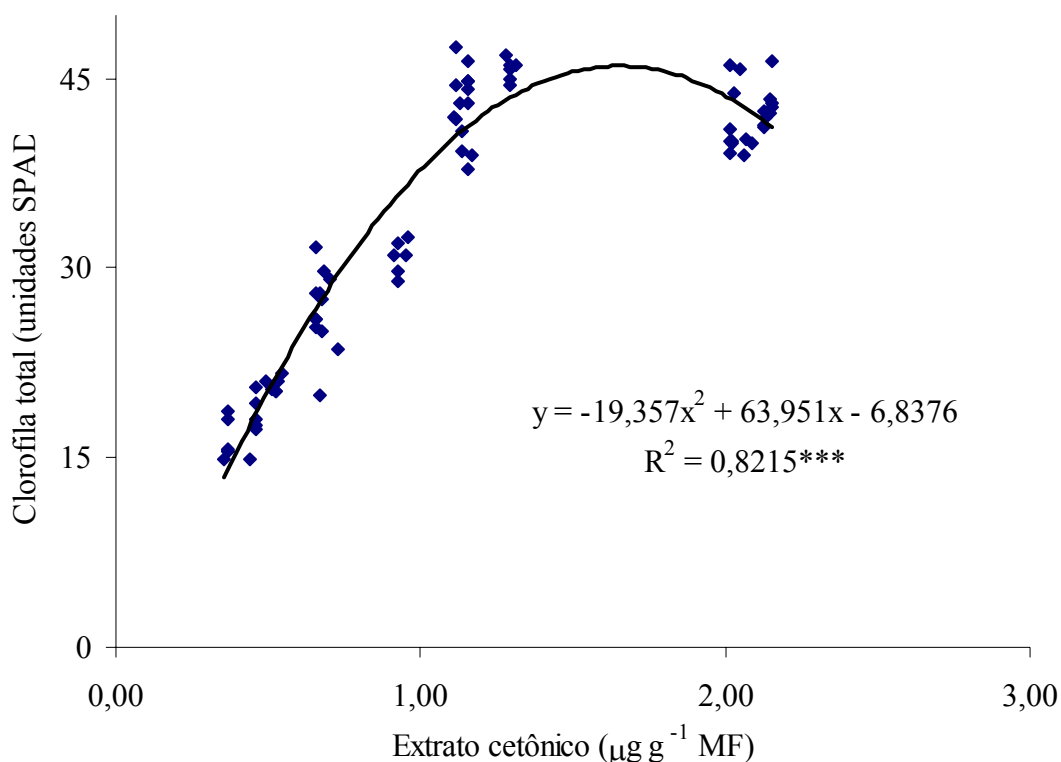


Figura 1.1. Gráfico da análise de regressão entre os valores de clorofila total obtidos pelo medidor SPAD e extrato cetônico. ***Nível de significância $P > 0,001$.

Diversos autores mostram que a salinidade pode causar alterações nos teores de pigmentos cloroplastídicos (MISRA *et al.*, 1997; MELONI *et al.*, 2003) e que parece existir uma relação entre os teores desses pigmentos em tomateiro exposto a agentes estressores, a fotossíntese e o transporte de elétrons (BASZYNKI *et al.*, 1980). Os íons Na^+ e Cl^- em concentrações elevadas aumentam a degradação das clorofilas pela ativação das clorofilases

ou pela diminuição da sua síntese, resultante do deslocamento nitrogênio para outros compostos como a síntese de prolina (RAO & RAO, 1981; IBARRA & MAITI, 1995).

A taxa fotossintética (A) decresceu significativamente com o tratamento salino (Figura 1.2 A). A intensidade de redução cresceu com o aumento da concentração de Na^+ e Cl^- atingindo na concentração de 150 mol m^{-3} , um valor igual à cerca de 3,8 vezes quando comparada ao controle. Esta resposta fisiológica tem sido descrita como sendo umas das muitas perturbações causadas pelo estresse salino em plantas (NIU *et al.*, 1995).

O estresse salino causou ainda reduções significativas na condutância estomática (g_s) (Figura 1.2 D), na transpiração (E) (Figura 1.2B) e na relação da concentração de CO_2 interno e externo (C_i/C_a) (Figura 1.1C). A queda na assimilação de carbono pode ser portanto atribuída em parte a uma inibição estomática.

Sob condições de alta salinidade é demonstrada uma relação direta entre a variação da relação C_i/C_a , em razão do fechamento estomático e o decréscimo na assimilação de CO_2 . MELONI, *et al.*, (2003), mostra essa redução causada pela salinidade em duas cultivares de *Gossypium hirsutum*, uma resistente e outra suscetível. O incremento na C_i/C_a observado na concentração de 150 mol m^{-3} , provavelmente é resultado de um aumento da taxa respiratória conforme sugere BOECHERT, (1978).

Redução semelhante na condutância estomática (g_s), foi observada por PERERA *et al.*, (1994), que trabalhando com epidermes destacadas de *Aster tripolium* demonstraram fechamento estomático em diversas concentrações de Na^+ e Cl^- . Estes autores acreditam que o Na^+ altere a integridade das membranas das células guardas, competindo por sítios de ligação de cálcio. Estudos com *Lycopersicon esculentum* cv. calli, mostram que o Na^+ Cl^- pode alterar a composição qualitativa e quantitativa de lipídios, a atividade de lipoxigenases e da H^+ ATPase (RODRIGUEZ-ROSALES *et al.*, 1999). A diminuição da atividade das bombas de prótons certamente trará conseqüências sobre o gradiente eletroquímico por elas gerado, do qual as células estomáticas, que dependem para controlar o influxo-efluxo de íons, sendo este essencial no movimento de abertura e fechamento dos estômatos. As diminuições na fotossíntese na transpiração e na condutância estomática causadas pelo estresse salino, contribuiram para uma menor fixação de carbono (Figura 1.1A), que podem resultar em menor acúmulo de matéria seca, menor crescimento e menores teores de carboidratos, causando profundas modificações no metabolismo da plantas expostas a este estresse (SMITH & MCCOMB, 1981; SASILAKA & PRASAD, 1994).

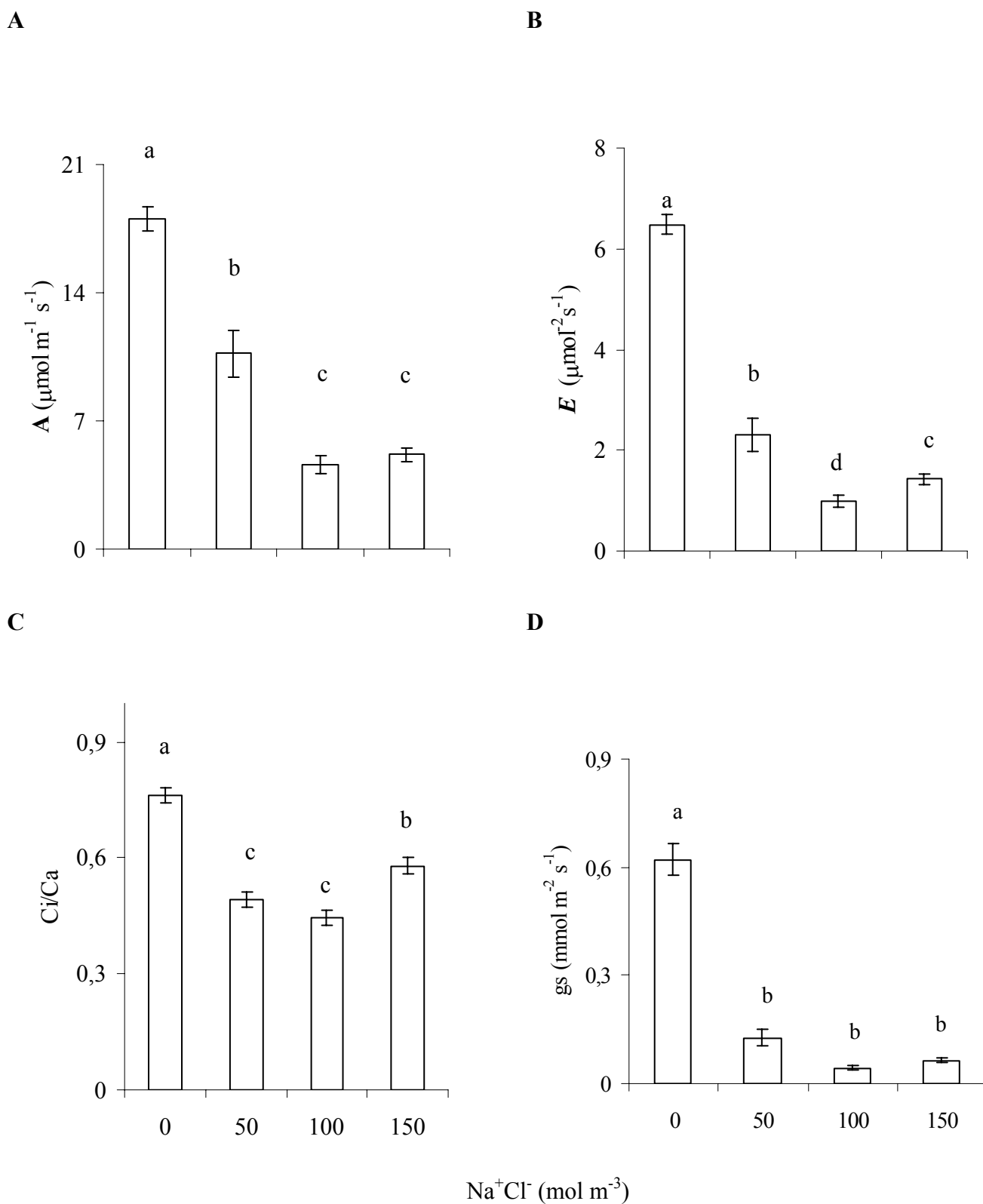


Figura 1.2- Taxa fotossintética (A) (A), taxa de transpiração (E) (B), relação carbono interno/ carbono externo (C_i/C_a) (C), condutância estomática (g_s) (D) em folhas de tomateiro, cultivados sob diversas concentrações de Na^+ e Cl^-

A relação F_v/F_m não foi afetada significativamente pelo estresse salino imposto neste experimento (Quadro 1.4), apesar desta ferramenta ser sugerida como um possível método de avaliação de resistência à salinidade por BELKHODJA *et al.*, (1994). Isto indica que a integridade física fotossistema II não foi alterada, pelo menos na faixa de concentração de íons $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$ utilizada.

Os valores de ETR e de q_p sofreram decréscimos significativos nas plantas expostas ao estresse salino (Quadro 1.4). A queda de ETR mostra que a salinidade afetou fortemente o transporte de elétrons e a dissipação fotoquímica da energia luminosa e, provavelmente, pode ser explicada por uma menor demanda de NADP reduzido, pela etapa bioquímica da fotossíntese.

O valor q_N , não foi alterado significativamente, apesar de se observar uma tendência de aumento. As variáveis, F_v/F_m , a taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), a dissipação fotoquímica (q_p) e a dissipação não fotoquímica (q_N), tem sido muito utilizadas como indicadores de estresse. Os mais diversos organismos em variados ambientes, são avaliados utilizando-se estes parâmetros, são exemplos, a contaminação ambiental por metais em ambientes aquáticos (PADINHA *et al.*, 2000), por petróleo (JONES *et al.*, 1998), por déficit hídrico (THOMAS e TURNER, 2001 QUEIROZ *et al.*, 2002) e por salinidade (MELONI *et al.*, 2003).

Ao contrário do déficit hídrico, a salinidade não afeta a dissipação não fotoquímica da fluorescência, o que foi observado no comportamento de q_N . BRUGNOLI & LAUTERI (1991), também não encontraram efeitos do estresse salino sobre os valores de q_N e F_v/F_m , quando realizaram experimentos com algodão e feijoeiro. SHARMA & HALL, (1991), trabalhando com trigo e sorgo submetidos ao estresse salino, observaram diminuição da fixação de CO_2 e da condutância estomática, mas também, não observaram efeito direto sobre a relação F_v/F_m e q_N , pois possivelmente a integridade do fotossistema II não foi alterada.

JIMENEZ *et al.*, (1997) também não encontraram efeito do estresse salino sobre os parâmetros de F_v/F_m quando as plantas foram cultivadas em casa de vegetação. HAUVAX (1993) utilizando técnicas de fluorescência modulada, mostrou que o fotossistema II é muito resistente à desidratação, diversos tipos de vegetais. Em um de seus ensaios ele demonstrou que folhas sob altas irradiâncias e temperatura de 25°C , sofriam elevada fotoinibição quando eram submetidas a déficit hídrico. Já as folhas hidratadas, tinham uma

alta fotoinibição quando submetidas à alta luminosidade e alta temperatura (38-40°C), sendo mais fotoinibidas que as folhas desidratadas, submetidas às mesmas condições.

Como este experimento foi conduzido na primavera do ano 2002 (mês de outubro), que anormalmente quente (maior média dos últimos 30 anos) e iluminada, a cobertura de vidro da casa de vegetação pode ter retido uma parte desta radiação (KUKI, 1997), sendo este um fator importante para a não variação da relação F_v/F_m e de q_N .

Quadro 1.4 - Valores da relação F_v/F_m , ETR, q_p e q_N em folhas de tomateiro cultivado sob diferentes concentrações de Na^+Cl^-

NaCl (mol m ⁻³)	F_v/F_m	ETR	q_p	q_N
0	0,79 ± 0,01 a ¹	83,7 ± 3,1 a	0,73 ± 0,02 a	0,48 ± 0,04 a
50	0,79 ± 0,01 a	69,8 ± 2,8 b	0,63 ± 0,03 b	0,50 ± 0,03 a
100	0,78 ± 0,03 a	46,6 ± 2,6 c	0,53 ± 0,04 c	0,53 ± 0,02 a
150	0,78 ± 0,01 a	48,4 ± 5,5 c	0,55 ± 0,04 c	0,55 ± 0,01 a

¹ Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey para $P < 0,05$.

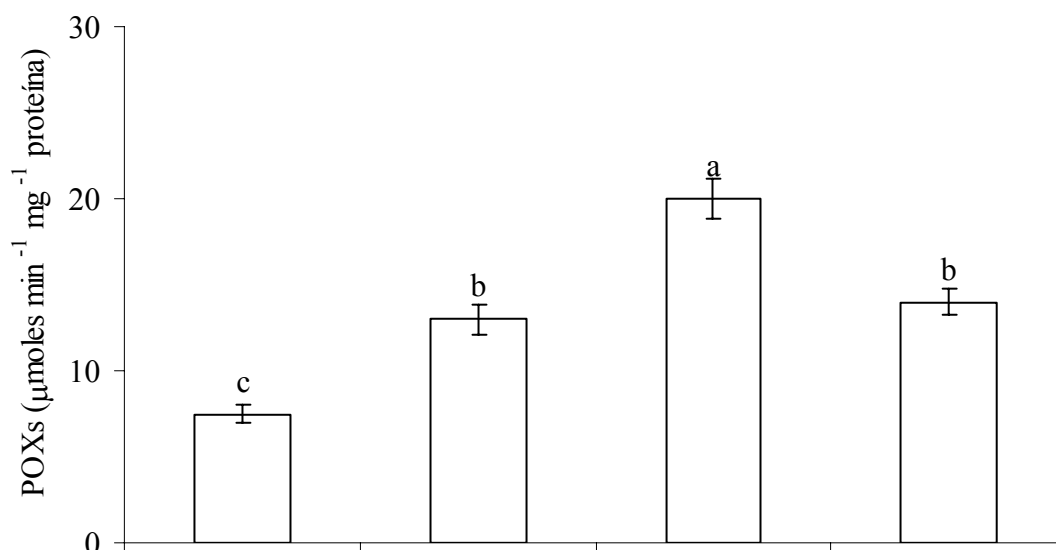
As atividades das peroxidases (POXs) aumentaram com o incremento da concentração de Na^+Cl^- até 100 mol m⁻³, e então, decresceu na concentração de 150 mol m⁻³, (Figura 1.3A). Resultados semelhantes foram obtidos em feijoeiro e mandioca (ROSSI, *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2000), algodão (MELONI *et al.*, 2003) e vários genótipos de *Morus alba* (SUDHAKAR *et al.*, 2001)

A atividade das POXs tem sido considerada como uma reação e adaptação dos tecidos vegetais a um fator estressante (GASPAR *et al.*, 1985, RAJGURU *et al.*, 1999). Houve aumento da peroxidação de lipídeos, este fato pode ser confirmado pelo aumento sensível de formação do complexo MDA-TBA (Figura 1.4). Este aumento de atividade das POXs sugere que elas têm ação protetora, reduzindo efeito deletério do estresse pela quebra de substâncias tóxicas geradas como peróxidos, fenóis (DHINDSA & MATAWE, 1981).

A atividade das SODs, aumentou com a intensificação do estresse salino, (Figura 1.3B). Na concentração mais elevada de Na^+Cl^- a atividade das SODs foi cerca de quatro vezes maior que a das plantas controle. Este aumento na atividade das SODs, também, foi

sido detectado em várias outras plantas submetidas ao estresse salino.(SUDHAKAR *et al.*, 2001; HERNANDEZ & ALAMANSA, 2002).

A



B

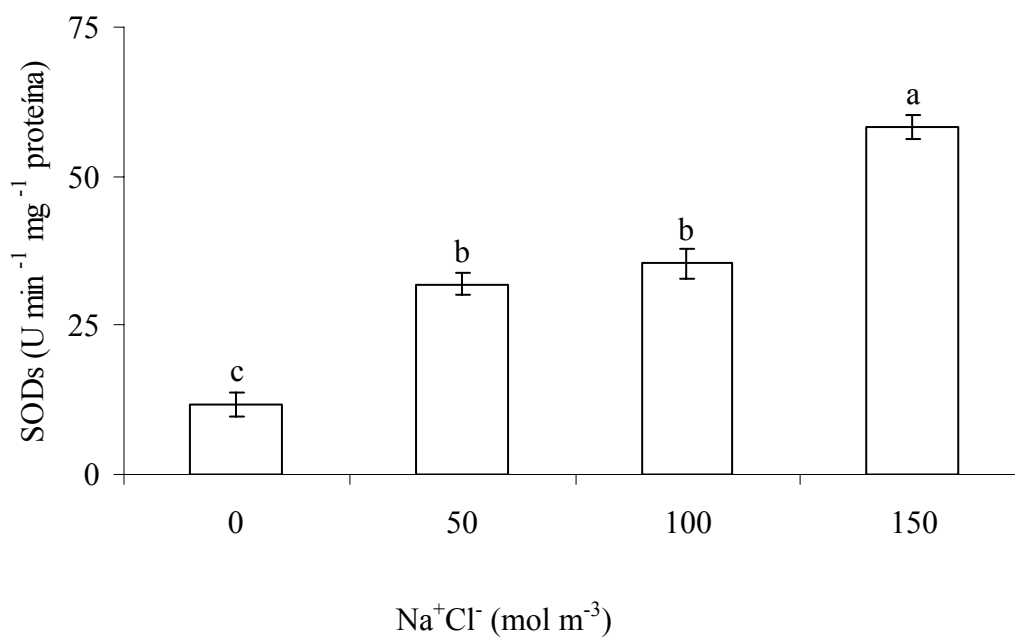


Figura 1.2 - Atividades específicas das POXs (A) e SODs (B) em folhas de tomateiro cultivado em diversas concentrações de Na⁺Cl⁻

A peroxidação de lipídeos, medida pelo acúmulo de malonaldeído (MDA), aumentou com os incrementos na concentração de Na⁺Cl⁻ na solução nutritiva, somente a partir de 100 mol m⁻³ (Figura 1.4). Na concentração de 150 mol m⁻³ o teor de MDA foi

cerca de 100% maior que nas plantas do controle. Este acúmulo de MDA indica que a salinidade está tendo um efeito oxidativo sobre os lipídeos de membranas celulares. (RODRIGUEZ-ROSALES *et al.*, 1999).

Enzimas como as POXs e SODs podem ajudar a diminuir os danos causados por espécies reativas de oxigênio (MELONI *et al.*, 2003). Neste experimento, entretanto durante os 21 dias de aplicação do estresse, este efeito mitigador, parece não ter sido suficiente para manter o equilíbrio homeostático das plantas e, conseqüentemente, as taxas de assimilação de carbono. A salinidade e os diversos estresses que a acompanham, como o estresse osmótico, o estresse iônico e o estresse oxidativo, podem ser responsáveis por grande número de efeitos deletérios sobre o metabolismo vegetal. A capacidade de sobreviver sob condições de alta salinidade, envolve, além de mecanismos efetivos de proteção a espécies reativas de oxigênio, a capacidade de acumular baixos teores de íons Cl^- e Na^+ e ou seqüestrá-los eficientemente no vacúolo e ou, produzir osmólitos compatíveis (RODRIGUEZ-ROSALES *et al.*, 1999; SUDHAKAR *et al.*, 2001; HERNANDEZ & ALAMANSA, 2002).

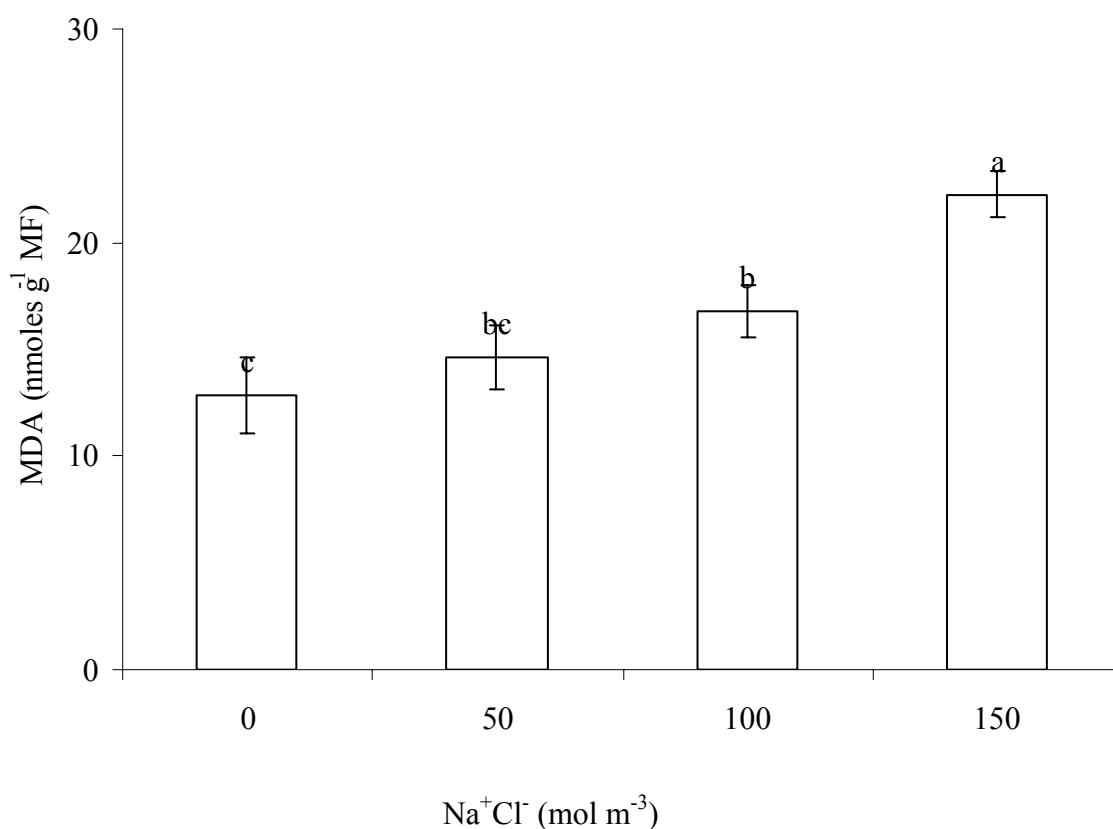


Figura 1.4 - Peroxidação de lipídeos em folhas de plantas de tomateiro cultivadas em diversas concentrações de Na^+Cl^- .

1.4 CONCLUSÕES

As concentrações elevadas de $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$ na solução nutritiva, foram capazes de alterar os ψ_s das folhas e raízes. O estresse salino provocou uma forte redução nos teores de clorofila *a*, *b* e total, na transpiração, na condutância estomática, e conseqüentemente reduziram a assimilação de carbono. Houve uma forte congruência, tanto na variação dos teores das clorofilas totais quanto na capacidade de discriminação da extração cetônica e do medidor SPAD.

Apesar da severidade do estresse salino, a relação F_v/F_m e o q_N , não foram alterados enquanto ETR e q_p foram diminuídos significativamente.

A concentração de malonaldeído aumentou com a salinidade indicando que o aumento das atividades das POXs e SODs não foi suficiente, para a manutenção do metabolismo normal da planta.

A combinação do uso do IRGA, fluorômetro e analisador de clorofila SPAD possibilitaram avaliar e mensurar a extensão do estresse e sugerir as possíveis causas dessa mudança.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIAN, A.; ALTMAN, A.; HEUER, B. Genotypic difference in salinity and water stress tolerance of fresh market tomato cultivars. *Plant Science*, v.152, p.59-65, 2000.
- ARNON, D. I. Copper enzyme in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, v.24, p.411-419, 1949.
- BASZYNSKI, T.; WAJDA, L.; KROL, M.; WOLINSKA, D.; KRUPA, Z.; TUKENDORF, A. Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. *Physiologia Plantarum*, v.48, p.365-370, 1980.
- BELKHODJA, U. R.; MORALES, F.; ABADIA, A.; GOMEZ-APARISI, J.; ABADIA, J. Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley (*hordeum vulgare l.*). *Plant Physiology*, v.104, p.667-673, 1994.
- BEUACHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable estrous acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v.44, n.1, p.276-287, 1971.
- BOECHERT, R. Time course and spatial distribution of phenylalanine ammonia liase and peroxidase activity in wounded potato tuber tissue. *Plant Physiology*, v.62, p.789-793, 1978.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- BRUGNOLI, E.; LAUTIERI, M. Effects of salinity on stomatal conductance photosynthetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt-tolerance, (*Gossipium hirsutum L.*) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris L.*) C₃ non-halophytes. *Plant Physiology*, v.95, p.628-635, 1991.
- CHANCE, M; MAEHLY, P. C. The assay of catalase and peroxidases. In: Gluck, D. (Ed). *Methods of biochemical analysis*. New York: Interscience Publishers, 1954.
- CHANDRASHEKAR, K. R.; SANDHYARANI, S. Salinity induced chemical changes in *Crotalaria striata* dc. plants. *Indian Journal Plant Physiology*, v.1, p.44-48, 1996.
- CUARTERO, J; FERNANDEZ-MUNOZ, R. Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae*, v.78, p.83-125, 1999.
- DHINDSA, R. S.; DHINDSA, P.P.; THORPE, T. A. Leaf senescence: correlated with

- increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, v.32, n.126, p.93-101, 1981.
- DHINDSA, R.S.; MATAWE, W. Drought tolerance in two mosses correlated with difference against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*, v.32, p.19-21, 1981
- GASPAR, T.; PENEL, C.; CASTILLO, F.J.; GREPPIN, H.A. A two step control of basic and acid peroxidases and its significance for growth and development. *Physiologia Plantarum*, v.64, p.418-423, 1985.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v. 59, p.309–314, 1977.
- HAUVAX, M. Salinity. *Plant Science*, v.94, p.19-33, 1993.
- HEATH, R. L.; PARKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives Biochemistry Biophysics*, v.125, n.1, p.189-198, 1968.
- HERNANDEZ. A. J.; ALMANSA, M. S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum*, v.115, p.251-257, 2002.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station (Circular 347)*, 1950.
- IBARRA, M; MAITI, R.K. Biochemical mechanism in Glossy Sorghum lines for resistance to salinity stress. *Journal Plant Physiology*, v.146, p.515-519, 1995.
- JIMENEZ, M. S.; GONZALEZ-RODRIGUES, A.M.; MORALES, D.; CID, M. C.; SOCORRO, A.R., CABALLERO, M. Evaluation of chlorophyll fluorescence as tool for salt stress detection in roses. *Photosynthetica*, v.33, p.291-301, 1997.
- JONES, H. G. Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *Journal of Experimental Botany*, v.4, p.387-398, 1998.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidases, and polyphenoloxidases activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, v.57, p.315-319, 1976.
- KOZLOWSKI, T.T. Impacts of air pollution on forest ecosystems. *Bioscience*, v.30, p.210-221, 1980.
- KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. Water relations of plants and soils. California: Academic Press, 1995, 495pp.

- KUKI, K. N. Efeito de estresses hídrico e salino sobre algumas espécies nativas da restinga. Viçosa, MG: UFV, 1997.63p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa. 1997.
- LIMA, P.P.G.; BRASIL, O.G.; OLIVEIRA, A. M. Poliaminas e atividades das peroxidases em feijão (*Phaseolus vulgarens* L.) cultivado sobre estresse salino. *Bragantia*, v.2, p.31-37, 2000.
- LIMA, P.P.G.; FERNANDES, A. A. H.; CATANEO, A. C.; BRASIL, O.G.; Alterações na atividade das peroxidases e do conteúdo de carboidratos em mandioca cultivada in vitro sob estresse salino. *Scientia Agricola*, v.55, p.413-417, 1998.
- LOUZADA, N.C; SANCHES, N. M.; SCHILINDWEIN, M.N. Bioindicadores de qualidade e de impactos ambientais da atividade agropecuária. *Informe Agropecuário*, v.21, p.72-77, 2000.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. California: Academic Press, 1995, 889pp.
- MELONI, D.A.; OLIVA, M.A.; MARTINEZ, C. A.; CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidases and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 2003 (In Press).
- MISRA, A.N.; SAHU, M.; MISRA, M; SINGH, P.; MEERA, I.; DAS, N.; KAR, M.; SAHU, P. Sodium chloride induced changes in leaf growth, and pigment and protein contents in two rice cultivars. *Biology Plant*, v.39, p.257-262, 1997.
- NIU, X.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J.M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology*, v.109, p.735-742, 1995.
- PADINHA, C.; SANTOS, R.; BROWN M.T. Evaluating environmental contamination in Ria Formosa (Portugal) using stress index of *Spartina maritima*. *Marine Environmental Research*, v.49, p.67-78, 2000.
- PERERA, L.K.R.R.; ROBINSON, M.F.; MANSFIELD, T.A. Responses of stomata of *Aster tripolium*: a new hypothesis to explain salinity regulation in above ground tissues. *Plant Cell Environment*, v.17, p.335-340, 1994.
- QUEIROZ, C.G.S., GARCIA, Q.S.; LEMOS, J.P.F. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membrana em plantas de aroeira do sertão sob estresse hídrico e após re-hidratação. *Brazilian Journal Plant Physiology*, v.14, n.1, p.59-63, 2002.
- RAJGURU, S.N.; BANKS, S.W.; GOSSETT, D.R.; CRAN LUCAS, M.; FOWLER, T.E.;

- MILLHOLLON, E.P. Antioxidant response to salt stress during fiber development in cotton ovules. *Journal of Cotton Science*, v.3, p.11-18, 1999.
- RAO, G. G.; RAO, G.R. Pigment composition and chlorophyllase activity in pigeon pea (*Cajanus indicus*, S.) and gingelly (*Sesamum indicum* L.) under NaCl salinity. *Indian Journal of Experimental Botany*, v.19, p.768-770, 1981.
- RODRIGUEZ-ROSALES, M. P.; KERKEB, L.; BUENO, P.; DONAIRE, J.P. Changes induced by NaCl in lipid content and composition, lipoxygenase, plasma membrane H⁺-ATPase and antioxidant enzyme activities of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) cv.calli. *Plant Science*, v.143, p.143-150, 1999.
- ROSSI, C.; LIMA, G.P.P.; HAKVOOT, D.M.R. Atividade de peroxidases (EC 1.11.1.7) e teor de prolina em feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em condições de salinidade. *Scientia Agricola*, v. 54, p.123-127, 1997.
- SASILAKA, D. P. P.; PRASAD, P.V.D. Salinity effects on in vitro performance of some cultivars of potato. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.1, p.1-6, 1994.
- SHARMA, P.K.; HALL, O. The effect of salinity, photoinhibition and interaction of both on photosynthesis in barley. In: Barber J.; Malkin, R. (Eds). *Proceedings Of A Nature Advanced Study Institute*, Island of Spetsal, Greece. v.168, p.571-577, 1991.
- SMITH, M.K.; MCCOMB, J. A. Effect of NaCl on the whole plants and their corresponding callus culture. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.8, p.267-275, 1981.
- SUDHAKAR, C.; LAKSHIMI, A.; GIRIDARAKUMAR, S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, v.161, p.613-619, 2001.
- THOMAS, D.S.; TURNER, D.W. Banana (*Musa* sp.) leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence in response to soil drought, shading and lamina folding. *Scientia Horticulturae*, v.90, p.93-108, 2001.
- ZHU, J.K. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, v.6, p.66-71, 2001.

Capítulo 2

METODOLOGIAS NÃO-INVASIVAS E BIOQUÍMICAS USADAS NA DETECÇÃO DOS EFEITOS FISIOLÓGICOS CAUSADOS POR CÁDMIO EM TOMATEIRO

RESUMO

SOUZA, Carlos Lúcio de Lacerda Vasconcelos, M.S, Universidade Federal de Viçosa, março 2003. **Metodologias não-invasivas e bioquímicas usadas na detecção dos efeitos fisiológicos causados por cádmio em tomateiro.** Orientador: Marco Antônio Oliva Cano. Conselheiros: Carlos Alberto Martinez y Huaman e José Cambraia.

Plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) com sete dias de idade e cultivadas em solução nutritiva de Hoagland foram expostas às concentrações de cádmio de 0, 10, 30 e 50, $\mu\text{moles L}^{-1}$ com a finalidade de avaliar os danos fisiológicos do cádmio por meio de metodologias não-invasivas e da atividade de enzimas ligadas a um possível estresse oxidativo, decorrente do estresse primário. Após quatorze dias de exposição ao cádmio, foram determinados, os teores de clorofila, a assimilação de carbono, a condutância estomática, a transpiração, a relação Ci/Ca, os parâmetros de fluorescência rápida e lenta, a presença do agente estressor na planta, as atividades enzimáticas das SODs e POXs e a peroxidação de lipídeos. As plantas dos diversos tratamentos tiveram os teores de cádmio presentes nas raízes e folhas aumentados. Os teores de clorofilas *a*, *b* total e carotenóides foram diminuídos, mas a relação clorofila *a/b* não foi alterada. A assimilação de carbono diminuiu, relação carbono interno aumentou, a condutância estomática, transpiração, não sofreram alterações. Os parâmetros de F_v/F_m , q_p , q_N e a taxa relativa de transporte de elétrons foram alterados significativamente pelo cádmio. As atividades das SODs e das POXs foram aumentadas pelo agente estressor, também foi observado um aumento significativo na peroxidação de lipídeos. O cádmio provou ser capaz de interferir no processo fotossintético, aumentando a degradação dos pigmentos fotossintéticos e reduzindo a assimilação de carbono. A queda da taxa fotossintética, está ligada com a diminuição da eficiência do fotossistema II, evidenciada pela diminuição nos parâmetros de fluorescência e por um possível estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento das atividades das SODs e POXs. A associação do IRGA, fluorômetro e medidor SPAD, foram capazes de captar as alterações no metabolismo das plantas causadas pelo tratamento com cádmio. O aumento das atividades das SODs e POXs e da peroxidação de lipídeos evidenciam os efeitos deletérios provocados pelo cádmio no metabolismo das plantas expostas.

ABSTRACT

SOUZA, Carlos Lúcio de Lacerda Vasconcelos, M.S, Universidade Federal de Viçosa, march 2003. **Non invasive and biochemistries methodologies used the detect of the physiological effects due by cadmium in tomato plants.** Advisor: Marco Antonio Oliva Cano. Committee members: Carlos Alberto Martinez y Huaman e José Cambraia.

Seven days old tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill) were grown in Hoagland solution supplied with 0, 10, 30, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cd^{2+} to evaluate the physiological alterations through non invasive methods and enzymatic activity related to oxidative stress pathway. 14 days after the exposure to cadmium the plants were screened for chlorophylls content, carbon assimilation, stomatal conductance, transpiration, Ci/Ca ratio, fluorescence traits, SODs and POXs activity, lipid peroxidation and element contents in the tissues. Plants exposed to the treatment showed increased accumulation of cadmium accordingly to the doses exposure, either in leaves and roots. The chlorophylls *a*, *b*, total and carotenoids content diminished but the chlorophyll *a/b* ratio did not change. The carbon assimilation rate decreased while the Ci/Ca ratio increased and the stomatal conductance and transpiration were not affected. The fluorescence traits, F_v/F_m ratio, q_p , q_N and electron transport, were significantly altered by the treatment. SOD and POXs activity as well as the lipid peroxidation were significantly raised by the stress. Thus, cadmium proves to be able to interfere on photosynthetic metabolism either by affecting chlorophylls content or carbon assimilation. The reduction on photosynthesis could be linked to the decrease on PSII efficiency, displayed by the fluorescence parameters or to an oxidative stress, displayed by the increment on enzymes activity. The non invasive procedure performed with IRGA, fluorometer and SPAD reader was able to point out metabolic changes and suggest its causes. The value of this non invasive methodology was supported by the results obtained with enzymatic activity and lipids peroxidation.

2.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o crescimento da indústria e a expansão das atividades agrícolas têm contribuído para o aumento da concentração de metais pesados nos ecossistemas (VINIT-DUNAND *et al.*, 2002). Teores fitotóxicos destes metais não são naturalmente encontrados nos solos ou na água, mas podem vir a ocorrer graças à atividade industrial, nas áreas de siderurgia, produção de adubos fosfatados, mineração de zinco e produção de baterias. A utilização de fertilizantes fosfatados ricos em metais pesados, como o cádmio ou a aplicação excessiva de pesticidas a base de cobre (ROSSI & LIMA, 2001; MORAL *et al.*, 2002) tem também contribuído para o aumento destes metais poluentes em áreas agrícolas. Atualmente metais como o Zn, Cu, Pb, Hg e Cd estão amplamente difundidos nos ecossistemas, terrestres, costeiros e marinhos (MENDELSSOHN *et al.*, 2001). Estimativas indicam estar havendo um incremento anual de 6% no cádmio disperso no meio ambiente graças à ação antrópica, pode-se esperar que esta taxa tende aumentar nos próximos anos, em parte pelo aumento do seu uso e das suas aplicações industriais (TJELL *et al.*, 1981).

Dentre os metais pesados o cádmio se destaca pela sua capacidade de causar variadas injúrias aos mais diversos seres vivos (BERTRAND *et al.*, 2001). Nos animais superiores o cádmio acumula-se principalmente em tecidos de alto metabolismo, como os que formam o fígado, os rins e o pâncreas. Nas plantas o cádmio não é considerado elemento essencial, mas é bem conhecida a capacidade das plantas absorvê-lo, translocá-lo e acumulá-lo em quantidades consideráveis (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

O cádmio pode produzir uma série de injúrias nas plantas, tais como redução no crescimento, menor produção de biomassa e desordens em processos importantes do metabolismo (MORAL *et al.*, 2002). O processo fotossintético como um todo é muito sensível ao cádmio. Este metal inibe a biossíntese de clorofila, interfere no processo de transporte de elétrons entre os dois fotossistemas, altera as taxas de evolução de oxigênio, influência no ciclo das xantofilas, um importante fator de fotoproteção sob altas intensidades luminosas e, em consequência, reduz assim a assimilação de carbono (WEIGEL, 1985; DAS *et al.*, 1997; BERTRAND *et al.*, 2001). A interferência do cádmio sobre o aparelho fotossintético pode ser avaliada pela medição de vários parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, como a relação fluorescência variável/ fluorescência máxima

(F_v/F_m), a dissipação fotoquímica (q_p) e a dissipação não fotoquímica (q_N) (KRUPA & MONIAK, 1998). Além disso a exposição ao cádmio pode produzir um estresse oxidativo, desencadeando uma série de processos enzimáticos protetores, como o aumento da atividade das peroxidases (OLIVEIRA, 1992; ROSSI & LIMA, 2001). Efeitos secundários causados pelo estresse oxidativo como a oxidação nos lipídeos formadores das membranas celulares que alteram a seletividade das membranas celulares, também são relatados em plantas expostas a este metal (QUARITI *et al.*, 1997).

Apesar da grande variabilidade entre as espécies de vegetais existentes, as reações metabólicas como a fotossíntese, a transpiração, a biossíntese de clorofila, são semelhantes nos diversos vegetais. Alterações nestas variáveis podem ser quantificadas facilmente por meio do uso de IRGAS e fluorômetros, enquanto que certas etapas do metabolismo só são passíveis de serem visualizadas no final do ciclo da planta ou são de difícil avaliação.

Plantas em crescimento são particularmente susceptíveis a agentes estressores, sofrendo alterações no metabolismo antes que os sintomas visíveis sejam notados (KOZLOWSKI, 1980). O reconhecimento preventivo dos danos, visíveis e/ou latentes, seria vantajoso, especialmente quando os danos podem vir a ser irreversíveis ou não passíveis de diagnose visual (MARKERT, 1993; BALL *et al.*, 1994; RALPH & BURCHETT, 1998; LOUZADA, *et al.*, 2000; PADINHA *et al.*, 2000; STRASSER *et al.*, 2000; MENDELSSOHN *et al.*, 2001; ROGER & WEISS, 2001).

Este trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos de diversas concentrações de cádmio, em alguns processos fisiológicos do tomateiro, utilizando-se para isso de metodologias não-invasivas, complementadas com avaliações de mecanismos enzimáticos que possam vir a diminuir os efeitos deletérios dessa exposição.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal e variáveis medidas

O ensaio foi realizado em casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa, localizada a 20° 45' S e 42° 51' W, no estado de Minas Gerais, Brasil, durante os meses de outubro e novembro de 2002.

Sementes de tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill (cv. Santa Clara 5600 VF, da empresa Agroflora/Sakata), foram colocadas para germinar em bandejas com areia lavada e esterilizada, em câmara de germinação tipo BOD, com condições ambientais controladas, por cerca de sete dias. Nesse período, as plântulas foram submetidas a 16 horas de luz (250 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 8 horas de escuro e sob temperatura média de 30°C.

Quando as plântulas alcançaram, aproximadamente, 10 cm de altura e duas folhas expandidas, foram transferidas para recipientes de isopor, recobertos com sacos de polietileno, contendo 2,0 litros de solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON, 1950), com pH $6,0 \pm 0,1$, com metade da força iônica e arejada constantemente. Após três dias, as plântulas foram transferidas para uma solução nutritiva de composição igual mas com força iônica total.

O estresse com cádmio começou a ser aplicado após o 7º dia de cultivo, submetendo as plântulas a diversas concentrações de CdCl_2 (0, 10, 30 e 50 $\mu\text{moles L}^{-1}$). No 14º dia, após o início da aplicação do estresse, o experimento foi encerrado, sendo neste dia medidas, as variáveis fotossintéticas e de fluorescência rápida e lenta, coletadas amostras de folhas para determinação de clorofila e o resto do material congelado para a determinação posterior das atividades enzimáticas e da peroxidação de lipídeos e teor cádmio nos tecidos.

A taxa fotossintética líquida (A), a condutância estomática (g_s) a transpiração (E) e a concentração interna de CO_2 (C_i) foram medidas nas duas primeiras folhas totalmente expandidas de todas as plantas, com um analisador de gases no infravermelho (LCI 6400, LI-Cor Inc, Lincoln, Nebraska, USA). As medições foram realizadas entre as 8:00 e 11:30h da manhã sob uma intensidade luminosa de 1000 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 25°C. Nas mesmas folhas foram medidas, a relação F_v/F_m , a dissipação fotoquímica (q_p), e

a dissipação não fotoquímica (q_N) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) utilizando um analisador de rendimento fotossintético Walz (Mini PAM, Heinz Walz, Effeltrich, GmbH).

Os teores de clorofila total foram determinados, *in vivo* mediante o uso de um aparelho portátil SPAD (SPAD-502 Minolta Chlorophyll Meter, Minolta, Japão) e espectrofotometricamente, *in vitro*, pelo método de ARNON (1949). Neste caso foram obtidos extratos cetônicos, nos quais foram determinados os teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides.

2.2.2 Determinação do cádmio presente nas raízes e nas folhas

Folhas completamente expandidas e raízes das plantas de tomateiro foram lavadas com água desmineralizada, enxugadas com toalhas de papel, acondicionadas em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada a 75°C até que as amostras atingissem peso constante. O material seco foi moído em moinho do tipo Willey, sendo amostras mineralizadas por via úmida, usando-se uma solução nitricoperclórica (ALLAN, 1969). Os teores de cádmio foram determinados em um espectrofotômetro de absorção atômica (Shimadzu AA6701F, Shimadzu, Osaka, Japão) em chama de ar/acetileno (PULIDO *et al.*, 1966).

2.2.3 Determinação da atividade enzimática

2.2.3.1 Obtenção do extrato enzimático

Trezentas miligramas de tecidos foliares congelados foram triturados na presença de nitrogênio líquido e, então, homogeneizados com 10 mL de uma solução de extratora constituída de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,8. O homogeneizado, filtrado através de 8 camadas de gaze foi centrifugado a 13.000 $\times g$ por 15 min. O sobrenadante obtido foi utilizado nos ensaios enzimáticos. Todas as operações, utensílios e reagentes foram mantidos em temperatura entre 0 a 4 °C.

A dosagem de proteínas no extrato enzimático bruto foi feita pelo método de BRADFORD (1976).

2.2.3.2 Peroxidasas (POX,s 1.11.1.7)

A atividade das peroxidases foi determinada segundo o método proposto por KAR & MISHRA (1976), que consiste adição de uma alíquota de 100 µL de extrato enzimático bruto a um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20mM. A absorvância a 420 nm foi monitorada durante dois minutos e atividade das peroxidases calculada pela inclinação da reta e expressa em µmoles de purpurugalina formada por minuto por mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ (CHANCE & MAEHLEY, 1954).

Um branco foi conduzido paralelamente utilizando-se meio de reação e uma alíquota de 100 µL do meio de extração.

2.2.4.2 Dismutases do superóxido (SODs, EC 1.15.1)

A atividade das superóxidos dismutases foi determinada adicionando-se 50 µL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de um meio de reação, constituído de metionina 13 mM, azul de *p*-nitrotetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 100 nM e riboflavina 2 µM em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8. A reação, iniciada colocando-se os tubos em uma caixa com tampa perfurada e revestida por um filme do alumínio, dotada de uma lâmpada fluorescente de 25 W, foi paralisada após 15 minutos com o desligamento da lâmpada (GIANNOPOLITIS & RIES, 1977). A formazana azul resultante da fotorredução do NBT foi medida pelo incremento da absorvância a 560 nm. Um branco foi obtido mantendo-se o meio de reação no escuro. Uma unidade das SODs foi definida como a quantidade de enzimas necessária para inibir 50% a fotorredução do NBT (BEUACHAMP & FRIDOVICH, 1971).

2.2.2.5 Determinação do complexo MDA-TBA

A determinação da quantidade de malonaldeído (MDA) formado foi realizada segundo o método proposto por DHINDSA *et al.*, (1981).

Trezentas miligramas de tecidos foliares foram trituradas na presença de nitrogênio líquido, então se adicionou 5 mL de ácido tricloroacético a 0,1%. O homogeneizado foi filtrado através 8 camadas de gaze e centrifugado a 10.000 xg por 5 min. Uma alíquota de 1

mL do sobrenadante foi adicionada a 4 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% em ácido tricloroacético 20% e a mistura colocada em banho-maria a 90° C por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram retirados, imersos em banho de gelo e centrifugados a 10.000 *xg* por 10 min e as absorvâncias dos sobrenadantes lidas a 532 nm e a 600nm (absorvância não-específica). A quantidade do complexo MDA-TBA, foi calculada utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (HEATH & PACKER, 1968).

2.2.5 Análise estatística

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado: um cultivar de tomateiro e quatro concentrações de CdCl₂ 0, 10, 30 e 50 µmoles L⁻¹ e cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância com um $\alpha= 5\%$ e quando os valores de F foram significativos, uma comparação de médias foi realizada, utilizando-se para isso o teste de Tukey, com 5% de probabilidade.

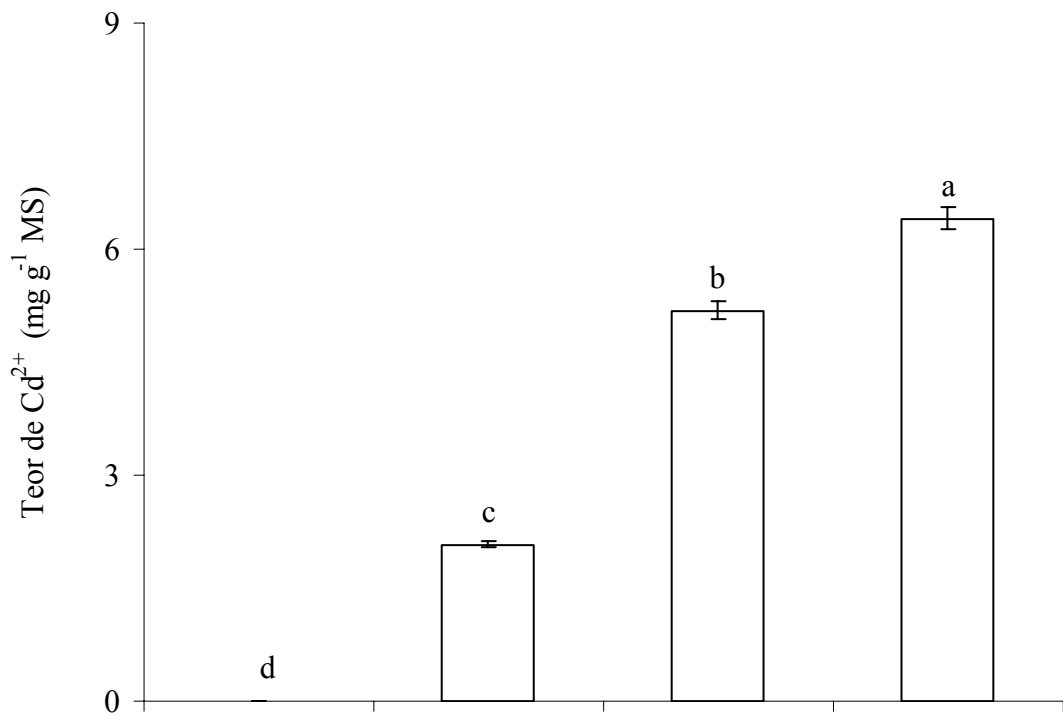
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas expostas à concentração de 10 $\mu\text{moles L}^{-1}$ não apresentaram sintomas visíveis de toxidez. Em concentrações de 30 e 50 $\mu\text{moles L}^{-1}$ de Cd, os sintomas puderam ser percebidos à partir do terceiro dia de exposição da plantas. Além da expressiva redução no crescimento, estas plantas apresentaram clorose internerval muito acentuada, que, inicialmente atingiu as folhas mais novas e, posteriormente, a planta inteira a partir décimo dia do ensaio, observou-se diminuição da emissão de folhas novas e considerável encarquilhamento das folhas emitidas. No final do ensaio as plantas submetidas a 50 $\mu\text{moles L}^{-1}$ de Cd apresentavam uma desintegração dos tecidos dos pecíolos das folhas superiores e “queima” do limbo foliar próximo.

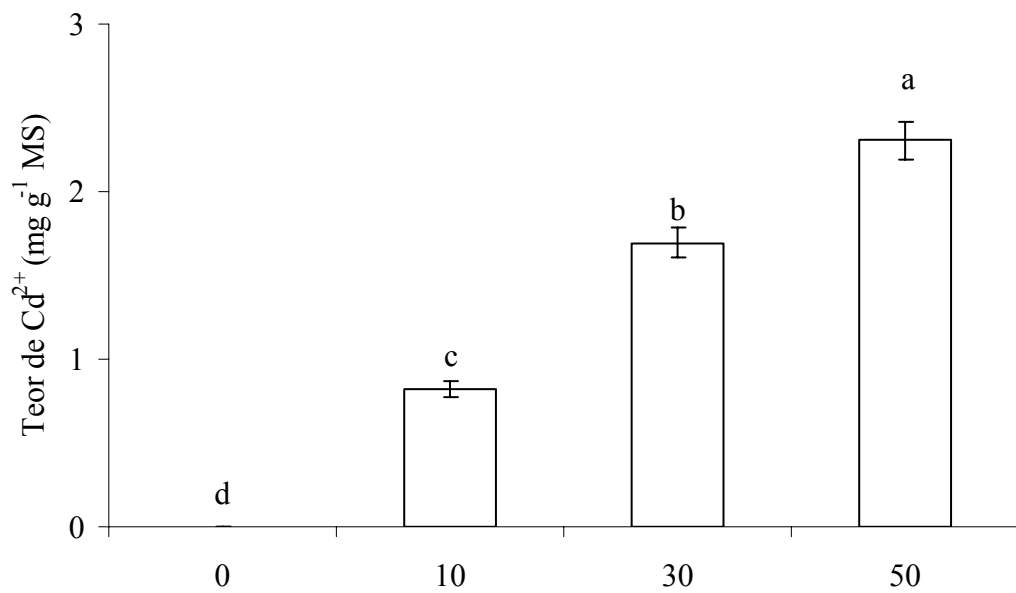
Plantas de tomateiro expostas ao cádmio acumularam quantidades substanciais deste elemento nos tecidos (Figura 2.1A e B). O teor nas raízes foi bem superior, ao observado nas folhas para o mesmo tratamento. Isto parece ser comum na maioria das plantas, como em outros genótipos de tomateiro (BASZYNSKY *et al.*, 1980; QUARITI *et al.*, 1997; MORAL *et al.*, 2002), em soja (OLIVEIRA, 1994), em feijão (TUKENDORF *et al.*, 1997). Os teores e a distribuição observados são semelhantes aos observados por outros autores (BASZYNSKY *et al.*, 1980; QUARITI *et al.*, 1997; MORAL *et al.*, 2002), mesmo utilizando outras cultivares, submetidas a diferentes formas de cultivo e tempos de exposição.

O cádmio causou alterações significativas nos teores de clorofila das plantas expostas (Quadro 2.1). Os teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides diminuíram significativamente, enquanto a relação clorofila *a/b* não se alterou. Os teores de clorofila *a* e da clorofila *b* e carotenóides foram reduzidos respectivamente, 7,0, 7,5 e 2,6 vezes, quando comparados o controle, e nas plantas submetidas a maior concentração de cádmio respectivamente.

A



B



Cd²⁺ (μmol L⁻¹)

Figura 2.1 - Teores de cádmio nas raízes (A) e folhas (B) de tomateiro cultivado em diferentes concentrações de Cd²⁺

Quadro 2.1 - Teores de clorofila e carotenóides em extrato cetônico presentes em folhas de tomateiro, cultivados em diferentes concentrações de Cd²⁺

Cd ($\mu\text{moles L}^{-1}$)	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF)	Clorofila <i>b</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF)	Carotenóides ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF)	Clorofila <i>a/b</i>
0	1,68 \pm 0,04 a ¹	0,68 \pm 0,02 a	238 \pm 2,64 a	2,46 \pm 0,05 a
10	1,08 \pm 0,03 b	0,48 \pm 0,02 b	183 \pm 2,43 b	2,31 \pm 0,04 a
30	0,43 \pm 0,06 c	0,16 \pm 0,02 c	108 \pm 2,94 c	2,67 \pm 0,02 a
50	0,24 \pm 0,04 d	0,09 \pm 0,01 d	89 \pm 3,02 c	2,54 \pm 0,03 a

¹Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey para P<0,05.

O teor de clorofila total avaliado mediante o uso da extração cetônica e do medidor SPAD, foram alterados significativamente (Quadro 2.2). Conforme se incrementou a concentração de Cd²⁺ na solução de cultivo a clorofila total avaliada pelo uso da extração cetônica diminui, 1,51, 4,36 e 7,04 vezes respectivamente quando comparados ao controle. Já nas medições empregando o medidor SPAD, esta redução foi de, 1,37, 2,31 e 4,11 vezes respectivamente.

Estas reduções nos teores de pigmentos fotossintéticos evidenciam as grandes alterações no metabolismo dos vegetais, causadas pelo cádmio presente na solução de cultivo. Resultados similares foram obtidos por BASZYNSKY *et al.*, (1980) trabalhando com outros genótipos de tomateiro em solução nutritiva. Em plantas de *Brassica napus* foi observado, também a redução da clorofila total bem como dos carotenóides (LARSSON *et al.*, 1998) e em trigo reduções progressivas das concentrações de clorofila *a*, *b* e carotenóides (BURTON, *et al.*, 1986).

Houve uma redução do teor de clorofila total, medido tanto pelo SPAD, quanto pela extração cetônica. A análise de regressão (Figura 2.1), indica que existe uma forte congruência e variação uniforme entre os dados obtidos pela extração cetônica e o SPAD, que também demonstraram a mesma tendência em discriminar os tratamentos testados. A análise de regressão (Figura 2.1) sugere que o medidor SPAD pode ser usado como uma alternativa, a outras formas de avaliação de teor de clorofila total, sendo uma forma sensível, rápida e prática para a avaliação dos mesmos.

Quadro 2.2 - Teores de clorofila total em extratos cetônicos e em folhas intactas e pelo medidor SPAD, em tomateiro, cultivados em diferentes concentrações de Cd^{2+}

Cd ($\mu\text{moles L}^{-1}$)	Clorofila total ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF)	Clorofila total unidades SPAD
0	$2,37 \pm 0,06$ a ¹	$37 \pm 0,71$ a
10	$1,56 \pm 0,08$ b	$27 \pm 1,00$ b
30	$0,59 \pm 0,05$ c	$16 \pm 1,51$ c
50	$0,32 \pm 0,04$ d	$9 \pm 1,23$ d

¹Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey para $P < 0,05$

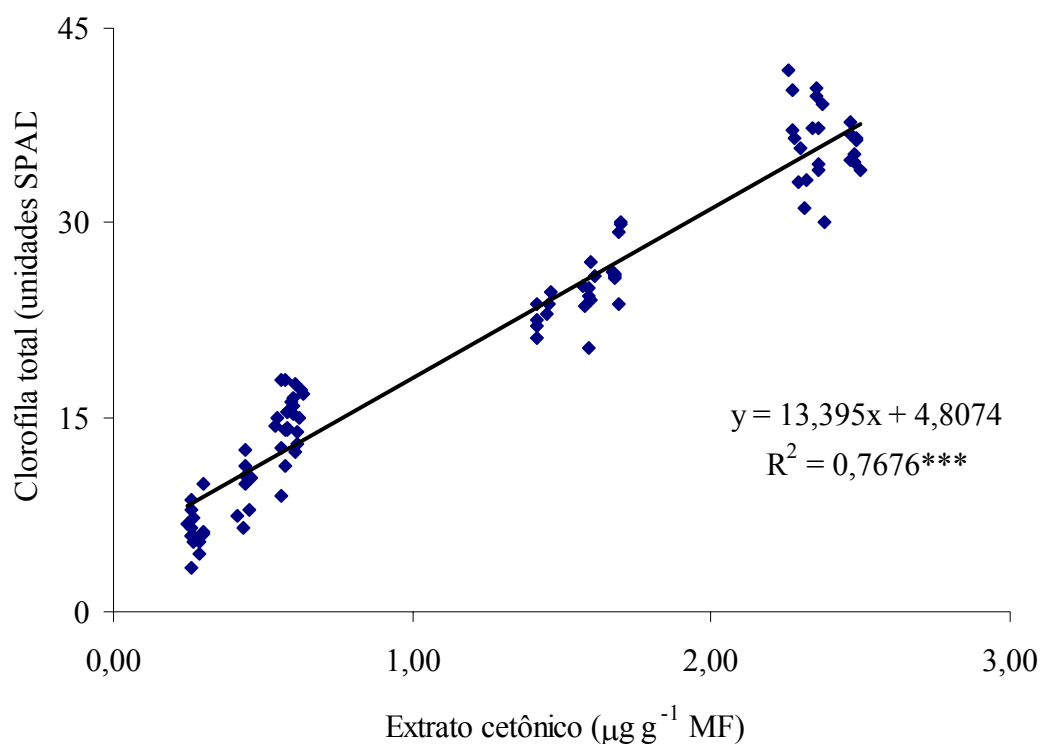


Figura 2.2 Gráfico da análise de regressão entre os valores de clorofila total obtidos pelo medidor SPAD e extrato cetônico. ***Nível de significância $P > 0,001$.

A assimilação de carbono (*A*) (Figura 2.3A) sofreu uma redução de 1,8 vezes nas plantas expostas às concentrações de 30 $\mu\text{moles L}^{-1}$ e chegou a uma redução de 2,9 vezes nas expostas a 50 $\mu\text{moles L}^{-1}$ de cádmio.

A transpiração (*E*) (Figura 2.3B), a condutância estomática (g_s) (Figura 2.3D) não foram afetadas significativamente pelo cádmio. BARCELÓ *et al.*, (1986) descreveram alterações nos mecanismos de abertura estomática, o que não observado neste ensaio. A possível explicação para esta discrepância pode estar no fato do cádmio não afetar os movimentos estomáticos diretamente, mas interferir na movimentação de íons como Ca^{2+} e K^+ e na ação do ácido absísico sobre as células guardas (BARCELÓ & POSCHENRIEDER, 1990). Apesar de não haver uma variação significativa na condutância estomática, observou-se um aumento no CO_2 interno, evidenciado pela relação C_i/C_a (Figura 2.3C), o que mostra que a diminuição da assimilação de carbono parece não estar ligada a disponibilidade de CO_2 . O aumento no CO_2 interno (Figura 2.3C) pode ser creditado aos distúrbios na respiração normalmente ocasionados por metais pesados (LEE *et al.*, 1976; SHEORAN *et al.*, 1990).

A redução da fotossíntese na presença de cádmio tem sido explicada de diversos modos que não pela inibição estomática. O cádmio tem um efeito deletério, quando este penetra na raiz em *Allium cepa* ele causa danos ao nucléolo (LIU *et al.*, 1995), em arroz ele inibe a síntese de RNA e a atividade da ribonuclease (SHAN & DUBEY, 1995), interfere fortemente no metabolismo do nitrogênio, diminuindo a absorção de nitrato e diminuindo a atividade da redutase do nitrato (HERNANDEZ *et al.*, 1996), altera o metabolismo do ferro, induzindo a sua deficiência (ALCANTARA, *et al.*, 1994). Estas alterações no metabolismo sugerem que a queda na assimilação de carbono está muito mais ligada a uma não síntese/re-síntese do aparelho fotossintético do que a uma inibição estomática.

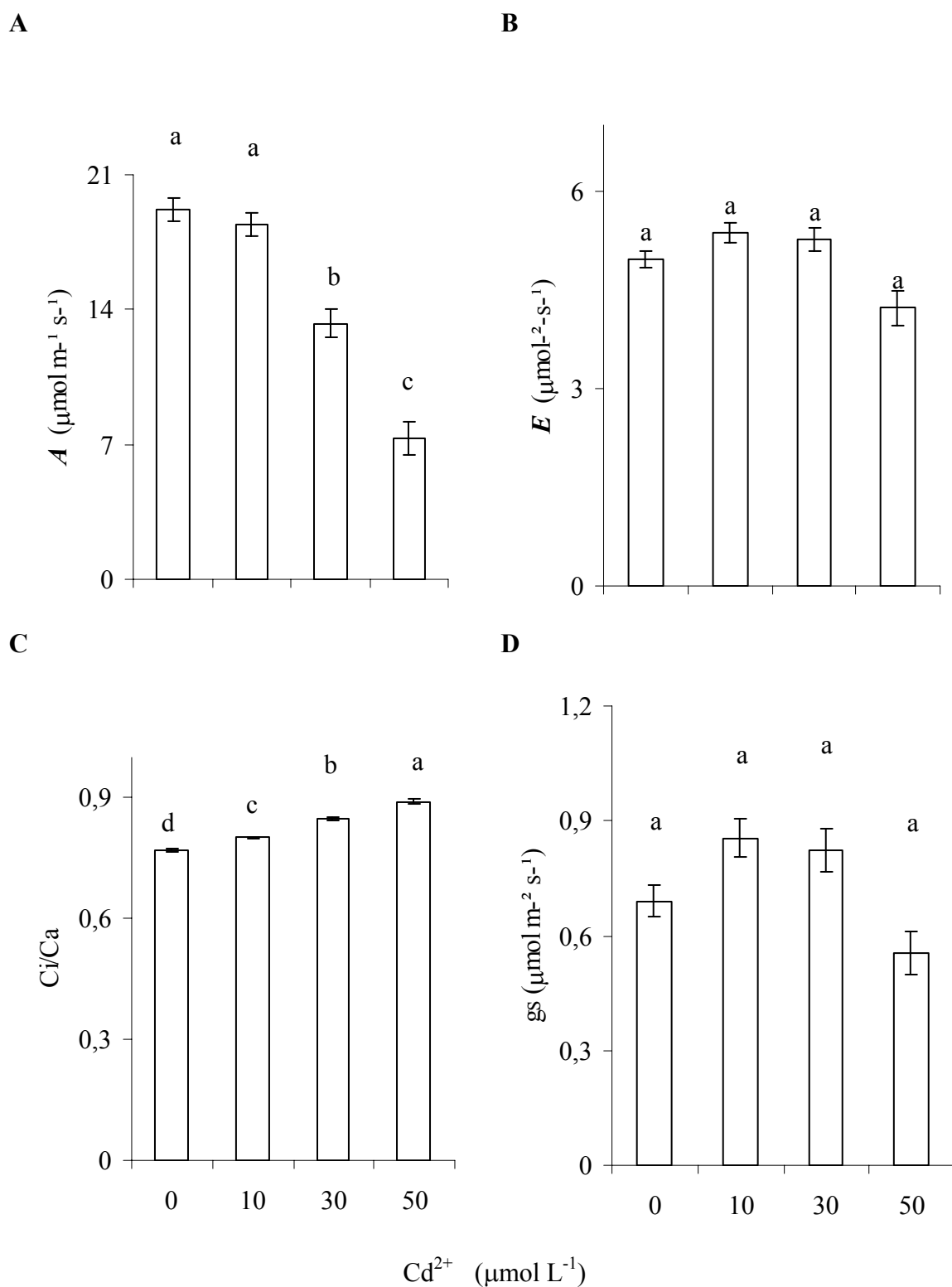


Figura 2.3 - Taxa fotossintética (A) (A), transpiração (E) (B), relação carbono interno carbono externo (C_i/C_a) (C), condutância estomática (g_s) (D) em folhas de plantas de tomateiro, cultivadas em diversas concentrações de Cd^{2+}

A relação F_v/F_m , a taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), a dissipação fotoquímica (q_p) e a dissipação não fotoquímica (q_N) reduziram-se significativamente com o aumento do cádmio na solução nutritiva (Quadro 2.3). Apesar da relação F_v/F_m e dos outros parâmetros de fluorescência serem considerados mais sensíveis que a assimilação de carbono para a identificação de estresses provocados pelo cádmio (MENDELSSOHN *et al.*, 2001), os valores observados não foram capazes de discriminar bem as plantas controle e as cultivadas na presença de 10 μ moles de cádmio. A explicação para isso pode estar no tipo da planta usada, em seu crescimento rápido e no seu metabolismo.

Segundo KRUPA, (1988) o cádmio causa danos diretamente ao aparelho fotossintético, em particular ao fotossistema II e ao fotossistema II e I (SIEDLECKA & BASZYNSKY, 1993; SIEDLECKA & KRUPA, 1996). Estes danos podem ser estudados pela redução nos pigmentos fotossintéticos, pela diminuição do ETR e q_p e o aumento de q_N (Quadro 2.3).

Quadro 2.3 - Valores da relação F_v/F_m , ETR, q_p e q_N em folhas de tomateiro, cultivado em diferentes concentrações de Cd^{2+}

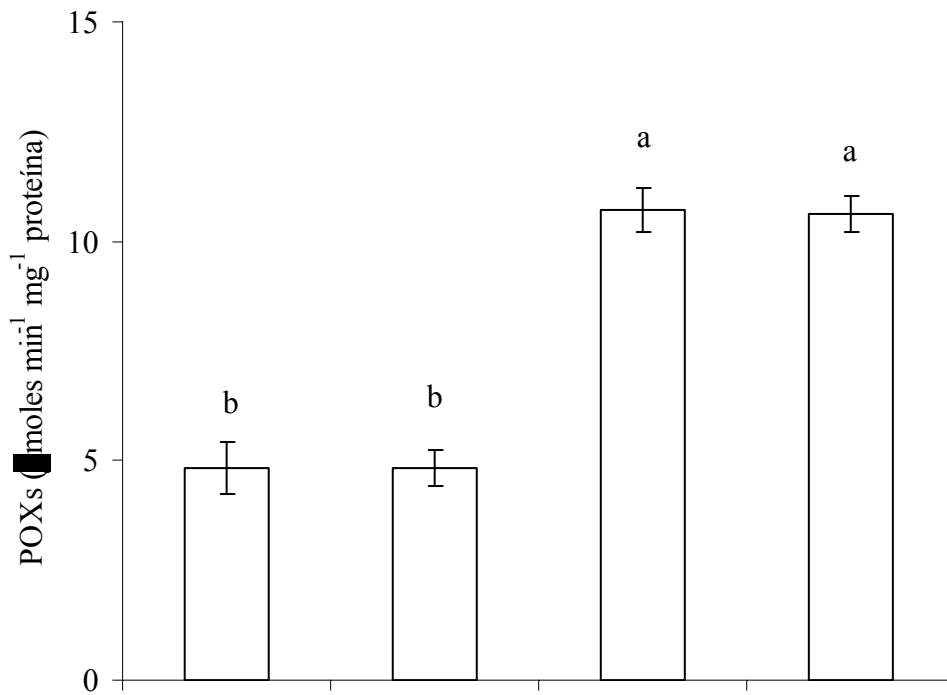
Cd (μ mol L ⁻¹)	F_v/F_m	ETR	q_p	q_N
0	0,80 \pm 0,03 a ¹	88,6 \pm 1,7 a	0,749 \pm 0,01 a	0,453 \pm 0,03 c
10	0,76 \pm 0,02 a	82,9 \pm 2,2 b	0,720 \pm 0,04 a	0,470 \pm 0,02 c
30	0,67 \pm 0,02 b	72,5 \pm 1,7 c	0,601 \pm 0,02 b	0,630 \pm 0,02 b
50	0,59 \pm 0,03 c	53,7 \pm 2,4 d	0,551 \pm 0,01c	0,685 \pm 0,01 a

¹Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey para $P < 0,05$

A atividade das POXs (figura 2.4A) nas concentrações de 30 e 50 μ moles L⁻¹ de cádmio, dobraram se comparadas ao controle e a concentração 10 μ moles L⁻¹. A atividade da SODs aumentou progressivamente com o aumento das concentrações de 10 e 30 μ moles L⁻¹ de cádmio, decaindo na concentração mais elevada (figura 2.4B).

As atividades das SODs e POXs observadas neste genótipo foram similares aos descritos na literatura, em outras cultivares de tomateiro expostos a mercúrio (CHO & PARK, 2000), a cobre (MAZHOUDI *et al.*, 1997), à salinidade (RODRIGUES-ROSALES *et al.*, 1999) e expostos ao frio e ao calor (RIVERO *et al.*, 2001).

A



B

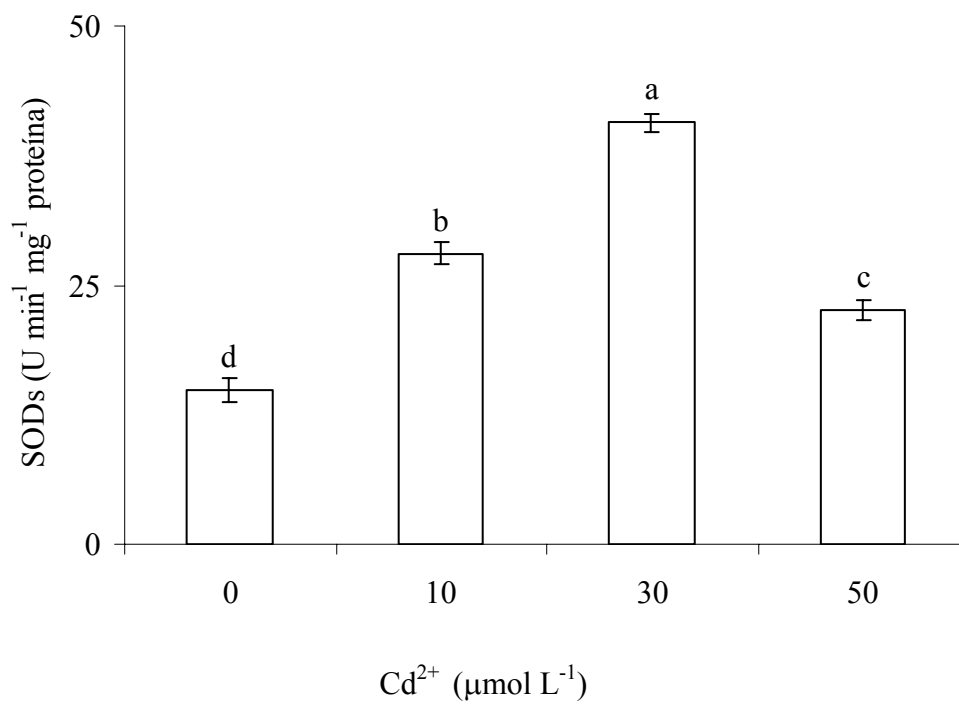


Figura 2.4 - Atividades específicas das POXs (A), SODs (B) em folhas de plantas de tomateiro, cultivados com diferentes concentrações de Cd^{2+}

Observou-se também um incremento significativo na peroxidação de lipídeos nas folhas nas concentrações de 30 e 50 $\mu\text{moles L}^{-1}$ (Figura 2.5). Isto indica a capacidade do cádmio de lesionar membranas celulares, possíveis reflexos na assimilação de carbono e nos parâmetros de fluorescência.

As plantas submetidas a 30 e 50 $\mu\text{moles L}^{-1}$ de cádmio, parecem estar sendo submetidas a uma concentração letal deste elemento. Os parâmetros fisiológicos medidos, como os baixos níveis da assimilação de carbono, os baixos teores de pigmentos, o alto nível de peroxidação de lipídeos e as atividades enzimáticas das SODs e POXs sugerem que estas plantas não suportariam um experimento de maior duração.

Nas plantas estudadas, um dos mecanismos de tolerância aos efeitos deletérios causado pelo cádmio, parece ter sido atividade da enzima SODs que teve aumentos significativos. As plantas entretanto tem outras formas de lidar com este metal, como o imobilizando na parede celular das células das raízes (NISHIZONO, *et al.*, 1989), excluindo-o por meio de agentes quelantes (COSTA *et al.*, 1997), compartimentalizando-o no vacúolo ligados a compostos de, “pequeno”, “médio” e “grande” peso molecular (LMW, MMW e HMV), ou produzindo proteínas de choque (HSP) é descrito que plantas de soja, estressadas por cádmio produzem um mRNA específico ligado à transcrição deste tipo de proteínas de estresse (CZARNECKA *et al.*, 1984; CZARNECKA, *et al.*, 1988).

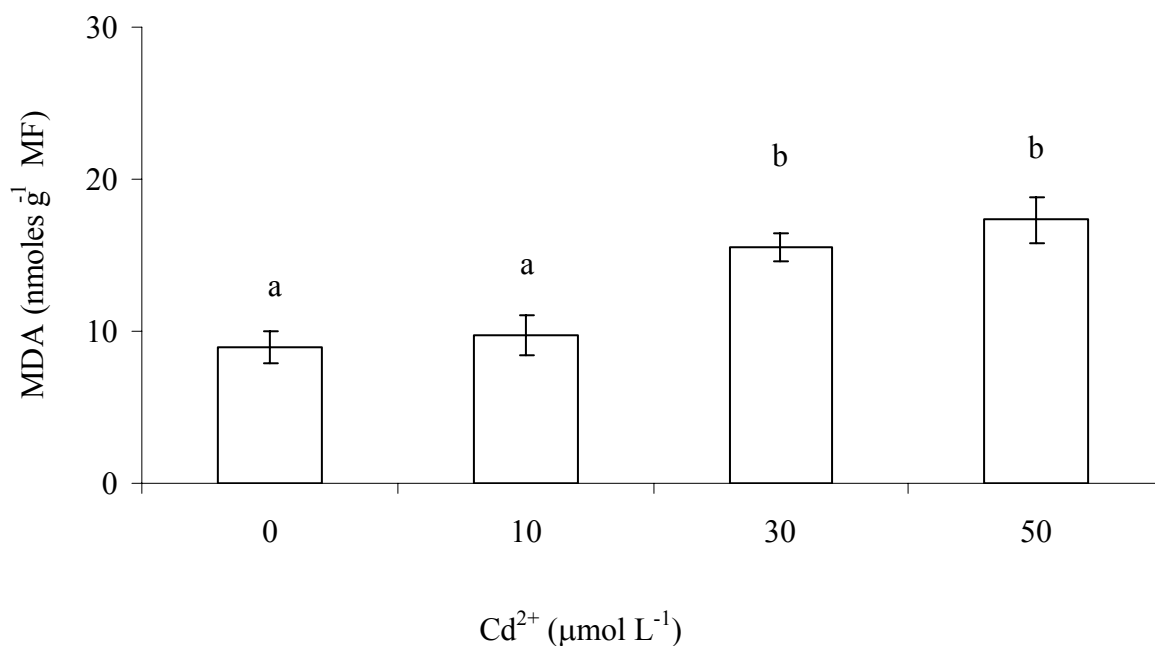


Figura 2.5 - Peroxidação de lipídeos em folhas de tomateiro cultivados em solução nutritiva com diversas concentrações de Cd^{2+}

2.4. CONCLUSÕES

O cádmio acumulou-se significativamente nas raízes e folhas das plantas expostas. Este metal pesado foi capaz de provocar a redução das clorofilas e carotenóides avaliados. Os resultados do teor de clorofila total obtidos pelo uso da extração cetônica e pelo medidor SPAD foram significativos e congruentes tanto na sua variação quanto na sua capacidade de discriminação dos tratamentos avaliados.

Os parâmetros de fluorescência medidos indicam que os fotossistemas foram severamente alterados pelo cádmio. Tanto a eficiência em converter a energia luminosa em energia química, quanto à capacidade de dissipar o excesso de energia na forma de calor nas plantas tratadas foram afetados.

Um forte estresse oxidativo foi promovido, apesar do aumento na atividade das SODs e POXs nas concentrações mais elevadas de cádmio. Este mecanismo protetor não foi suficiente para a manutenção do metabolismo dessas plantas. Nas duas concentrações superiores de cádmio houve aumento significativo na peroxidação de lipídeos, o que indica estar ocorrendo à degradação das membranas celulares.

A combinação do uso de IRGA, fluorômetro, analisador de clorofila SPAD possibilitaram avaliar e mensurar a extensão e gravidade do estresse aplicado.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA, E.; ROMERA, F.J.; CANETE, M.; DE LAGUARDI, M.D. Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe (III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus*, L) plants. *Journal of Experimental Botany*, v.45, p.1893-1898, 1994.
- ALLAN, J.E. The preparation of agricultural samples for analysis by atomic absorption spectrometry. *Varian Techtron, Bulletin*, v.12/69, 115 p, 1969.
- ARNON, D. I. Copper enzyme in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, v.24, p.411-419, 1949.
- BALL, M.C.; BUTTERWORTH J.A.; RODEN, J.S.; CHRISTIAN, R.; EGERTON, J.J.G. Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.22, p.311-319, 1994.
- BARCELÓ, J; POSCHENRIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *Journal Plant Nutrition*, v.13, p.1-37, 1990.
- BARCELÓ, J; POSCHENRIEDER, C.; ANDREU, I.; GUNSE, B. Cadmium induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender). I effects of cadmium on water potential, relative water content and cell wall elasticity. *Journal Plant Physiology*, v.125, p.17-25, 1986.
- BASZYNSKY, T.; WAJDA, L.; KROL, M.; WOLINSKA, D.; KRUPA, Z.; TUKENDORF, A. Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. *Physiologia Plantarum*, v.48, p.365-370, 1980.
- BERTRAND, M.; SCHOEFS, B.; SIFFEL, P.; ROHACEK, K.; MOLNAR, I. Cadmium inhibits epoxidation of diatoxanthin in the xanthophylls cycle of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Federation of European Biochemical Societies*, v.508, p.153-156, 2001.
- BEUACHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable estrous acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v.44, n.1, p.276-287, 1971.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.

- BURTON, K.W.; KING, J.B.; MORGAN, E. Chlorophyll as an indicator of upper critical tissue concentration of cadmium plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, v.27, p.147-154, 1986.
- CHANCE, M; MAEHLY, P. C. The assay of catalase and peroxidases. *In: Gluck, D. (Ed). Methods of biochemical analysis*. New York: Interscience Publishers, 1954.
- CHO, U.; PARK, J.O. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science*, v.156, p.1–9, 2000.
- COSTA, G.; MICHAUT, J.C., GUCKERT, A. Amino acids exuded from axenic roots of lettuce and white lupin seedlings exposed to different cadmium concentrations. *Journal Plant Nutrition*, v.20, p.883-900, 1997.
- CZARNECKA, E.; EDELMAN, L. SCHÖFFI, F.; KEY, J.L. Comparative analysis of physical stress responses in soybean seedlings using cloned heat shocks cDNAs. *Plant Molecular Biology*, v.3, p.45-58, 1988.
- CZARNECKA, E.; NAGAO, T.T; KEY, J.L; GURLEI, W.B. Characterization of *gmhsp26-A*, a stress gene encoding a divergent heat shock protein of soybean: heavy metal induced inhibition of intron processing. *Molecular Cell Biology*, v.8, p.1113-1122, 1984.
- DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution*, v.98, p.29-36, 1997.
- DHINDSA, R. S.; DHINDSA, P.P.; THORPE, T. A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, v.32, n.126, p.93-101, 1981.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v.59, p.309–314, 1977.
- GUPTA, M.; DEVI, S. Cadmium sensitivity inducing structural responses in *Salvinia molesta* Mitchell. *Bulletin Environment Contamination Toxicology*, v.49, p.436-443. 1992.
- HEATH, R. L.; PARKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives Biochemistry Biophysics*, v.125, n.1, p.189-198, 1968.
- HERNANDEZ, L.E.; CARPENA-RUIZ, R.; GARATE, A. Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *Journal of Plant Nutrition*, v.19,

- p.1581-1598, 1996.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station*, (Circular 347), 1950.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidases, and polyphenoloxidases activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, v.57, p.315-319, 1976.
- KOZLOWSKI, T.T. Impacts of air pollution on forest ecosystems. *Bioscience*, v.30, p.210-221, 1980.
- KRUPA, Z. Cadmium induced changes in the composition and structure of light harvesting complex II in radish cotyledons. *Physiologia Plantarum*, v.73, p.518-524, 1988.
- KRUPA, Z.; MONIAK, M. The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity. *Plant Science*, v.138, p.149-156, 1998.
- LARSSON, E.H.; BORNMAN, J.F.; ASP, H. Influence of UV-B radiation and Cd⁺² on chlorophyll fluorescence growth and nutrient content in *Brassica napus*. *Journal of Experimental Botany*, v.49, p.1031-1039, 1998.
- LEE, K.C.; CUNNINGHAM, B.A.; PAULSEN, G.M.; LIANG, G.H.; MOORE, R.B. Effects of cadmium on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings. *Physiologia Plantarum*, v.36, p.4-6, 1976.
- LIU, D; JIANG, W.; WANG, W.; ZHAI, L. Evaluation of metal ion toxicity on root tip cells by the *Allium* test. *Isr. Journal of Plant Science*, v.43, p.125-133, 1995.
- LOUZADA, N.C; SANCHES, N. M.; SCHILINDWEIN, M.N. Bioindicadores de qualidade e de impactos ambientais da atividade agropecuária. *Informe Agropecuário*, v.21, p.72-77, 2000.
- MARKERT, B. Plants as Biomonitors: indicators for heavy metals in the terrestrial environment. Weinheim:Verlagsgesellschaft-VCH, 1993, 1100 pp.
- MAZHOUDI, S.; CHAOUI, A. GHORBAL; M. H., EL-FERJANI, E. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Science*, v.127, p.129-137, 1997.
- MENDELSSOHN, I.A.; MCKEE, K.L.; KONG, T. A comparison of physiological indicators of sub lethal cadmium stress in wetland plants. *Environmental and Experimental Botany*, v.46, p.263-275, 2001.
- MORAL, R.; CORTÉS, A.; GOMEZ, I.; MATAIX-BENEYTO, J. Assessing changes in cd phytoavailability tomato in amended calcareous soils. *Bioresource Technology*,

- v.85, p.63-68, 2002.
- NISHIZONO, H.; KUBOTA, K.; SUZUKU, S.; ISHII, F. Accumulation of heavy metals in cell walls of *Polygonum cuspidatum* roots from metalliferous habitats. *Plant Cell Physiology*, v.30, p.595-598, 1989.
- OLIVEIRA, A. O.; OLIVA, M.A.C.; CAMBRAIA, J. Effects of cadmium on chlorophyll contents and on peroxidase activity in soybean. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.6, n.2, p.97-101, 1994.
- OLIVEIRA, J.A. Acúmulo, distribuição e toxicidade do cádmio em dois cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill). Viçosa: UFV, 1992, 55p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Viçosa, 1992.
- OLIVEIRA, J.A.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M.A.; JORDÃO, C.P. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e salvinia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.13, p.329-341, 2001.
- PADINHA, C.; SANTOS, R.; BROWN M.T. Evaluating environmental contamination in Ria Formosa (Portugal) using stress index of *Spartina maritima*. *Marine Environmental Research*, v.49, p.67-78, 2000.
- PULIDO, P.; FUWA, K.; VALEE, B. Determination of cadmium in biological materials by atomic absorption spectrometry. *Analytical Biochemistry*, v.14, p.303-304, 1966.
- QUARITI, O.; BOUSSAMA, N.O; ZARROUK, M.; CHERIF, A.; GHORBAL, M. H. Cadmium and copper induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry*, v.45, p.1343-1350, 1997.
- RALPH, P. J.; BURCHETT. M. D. Impact of petrochemical on the photosynthesis of *Halophila ovalis* using chlorophyll fluorescence. *Marine Pollution Bulletin*, v.36, p. 429-436, 1998.
- RIVERO, R. M.; RUIZ, J. M.; GARCIA, P. C.; LÓPEZ-LEFEBRE, L. R.; SÁNCHEZ, E.; ROMERO, L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants, *Plant Science*, v.160, p.315-321, 2001.
- RODRIGUEZ-ROSALES, M. P.; KERKEB, L.; BUENO, P.; DONAIRE, J.P. Changes induced by NaCl in lipid content and composition, lipoxygenase, plasma membrane H⁺-ATPase and antioxidant enzyme activities of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) cv.calli. *Plant Science*, v.143, p.143-150, 1999.
- ROGER, M. J. R.; WEISS, O. Fluorescence techniques. In: Roger, M. J. R. (Ed), *Handbook of plant ecophysiology techniques*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer

- Academic Publishers, 2001, p.155-171.
- ROSSI, C.; LIMA, G.P.P. Cádmió e a atividade de peroxidases durante a germinação de sementes de feijoeiro. *Scientia Agricola*, v.58, p.197-199, 2001.
- SHAN, K.; DUBEY, R.S. Effect of cadmium on RNA level as well as activity and molecular forms of ribonuclease in growing rice seedlings. *Plant Physiology Biochemistry*, v.33, p.577-584, 1995.
- SHEORAN, I.S.; AGGAARWAL, N.; SINGH, R. Effects of cadmium and nickel on “*in vivo*” carbon dioxide exchange rate of pigeon pea (*Cajanus cajan*s). *Plant and Soil*, v.129, p.243-249, 1990.
- SIEDLECKA, A.; BASZYNSKY, T. Inhibition of electron flow around photosystem I in chloroplast of cadmium treated maize plants is due to cadmium induced iron deficiency. *Physiologia Plantarum*, v.87, p.199-202, 1993.
- SIEDLECKA, A.; KRUPA, Z. Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology Biochemistry*, v.34, p.833-841, 1996.
- STRASSER R. J.; SRIVASTAVA A.; TSIMILLI-MICHAEL M. The fluorescent transient as a tool estrous characterizes and screens photosynthetic samples. In: Yunus, M.; Pathre, U.; Mohanty, P. (Eds), *Probing photosynthesis mechanisms, regulation and adaptation*. London- New York: Taylor and Francis, 2000.
- TEJELL, J.C.; HANSEN, J.A.A.; CHRISTENSEN, T.H.; HOVMAND, M.F. Prediction of cadmium concentrations in Danish soils. In: Herminte, P.L.; Ott, H. (Eds), *Characterization, treatment and use of sewage sludge*. Dordrecht, The Netherlands: D. Reidel Publ. Co., 1981, p.652-664.
- TUKENDORF, A.; SKÓRZYNSKA-POLIT, E.; BASZYNSKY, T. Homophytochelatin accumulations in Cd treated runner bean plants is related to their growth stage. *Plant Science*, v.129, p.21-28, 1997.
- VINIT-DUNAD, F.; EPRON, D.; ALAOUI-SOSSÉ, B.; BADOT, P. Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. *Plant Science*, v.163, p.53-58, 2002.
- WEIGEL, H. J. The effect of Cd²⁺ on photosynthetic reactions of mesophyll protoplasts. *Physiologia Plantarum*, v.63, p.192-200, 1985.

Capítulo 3

METODOLOGIAS NÃO-INVASIVAS E BIOQUÍMICAS USADAS NA DETECÇÃO DOS EFEITOS FISIOLÓGICOS CAUSADOS POR FLÚOR EM TOMATEIRO

RESUMO

SOUZA, Carlos Lúcio de Lacerda Vasconcelos, M.S, Universidade Federal de Viçosa, março 2003. **Metodologias não-invasivas e bioquímicas usadas na detecção dos efeitos fisiológicos causados por flúor em tomateiro.** Orientador: Marco Antônio Oliva Cano. Conselheiros: Carlos Alberto Martinez y Huaman e José Cambraia.

Plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) com sete dias de idade e cultivadas em solução nutritiva de Hoagland foram expostas às concentrações de flúor de 0, 1, 3 e 5, $\mu\text{g L}^{-1}$, através de chuvas simuladas diárias, com a finalidade de avaliar os danos fisiológicos do flúor por meio de metodologias não-invasivas e a atividade de certas enzimas ligadas a um possível estresse oxidativo, causado pelo estresse primário. Após quatorze dias de exposição ao estresse, foram avaliados, os teores de clorofila, a assimilação de carbono, a condutância estomática, a transpiração, a relação carbono interno/carbono externo, os parâmetros de fluorescência rápida e lenta, a presença do flúor nas plantas, as atividades das enzimas das SODs e POXs e a peroxidação de lipídeos. As plantas dos diversos tratamentos tiveram os teores de flúor presentes nas folhas aumentados significativamente, já os teores de clorofilas *a*, *b* total e carotenóides, a relação clorofila *a/b* não foram alterados. A assimilação de carbono, a relação carbono C_i/C_a , a condutância estomática e a transpiração, não sofreram alterações significativas produzidas pelo agente estressor. Os parâmetros de F_v/F_m , q_p , q_N e a taxa relativa de transporte de elétrons não foram alterados pelo flúor. As atividades das SODs e POXs bem como a peroxidação de lipídeos não tiveram as atividades e valores alterados. As doses de flúor utilizadas não foram capazes de causar alterações no metabolismo das plantas, tais como, danos ao fotossistema II, redução na capacidade dissipar energia em forma de calor, estresse oxidativo ou alterações na assimilação de carbono. A quantidade de flúor usado foi insuficiente para causar injúrias às plantas, o que foi demonstrado pela associação do IRGA, do fluorômetro e do medidor SPAD.

ABSTRACT

SOUZA, Carlos Lúcio de Lacerda Vasconcelos, M.S, Universidade Federal de Viçosa, march 2003. **Non invasive and biochemistries methodologies used the detect of the physiological effects due by fluoride in tomato plants.** Advisor: Marco Antonio Oliva Cano. Committee members: Carlos Alberto Martinez y Huaman e José Cambraia.

Seven days old tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill) were grown in Hoagland solution and daily exposed to fluorine simulated acid rain to evaluated the physiological damages through non invasive methods and activity of enzymes involved on the oxidative stress pathway. 14 days after the exposure to fluorine the plants were screened for chlorophylls content carbon assimilation, stomatal conductance, transpiration, Ci/Ca ratio, fluorescence traits, fluorine content, SODs and POxs activity and lipids peroxidation. The leaves fluorine content increased significantly with the applied doses. The chlorophylls *a*, *b*, total and carotenoids content as well as the chlorophyll *a/b* ratio were not affected. Carbon assimilation, Ci/Ca ratio, stomatal conductance and transpiration did not suffer any significant alteration due to the treatment. Similarly, the F_v/F_m ratio, q_p , q_N , and the electron transport rate were not affected by fluorine. SODs and POXs activity and lipids peroxidation were not altered either. Thus, the applied fluorine doses were not enough to cause any detectable metabolic change, such as, PSII damages, oxidative stress, carbon assimilation shifts, or heat dissipation. These results were consistent with those logged by the non invasive instruments, IRGA, fluorometer, SPAD reader.

3.1 INTRODUÇÃO

O flúor ocorre na natureza principalmente no solo e na atmosfera. Nos solos apresenta-se principalmente nas formas combinadas como fluorita, criolita e apatita. As principais fontes naturais capazes de introduzir quantidades consideráveis de flúor na atmosfera são as atividades vulcânicas, os gêiseres, a poeira em suspensão e a liberação de aerossóis do mar. Diversas atividades humanas como a siderurgia de alumínio e de metais não-ferrosos, a incineração de carvão, a produção de cerâmica, a produção de vidro e a produção de adubos como o superfosfato, tem ajudado a incrementar os teores de flúor dispersos na atmosfera (ARNDT *et al.*, 1995).

Sob a forma de ácido fluorídrico ou de tetrafluoreto de silício, o flúor é um dos mais fitotóxicos de todos os poluentes atmosféricos. A sua fitotoxicidade se dá a níveis muito baixos, aproximadamente $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$, concentração esta cerca de 100 a 1000 vezes menor que a de outros poluentes conhecidos como, o SO_2 , O_3 , NO e o NO_2 . (DARRAL, 1989).

Devido à sua alta reatividade, especialmente na forma de ácido fluorídrico, o flúor se comporta no transporte e na dispersão de forma diferente dos outros poluentes atmosféricos, não sendo transportado a longas distâncias. O flúor tende a se concentrar nas áreas próximas da fonte emissora, sobretudo nas camadas de ar mais próximas ao solo, podendo nestas condições, causar severos danos às plantas. O flúor disperso na atmosfera é absorvido principalmente pelas folhas, quando presente nos solos além de ser pouco absorvido pelas raízes, esta só ocorre em solos muito ácidos ou arenosos, ou quando as quantidades adicionadas de flúor no solo, ultrapassam sua capacidade do solo em imobilizá-lo na forma de compostos insolúveis (ARNDT *et al.*, 1995). Na forma gasosa o flúor penetra no tecido foliar sobretudo através dos estômatos, mas também em menor proporção, pela cutícula e pelas lenticelas (McCUNE & WEINSTEIN, 1971). Uma vez no mesófilo migra através da corrente transpiratória para as áreas de maior transpiração, ou seja, as margens e as extremidades das folhas (GARREC *et al.*, 1977).

O flúor em altas concentrações atmosféricas pontuais, como, por exemplo às encontradas nas emissões vulcânicas, provoca lesões necróticas nas folhas, que posteriormente evoluem para uma desestruturação estrutural e metabólica dos tecidos adjacentes. Em baixas concentrações combinadas com prolongados tempos de exposição,

promovem na diminuição do metabolismo e clorose nos tecidos foliares (McCUNE & WEINSTEIN, 1971; WEINSTEIN, 1977).

A forma não-iônica do flúor, atravessa mais facilmente a membrana plasmática, acumulando-se principalmente nos cloroplastos na forma de fluoreto (MILLER, 1993). O flúor então é capaz de reduzir a fotossíntese pela inibição da enzima RUBISCO, pela competição com CO₂ (PARRY, *et al.* 1983) e pela redução do transporte de elétrons entre os fotossistemas (GIANNINI *et al.*, 1985). A respiração, também é reduzida, pela inibição de várias enzimas envolvidas nesse processo (MILLER & MILLER, 1974).

Os métodos para a quantificação do flúor presente na atmosfera são bastante variáveis. Na Alemanha é utilizado o método descontínuo das esferas de prata, enquanto que nos EUA não existem métodos e/ou valores limites padronizados, tendo cada Estado a responsabilidade pelo estabelecimento das suas normas, o método de quantificação mais comum é o do tubo revestido de bicarbonato (WEINSTEIN & MANDAL, 1971, ARNDT *et al.*, 1995). Atualmente, a utilização de bioindicadores tem aumentado na América do Norte e na Europa, sendo esta uma forma segura de avaliar parâmetros ecológicos afetados pelo flúor. Os bioindicadores de regiões temperadas, contudo nem sempre apresentam resultados satisfatórios quando empregados em regiões tropicais. Muitos são os fatores, que contribuem para isso, como condições edáficas, climáticas e ecológicas diferentes que, agindo agonicamente ou antagonisticamente, alteram as respostas dos organismos bioindicadores.

Uma das formas de avaliar como os seres vivos se comportam quando expostos a níveis tóxicos de certas substâncias, é monitorando-se algumas de suas funções mais metabólicas importantes. Além das técnicas tradicionais, têm sido sugeridas técnicas não-invasivas (pelo uso de IRGAS e fluorômetros), que avaliam os efeitos dos estresses sem causar ou causando poucos danos ao organismo indicador. Essas técnicas produzem resultados mais rápidos que as metodologias invasivas, podendo, com certa margem de segurança, apontar alterações metabólicas importantes, antes que estas gerem danos visuais (MARKERT, 1993; BALL *et al.*, 1994; RALPH & BURCHETT, 1998; STRASSER *et al.*, 2000; MENDELSSOHN *et al.*, 2001; ROGER & WEISS, 2001).

Vários estudos foram realizados anteriormente na Universidade Federal de Viçosa (UFV), abordando os efeitos fisiológicos e morfológicos do flúor em plantas cultivadas e nativas. Nestes experimentos foram observadas reduções nos teores de clorofila, na atividade enzimática das peroxidases, nos níveis de fenóis, aparecimento de lesões nos

tecidos foliares, alterações nos parâmetros ligados à assimilação de carbono em gramíneas (FIGUEIREDO *et al.* 1997, BUSTAMANTE, 1993; CHAVES, 1997; HARA, 2000; SILVA *et al.*, 2000; DIVAN, 2002).

Algumas destas alterações metabólicas provocadas pelo flúor podem ser monitoradas com a utilização de aparelhos portáteis como os analisadores de gás no infravermelho (IRGAS), fluorômetros e medidores de índice SPAD. Os parâmetros fisiológicos obtidos por estes aparelhos, em conjunto ou não, são sugeridos como bons indicadores de estresse em plantas, tanto terrestres quanto aquáticas, superiores ou não. Os parâmetros mais usados nestas avaliações são as medidas de fluorescência rápida e lenta da clorofila como a relação fluorescência variável/fluorescência máxima (F_v/F_m), a dissipação fotoquímica (q_p) e a dissipação não fotoquímica (q_N), a taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), a assimilação de CO_2 (A), a condutância estomática (g_s) e a transpiração (E). (KRUPA & MONIAK, 1998; RALPH & BURCHETT, 1998; PADINHA *et al.*, 2000; MENDELSSOHN, 2001). Estes parâmetros porém podem ser sub-avaliados, se a planta examinada, possuir mecanismos que atenuem os efeitos deletérios do estresse aplicado. Um destes mecanismos, envolve o aumento da atividade das enzimas ligadas ao estresse oxidativo, que possuem a capacidade de mitigar o efeito do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, geradas pela exposição ao agente causador de estresse.

Uma combinação da análise de diversos parâmetros fisiológicos não invasivos, de uma planta de crescimento rápido seguida de uma criteriosa avaliação das modificações nas alterações no seu metabolismo, podem constituir uma ferramenta útil, para se avaliar os efeitos de um poluente como flúor, revelando assim danos latentes à fisiologia, que acabariam por afetar seu crescimento e desenvolvimento.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e variáveis medidas

O ensaio foi realizado em casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa, localizada a 20° 45' S e 42° 51' W, no estado de Minas Gerais, Brasil, durante os meses de novembro e dezembro de 2002.

Sementes de tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill (cv. Santa Clara 5600 VF, da empresa Agroflora/Sakata), foram colocadas para germinar em bandejas com areia lavada e esterilizada, em câmara de germinação tipo BOD, com condições ambientais controladas, por cerca de sete dias. Nesse período, as plântulas foram submetidas a 16 horas de luz (250 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 8 horas de escuro e sob temperatura média de 30°C.

Quando as plântulas alcançaram, aproximadamente, 10 cm de altura e duas folhas expandidas, foram transferidas para recipientes de isopor, recobertos com sacos de polietileno, contendo 2,0 litros de solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON, 1950), com pH $6,0 \pm 0,1$, com metade da força iônica e arejada constantemente. Após três dias, as plântulas foram transferidas para uma solução nutritiva de composição igual mas com força iônica total.

A partir do 7º dia de cultivo, o flúor foi aplicado na forma de chuvas simuladas diárias, com duração de 15 minutos, em uma câmara de simulação de chuva construída e adaptada segundo o modelo proposto por EVANS *et al.*, (1977). As plantas eram colocadas 15 minutos antes do início do tratamento e permaneciam na câmara com a iluminação ligada por outros 15 minutos após o término da chuva simulada. As concentrações de KF na chuva simulada foram de 0, 1, 3 e 5 mg L⁻¹.

No 14º dia, após o início da aplicação do estresse, o experimento foi encerrado, sendo neste dia medidas, as variáveis fotossintéticas e de fluorescência rápida e lenta, coletadas amostras de folhas para determinação de clorofila e o resto do material congelado para a determinação posterior das atividades enzimáticas e da peroxidação de lipídeos e teor flúor nos tecidos.

A taxa fotossintética líquida (A), a condutância estomática (g_s), a transpiração (E) e a concentração interna de CO₂ (C_i) foram medidas nas duas primeiras folhas totalmente expandidas de todas as plantas, com um analisador de gases no infravermelho (LCI 6400,

LI-Cor Inc, Lincoln, Nebraska, USA). As medições foram realizadas entre as 8:00 e 11:30h da manhã sob uma intensidade luminosa de $1000 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 25°C . Nas mesmas folhas foram medidas, a relação F_v/F_m , a dissipação fotoquímica (q_p), e a dissipação não fotoquímica (q_n) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) utilizando um analisador de rendimento fotossintético Walz (Mini PAM, Heinz Walz, Effeltrich, GmbH).

Os teores de clorofila total foram determinados, *in vivo* mediante o uso de um aparelho portátil SPAD (SPAD-502 Minolta Chlorophyll Meter, Minolta, Japão) e espectrofotometricamente, *in vitro*, pelo método de ARNON (1949). Neste caso foram obtidos extratos cetônicos, nos quais foram determinados os teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides.

3.2.2 Determinação do flúor presente nas folhas

Folhas completamente expandidas foram lavadas com uma solução de HCl 0,1M e lauril sulfato de sódio a 0,02%, durante 30 segundos, enxaguadas em água deionizada para a remoção do flúor particulado depositado (MITCHELL, 1986), acondicionadas em sacos de papel e submetidas à secagem em uma estufa de circulação forçada a 75°C até que as amostras atingissem peso constante. O material seco foi moído em um moinho do tipo Willey, as amostras foram digeridas e analisadas para se obter o teor de flúor, utilizando um eletrodo seletivo (EA 920, Orion Research, Boston, MA, USA) de acordo com o método proposto por GARCÍA-CIUDAD *et al.*, (1985).

3.2.3 Determinação da atividade enzimática

3.2.3.1 Obtenção do extrato enzimático

Trezentas miligramas de tecidos foliares congelados foram triturados na presença de nitrogênio líquido e, então, homogeneizados com 10 mL de uma solução de extratora constituída de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,8. O homogeneizado, filtrado através de 8 camadas de gaze foi centrifugado a $13.000 \times g$ por 15 min. O sobrenadante obtido foi utilizado nos ensaios enzimáticos. Todas as operações, utensílios e reagentes foram mantidos em temperatura entre 0 a 4°C .

A dosagem de proteínas no extrato enzimático bruto foi feita pelo método de BRADFORD (1976).

3.2.3.2 Peroxidases (POX,s 1.11.1.7)

A atividade das peroxidases foi determinada segundo o método proposto por KAR & MISHRA (1976), que consiste adição de uma alíquota de 100 μL de extrato enzimático bruto a um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H_2O_2 20mM. A absorvância a 420 nm foi monitorada durante dois minutos e atividade das peroxidases calculada pela inclinação da reta e expressa em μmoles de purpurugalina formada por minuto por mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1}$ (CHANCE & MAEHLEY, 1954).

Um branco foi conduzido paralelamente utilizando-se meio de reação e uma alíquota de 100 μL do meio de extração.

3.2.4.2 Dismutases do superóxido (SODs, EC 1.15.1)

A atividade das superóxidos dismutases foi determinada adicionando-se 50 μL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de um meio de reação, constituído de metionina 13 mM, azul de *p*-nitrotetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 100 nM e riboflavina 2 μM em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8. A reação, iniciada colocando-se os tubos em uma caixa com tampa perfurada e revestida por um filme do alumínio, dotada de uma lâmpada fluorescente de 25 W, foi paralisada após 15 minutos com o desligamento da lâmpada (GIANNOPOLITIS & RIES, 1977). A formazana azul resultante da fotorredução do NBT foi medida pelo incremento da absorvância a 560 nm. Um branco foi obtido mantendo-se o meio de reação no escuro. Uma unidade das SODs foi definida como a quantidade de enzimas necessária para inibir 50% a fotorredução do NBT (BEUACHAMP & FRIDOVICH, 1971).

3.2.5 Determinação do complexo MDA-TBA

A determinação da quantidade de malonaldeído (MDA) formado foi realizada segundo o método proposto por DHINDSA *et al.*, (1981).

Trezentas miligramas de tecidos foliares foram trituradas na presença de nitrogênio líquido, então se adicionou 5 mL de ácido tricloroacético a 0,1%. O homogeneizado foi filtrado através 8 camadas de gaze e centrifugado a 10.000 xg por 5 min. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi adicionada a 4 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% em ácido tricloroacético 20% e a mistura colocada em banho-maria a 90° C por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram retirados, imersos em banho de gelo e centrifugados a 10.000 xg por 10 min e as absorvâncias dos sobrenadantes lidas a 532 nm e a 600nm (absorvância não-específica). A quantidade do complexo MDA-TBA, foi calculada utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (HEATH & PACKER, 1968).

3.2.5 Análise estatística

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado: um cultivar de tomateiro e quatro concentrações de flúor 0, 1, 3 e 5 mg L⁻¹ com cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância com um $\alpha= 5\%$ e quando os valores de F foram significativos, uma comparação de médias foi realizada, utilizando-se para isso o teste de Tukey, com 5% de probabilidade.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas submetidas a concentrações de 1, 3 e 5 mg F⁻ L⁻¹ não apresentaram injúrias significativas nas folhas, causadas pela aplicação de chuvas simuladas contendo flúor. Não foram observadas queimaduras, necroses ou cloroses nos tecidos foliares das plantas dos tratamentos de 1 e 3 mg L⁻¹ que são normalmente observadas em plantas expostas ao flúor (SUN & SU, 1985). Apenas no tratamento de 5 mg F⁻ L⁻¹ foram observados pequenas áreas cloróticas nas bordas e ápices das folhas, contudo o tamanho e o número destas lesões foram considerados insignificantes se comparados à área total da folha.

As plantas de tomateiro expostas ao flúor o absorveram, em quantidades razoáveis, sendo significante entre os tratamentos (Figura 3.1).

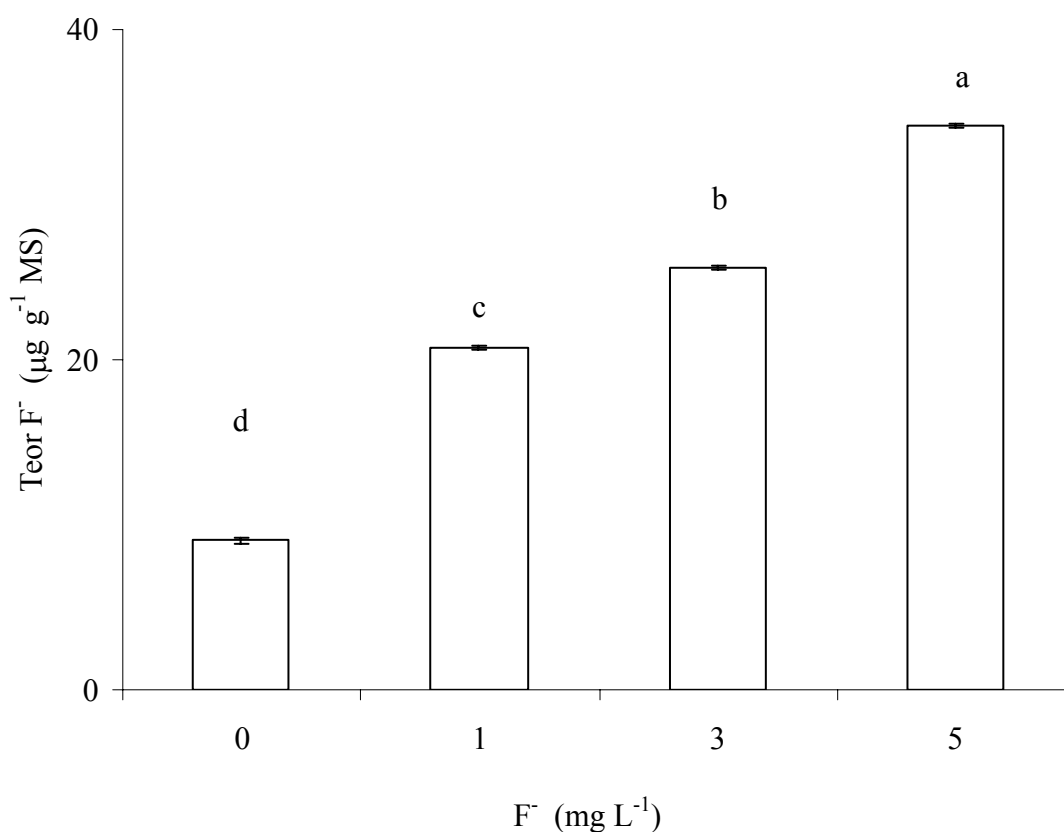


Figura 3.1 - Teores de Flúor em folhas de tomateiro, submetidos a chuvas simuladas com diversas concentrações de F⁻

Os teores de clorofilas *a*, *b*, total, relação clorofila *a/b* e carotenóides (Quadro 3.1) não foram alterados significativamente pelas concentrações de flúor empregadas. DOLEY, (1988) descreve a ação do flúor provocando diminuição nos teores de pigmentos e conseqüentemente na taxa fotossintética.

Quadro 3.1 - Teores de clorofila e carotenóides em extrato cetônico em folhas de tomateiro, exposto a chuvas simuladas com diversas concentrações de F⁻

Flúor (mg L ⁻¹)	Clorofila <i>a</i> (µg g ⁻¹ MF)	Clorofila <i>b</i> (µg g ⁻¹ MF)	Carotenóides (µg g ⁻¹ MF)	Clorofila <i>a/b</i>
0	1,23 ± 0,03 ns ¹	0,46 ± 0,02 ns	186 ± 4,05 ns	2,64 ± 0,06 ns
10	1,25 ± 0,03 ns	0,47 ± 0,02 ns	198 ± 6,32 ns	2,69 ± 0,07 ns
30	1,23 ± 0,02 ns	0,46 ± 0,02 ns	178 ± 4,47 ns	2,70 ± 0,05 ns
50	1,22 ± 0,04 ns	0,44 ± 0,01 ns	207 ± 3,77ns	2,81 ± 0,03 ns

¹Não significativo para P<0,05

O teor de clorofila total estimado pelo emprego do medidor SPAD não foram afetados significativamente pelo flúor, a semelhança dos resultados obtidos pelo uso de extração cetônica (Quadro 3.2). Nenhum dos métodos utilizados discriminou os efeitos sobre os pigmentos totais, das diversas concentrações de flúor aplicadas.

Quadro 3.2 - Teores de clorofila total em extrato cetônico e em folhas intactas determinado pelo medidor de clorofila SPAD, em folhas de tomateiro, exposto a chuvas simuladas com diversas concentrações de F⁻

Flúor (mg L ⁻¹)	Clorofila total (µg g ⁻¹ MF)	Clorofila total (unidades SPAD)
0	1,69 ± 0,03 ns ¹	38 ± 0,58 ns
1	1,72 ± 0,04 ns	38 ± 0,86 ns
3	1,69 ± 0,02 ns	39 ± 0,56 ns
5	1,66 ± 0,05 ns	39 ± 0,59 ns

¹ Não significativo para P<0,05

Resultados semelhantes as estes foram obtidos por BUSTAMANTE, (1993), com alguns dos cultivares de soja, em concentrações de flúor semelhantes às utilizadas neste ensaio. WEINSTEIN, (1961) e ARNDT, (1970), também relatam que pouca ou nenhuma alteração no conteúdo de clorofilas, totais, *a*, *b* e relação *a/b*, foi detectada, em plantas de *Avena sativa*, *Hordeum sativum* e *Secale cereale*, expostas aos tratamentos com concentrações de até 10 mg F⁻¹ L⁻¹.

A análise de regressão (Figura 3.1), indica que existe uma forte congruência entre os resultados obtidos pelo método da extração cetônico e o medidor SPAD. Neste ensaio na clorofila total avaliada pelo medidor SPAD (Quadro 3.2), apresentou a mesma tendência de variação daquela indicada pela extração cetônica, o que sugere que este aparelho, seja uma forma razoavelmente segura, rápida e não-invasiva, para se avaliar o teor de clorofila total em plantas.

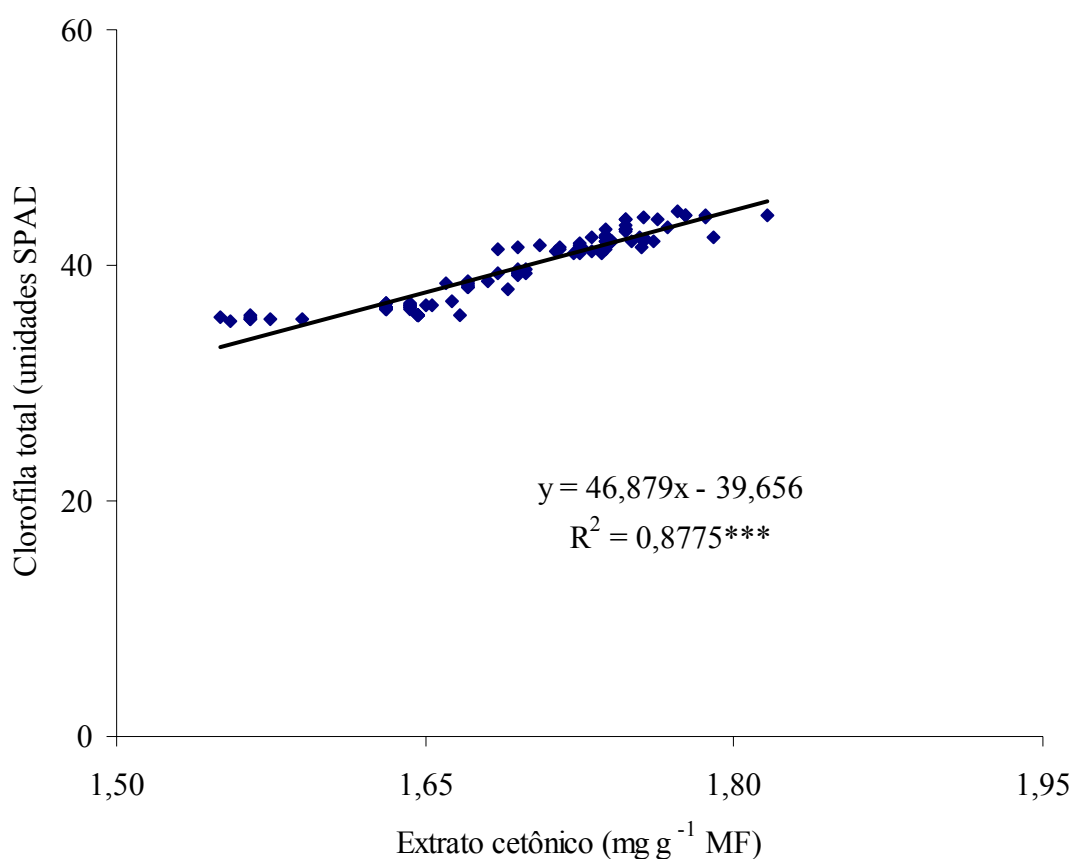


Figura 3.2 Gráfico da análise de regressão entre os valores de clorofila total obtidos pelo medidor SPAD e extrato cetônico. ***Nível de significância $P > 0,001$.

A assimilação de carbono (A) (Figura 3.3A), não sofreu modificações significativas entre os tratamentos, apesar do descrito por MILLER, (1993) que o cloroplasto é o sítio de acúmulo do fluoreto nas células vegetais, onde certamente influirá no processo fotossintético. BENNETT & HILL (1973), HORVARTH *et al.*, (1978) relatam uma tendência de recuperação da taxa fotossintética em *Vicia faba*, 24 horas após o final da aplicação do estresse, sugerindo que algumas plantas possuem a capacidade de recuperar rapidamente dos danos causados pelo acúmulo de flúor nos cloroplastos. Isto poderia explicar não diferença dos valores de A , já que entre a última aplicação de flúor via chuva simulada e as medições houve um espaço de tempo de cerca de 24 horas. Outra hipótese, que ajudaria a explicar este fato, seria que se a planta exposta fosse cultivada em uma alta disponibilidade de nutrientes, sem restrição de água, de luminosidade possuísse uma taxa de crescimento elevada e uma certa tolerância ao flúor, poderia ter condições de recuperar rapidamente a sua taxa fotossintética

A condutância estomática (g_s) (Figura 3.3B) não foi afetada significativamente pelo flúor, este fato já havia sido descrito em plantas de *Panicum maximum* e *Chloris gayana* por DIVAN, (2002). A exemplo da g_s a transpiração (E) (Figura 3.3D), e a razão concentração interna de CO_2 / concentração externa de CO_2 (C_i/C_a) (Figura 3.3C) não foram alteradas significativamente pela exposição ao flúor.

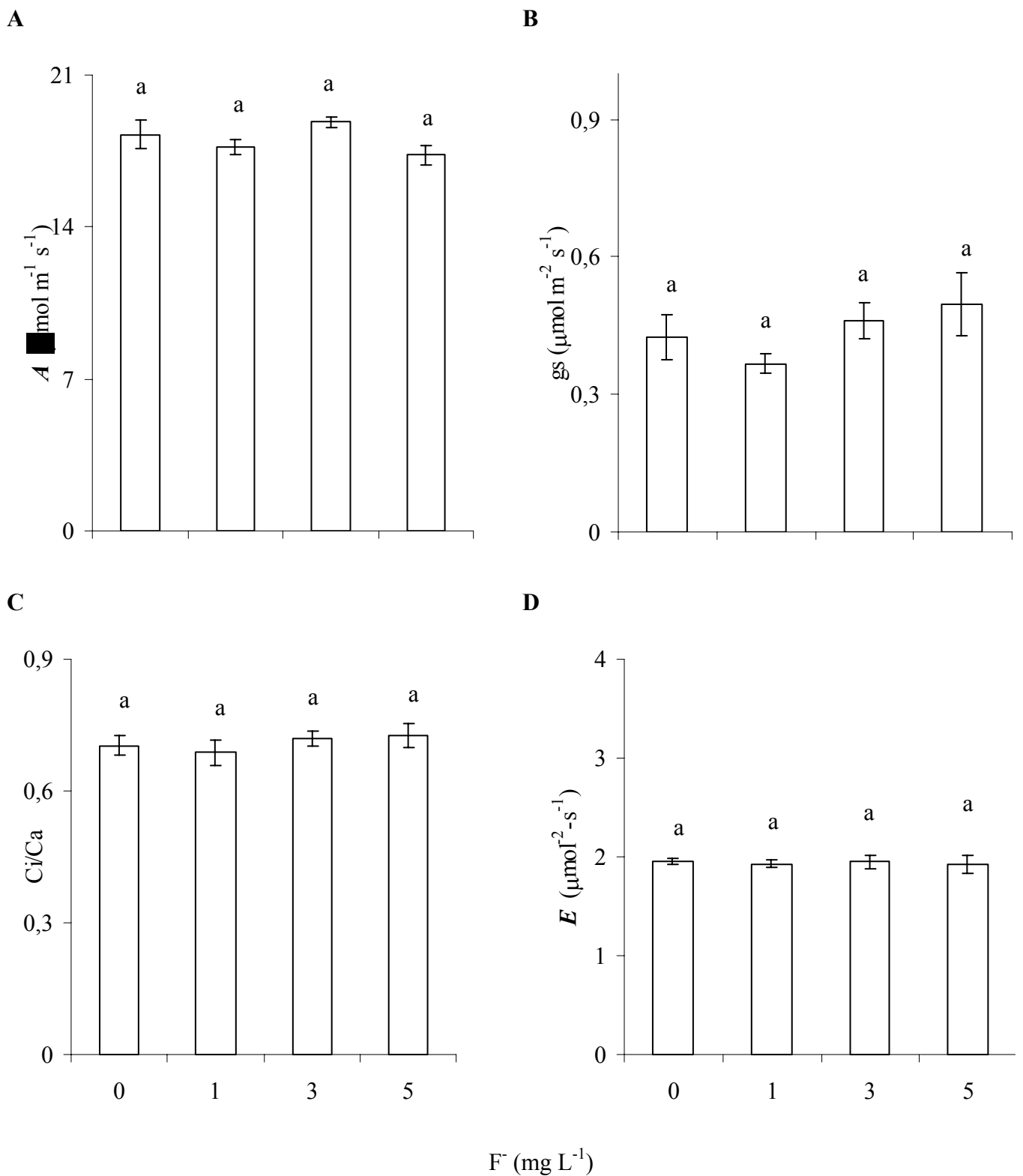


Figura 3.3 - Taxa fotossintética (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), relação carbono interno carbono externo (C_i/C_a) (C), transpiração (E) (D), em plantas de tomateiro, submetidas a chuvas simuladas com diversas concentrações de F^-

A relação F_v/F_m (Quadro 3.4) não sofreu alterações significativas, isto permite inferir que o fotossistema II não foi afetado, não tendo assim sua eficiência reduzida. Os parâmetros de fluorescência lenta, taxa de transporte de elétrons (ETR), a dissipação fotoquímica (q_p) e a dissipação não fotoquímica (q_N) (Quadro 3.4) não sofreram alterações significativas, apesar de estudos com cloroplastos isolados mostrarem uma relação entre o aumento da fluorescência emitida e o flúor presente no meio (BOESE, *et al.*, 1995).

Quadro 3.4 - Valores de F_v/F_m , ETR, q_p e q_N em folhas de plantas de tomateiro, submetidas a chuvas simuladas com diversas concentrações de F^-

Flúor (mg L ⁻¹)	F_v/F_m	ETR	q_p	q_N
0	0,81 ± 0,01 ns ¹	88,6 ± 3,05 ns	0,727 ± 0,010 ns	0,478 ± 0,022 ns
1	0,81 ± 0,02 ns	90,1 ± 2,23 ns	0,718 ± 0,011 ns	0,489 ± 0,018 ns
3	0,80 ± 0,01 ns	89,20 ± 1,31 ns	0,713 ± 0,009 ns	0,491 ± 0,015 ns
5	0,81 ± 0,01 ns	87,5 ± 2,33 ns	0,710 ± 0,012 ns	0,511 ± 0,020 ns

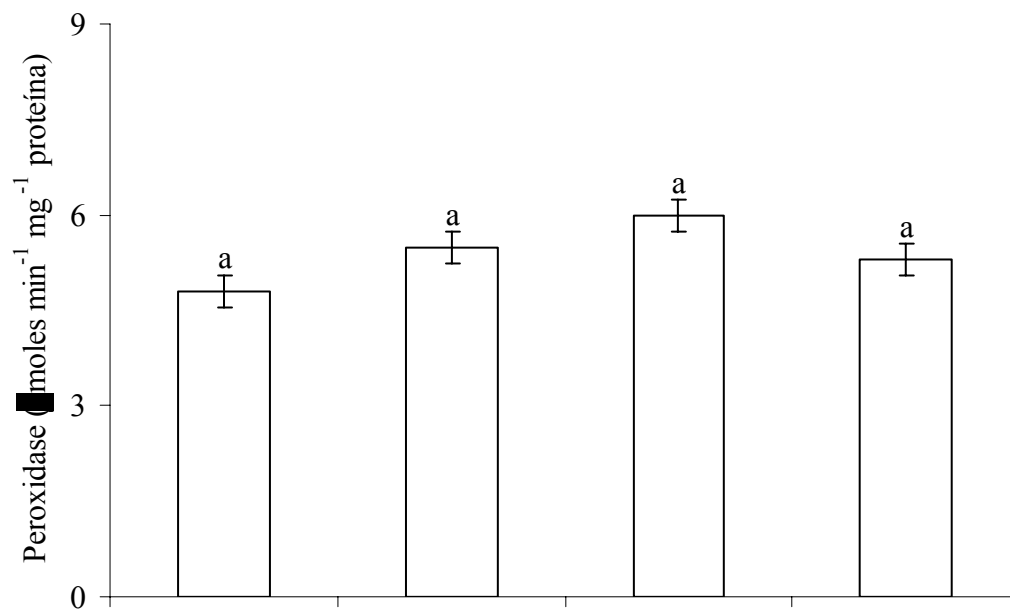
¹Não significativo para $P < 0,05$

Não houve uma redução significativa nos valores observados de ETR apesar de descrito na literatura, uma diminuição no transporte de elétrons em tilacóides capazes de conduzir fotofosforilação quando estes foram expostos a concentrações de 10 μ moles de NaF (GIANNINI *et al.*, al 1985).

Em cloroplastos isolados, é descrito que concentrações moderadas de flúor tem a capacidade de inibir a fotossíntese em altas irradiâncias, mas possuem pouco ou nenhum efeito sob baixas irradiâncias (QUICK *et al.*, 1989). Como os tomateiros deste experimento foram cultivados em uma casa de vegetação, que possui um teto de vidro combinado com os baixos teores de flúor fornecidos pela chuva, ter-se-ia aí uma explicação para a não diferença significativa dos parâmetros de fluorescência rápida e lenta.

Apesar do flúor ser um potente agente estressor ele não foi capaz, nas concentrações utilizadas, de promover estresses oxidativos relevantes, que pudessem ser detectados pelas atividades enzimáticas quantificadas (Figuras 3.4A e 3.4B). Apesar da atividade das peroxidases (POXs) terem sido propostas por KELLER (1982) como sendo um bom indicador das reações das plantas a fluoretos atmosféricos, este parâmetro indicador não foi alterado.

A



B

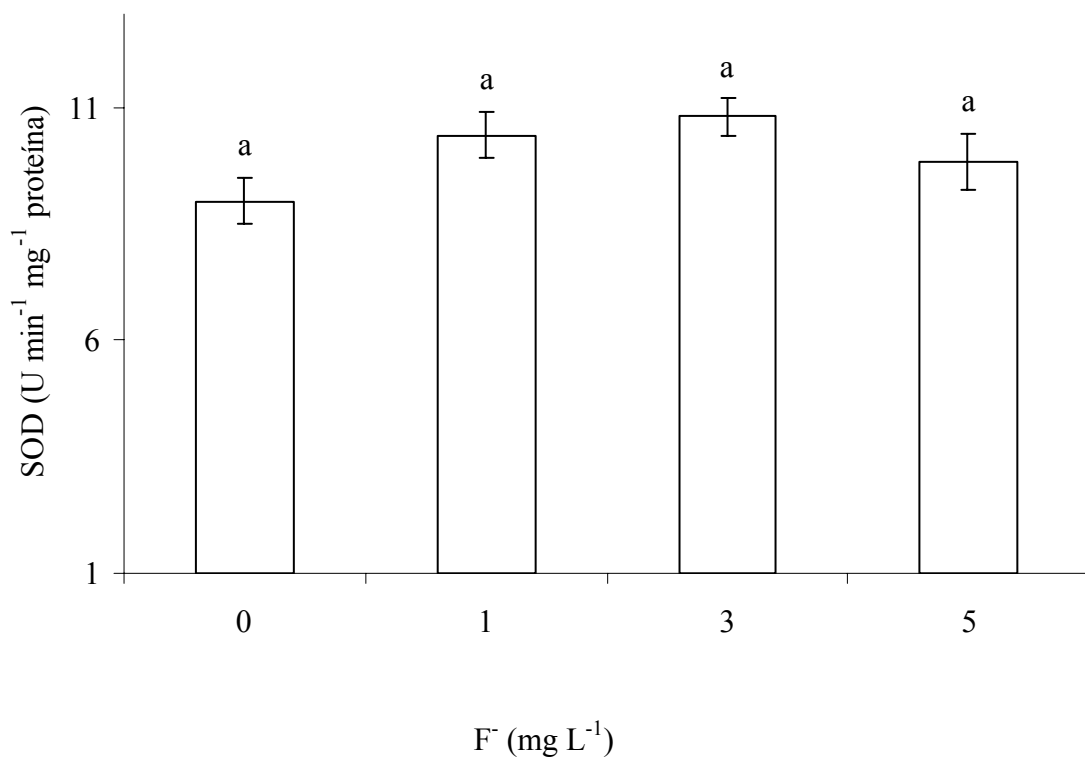


Figura 3.4 - Atividades específicas das POXs (A), SODs (B) em folhas de tomateiro expostas a chuvas simuladas com diversas concentrações de F⁻

A peroxidação de lipídeos, medida pelo acúmulo de MDA, não sofreu alterações significativas causadas pela exposição a concentrações crescentes de fluoreto presentes nas chuvas simuladas (Figura 3.5).

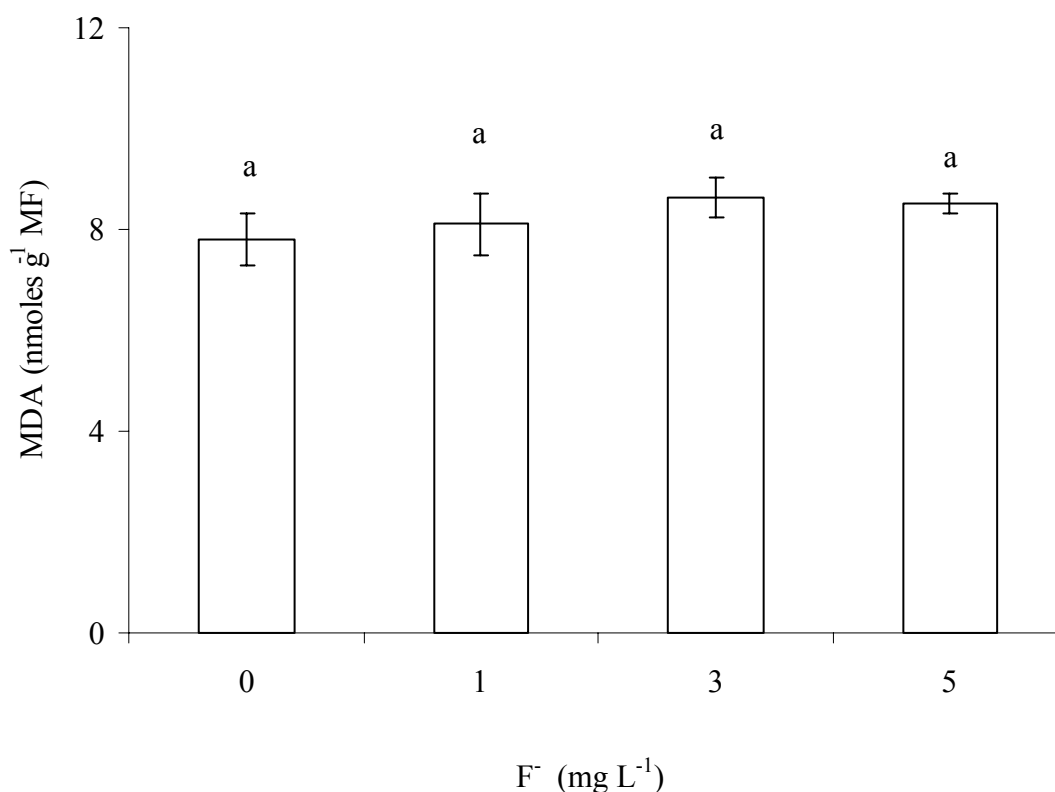


Figura 3.5 – Peroxidação de lipídeos em folhas de tomateiro expostas a chuvas simuladas com diversas concentrações de F⁻

Apesar do flúor estar presente no tecido vegetal, as quantidades encontradas não foram capazes de promover alterações perceptíveis no metabolismo das plantas durante o decorrer deste experimento. ARNDT, *et al.*, (1995), correlaciona plantas, teores de flúor na matéria seca ($\mu\text{g g}^{-1}$) e lesões ocasionadas em diversas espécies de plantas como, *Crisum sp* $113 \mu\text{g g}^{-1}$, *Canna indica* $216 \mu\text{g g}^{-1}$, *Baccharis articulata* $71 \mu\text{g g}^{-1}$, *Agapanthus sp* $98 \mu\text{g g}^{-1}$. Segundo VDI-RITHTLINIE 2310, (1989), o teor de flúor na matéria seca, capaz de causar danos à espécies sensíveis como o *Lolium multiflorum ssp. italicum* em culturas padronizadas é de $30 \mu\text{g g}^{-1}$, valor próximo aos $34 \mu\text{g g}^{-1}$ obtidos nas folhas das plantas submetidas às chuvas com concentração de 5mg L^{-1} .

Segundo ARNDT, *et al.*, (1995) um dos fatores ligados à resistência ao flúor é o estado nutricional no qual as plantas se encontram. Os tomateiros utilizados no experimento foram cultivados sem nenhuma restrição nutricional ou hídrica. A formação de fluoreto de cálcio um composto insolúvel no meio intracelular pode ser um meio de desintoxicação do flúor. Outros íons como o Mn, Zn e Mg também são capazes de formar compostos insolúveis com flúor. O tomateiro é uma planta extremamente rica em cálcio (ALVARENGA, 2000), aliada a alta disponibilidade de nutrientes fornecida pelo cultivo hidropônico, a imobilização do flúor na forma de fluoreto de cálcio, e a conseqüente diminuição dos efeitos fitotóxicos, pode ser sugerida como um dos meios de desintoxicação das plantas de tomateiro utilizadas neste ensaio (GARREC *et al.*, 1977; WEINSTEIN & ALSCHER-HERMANN, 1983; GARREC, 1983).

GUDERIAN, *et al.*, 1969, chama atenção para diluição do teor de flúor na plantas, causado pelo crescimento e conseqüente ganho de massa. As plantas utilizadas e cultivadas em solução nutritiva tinham um crescimento extremamente acelerado, isto aliado à curta duração do experimento, poderia ajudar a explicar o não aparecimento de alterações metabólicas perceptíveis.

Trabalhos anteriores desenvolvidos na Universidade Federal de Viçosa, utilizaram concentrações bem superiores às encontradas naturalmente que estão em torno de 1 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (BARNARD & NORDSTROM, 1982), na preparação da chuva simulada, CHAVES, (1997) e FIGUEIREDO, (1997), utilizaram concentrações de 0,0 a 16 mg L^{-1} , SILVA *et al.*, (2000) 30 mg L^{-1} , HARA, (2000) 15 mg L^{-1} e BUSTAMANTE, (1993) utilizou concentrações de 0,0 a 10 mg L^{-1} em plantas de soja, alguns dos cultivares testados não apresentaram injúrias nas doses inferiores a 5 mg L^{-1} .

ARNDT, 1995 classifica outras plantas da mesma família do tomateiro, como *Solanum tuberosum* e *Nicotiana tabacum* como sendo tolerantes ao flúor.

3.4 CONCLUSÕES

Apesar da presença do flúor nos tecidos das plantas utilizadas no ensaio, as quantidades usadas, combinadas com a forma de cultivo e metabolismo da espécie, não foram suficientes para alterar significativamente os parâmetros fisiológicos avaliados.

As concentrações de flúor aplicadas por meio da chuva simulada não foram capazes de causar alterações perceptíveis nos teores de clorofila, na assimilação de carbono, na condutância estomática, na transpiração e na relação C_i/C_a .

As doses de flúor aplicados não foram suficientes para causar danos ao fotossistema II, permanecendo assim os parâmetros de fluorescência rápida e lenta inalterados.

As atividades das enzimas SODs e POXs não se alteram, o que indica que nas doses usadas, o flúor não foi capaz de promover um estresse oxidativo significativo. Nas concentrações utilizadas o flúor não foi capaz de causar danos expressivos às membranas celulares, como os avaliados pela formação de malonaldeído.

A quantidade de flúor usado foi insuficiente para causar injúrias às plantas, o que foi demonstrado pela associação do IRGA, do fluorômetro e do medidor SPAD, sendo estes efeitos reforçados pela não alteração das atividades enzimáticas avaliadas.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNDT, U.; FLORES, F.; WEINSTEIN, L. Efeitos do flúor sobre as plantas: Diagnose de danos na vegetação do Brasil. Porto Alegre: UFRGS, 1995, 155pp.
- ARNDT, V. Konzentrationsänderungen bei freien Aminosäuren in Pflanzen unter dem Einfluss von Fluorwasserstoff und Schwefeldioxid. *Staub-Reinhalte Luft*, v.36, p.256-259, 1970.
- ARNON, D. I. Copper enzyme in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, v.24, p.411, 1949.
- ALVARENGA, L. A. A cultura do tomateiro. Série cadernos didáticos. Lavras: FAEPE-UFLA, 2000, 48pp.
- BALL, M.C.; BUTTERWORTH J.A.; RODEN, J.S.; CHRISTIAN, R.; EGERTON, J.J.G. Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.22, p.311-319, 1994.
- BARNARD, W. R.; NORDSTROM, D. K. Fluoride in precipitation. I methodology with the fluoride-selective electrode. *Atmospheric Environment*, v.16, p.99-103, 1982.
- BENNET, J.H; HILL, A.C. Inhibition of apparent photosynthesis by air pollution. *Journal Environmental Quality*, v.2, p.526-530, 1973.
- BEUACHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable estrous acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v.44, n.1, p.276-287, 1971.
- BOESE, S. R.; MACLEAN, D. C.; EL-MOGAZI, D. Effects of fluoride on chlorophyll fluorescence in spinach. *Environmental Pollution*, v.89, p.203-208, 1995.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- BUSTAMANTE, M.; OLIVA, M. A.; SANT'ANNA, R.; LOPES, N. F. Sensibilidade da soja ao flúor. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.5, p.151-157, 1993.
- CHANCE, M; MAEHLY, P. C. The assay of catalase and peroxidases. In: Gluck, D. (Ed). *Methods of biochemical analysis*. New York: Interscience Publishers, 1954.
- CHAVES, A. L. F. Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (Colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (Capim-Rodes)-

- Poaceae. Viçosa: UFV, 1997, 579p. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- DARRALL, N. M. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant Cell Environment*, v.12, p.1-30, 1989.
- DHINDSA, R. S.; DHINDSA, P.P.; THORPE, T. A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, v.32, n.126, p.93-101, 1981.
- DIVAN, A. M. Jr. Impactos das emissões de flúor em Ouro Preto, MG, avaliados mediante bioindicadores vegetais ativos e passivos. Viçosa: UFV, 2002, 80p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- DOLEY, D. Fluoride-induced enhancement and inhibition of photosynthesis in four taxa of *Pinus*. *New Phytology*, v.110, p.21-31, 1988.
- EVANS, L. S.; GMUR, N.F.; DA COSTA, F. Leaf surface and histological perturbations of leaves of *Phaseolus vulgaris* and *Helianthus annuus* after exposure to simulated acid rain. *American Journal of Botany*, v.64, p.903-913, 1977.
- FIGUEIREDO, J. G.; OLIVA, M.A.C.; SOUZA, M.M. Bioindicação do flúor mediante gramíneas tropicais. In: Martos, H.L.; Maia, N. B.(Eds) *Indicadores ambientais*. Sorocaba, 1997, p.191-204.
- GARCÍA-CIUDAD, A.; GARCÍA-CRIADO, B.; POTÓN-SAN EMETRIO, C. Determination of fluoride in plant samples by a potentiometric method and near-infrared reflectance spectroscopy. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v.16, p.1107-1122, 1985.
- GARREC, J.P. Interaction fluor-calcium et relation fluor senescence dans les plants soumises a une pollution fluoree. *Procedures VI Air Quality Congress*, v.1, p.49-467, 1983.
- GARREC, J.P.; PLEBIN, R.; LHOSTE, A.M. Influence du fluor sur la composition minerale d' aiguilles polluées de sapin (*Abies alba* Mill.). *Environmental Pollution*, v.13, p.159-167, 1977.
- GIANNINI, J.; MILLER, G.W.; PUSHNIK, J.C. Effects of NaF on biochemical processes of isolated soybean chloroplasts. *Fluoride*, v.18, p.72-79, 1985.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases occurrence in higher plants.

- Plant Physiology*, v.59, p.309–314, 1977.
- GUDERIAN, R.; van HAUT, H.; STRTAMANN, H. Experimentelle untersuchungen über pflanzen schädigende fluorwasser-stoffkonzentrationen Forschungsber. D. Landes NW, Köln: Westd, Verlag, n. 2017, 1969, 54S.
- HARA, S. Alterações estruturais em folhas de *Panicum maximum* Jacq. submetidas à chuva simulada com flúor. Viçosa: UFV, 2000, 48p. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- HEATH, R. L.; PARKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I kinetics and stoichometry of fatty acid peroxidation. *Archives Biochemistry Biophysics*, v.125, n.1, p.189-198, 1968.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station (Circular 347)*, 1950.
- HORVARTH, I; KLASOVA, A.; NAVARRA, J. Some physiological and ultrastructural changes of *Vicia faba* after fumigation with hydrogen fluoride. *Fluoride*, v.11, p.89-99, 1978.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidases, and ployphenoloxidases activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, v.57, p.315-319, 1976.
- KELLER, T. Physiological bioindication of an effect of air pollution on plants. In: Steubing, L; Jäger, H.J. (Eds). *Monitoring of air pollutants by plants*. Hague, W. Junk Publishers, 1982. p.86-95.
- KRUPA, Z.; MONIAK, M. The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity. *Plant Science*, v.138, p.149-156, 1998.
- MARKERT, B. Plants as Biomonitors: indicators for heavy metals in the terrestrial environment. Weinheim:Verlagsgesellschaft-VCH, 1993, 1100 pp.
- McCUNE, D.C.; WEINSTEIN, L.H. Metabolic effects for atmospheric fluorides on plants. *Environmental Pollution*, v.1, p.169-174, 1971.
- MENDELSSOHN, I.A.; MCKEE, K.L.; KONG, T. A comparison of physiological indicators of sub lethal cadmium stress in wetland plants. *Environmental and Experimental Botany*, v.46, p.263-275, 2001.
- MILLER, G. W. The effects of fluoride on higher plants with special emphasis on early physiological and biochemical disorders. *Fluoride*, v.26, p.3-22, 1993.
- MILLER, J.E.; MILLER, G.W. Effects of fluoride on mitochondrial activity in higher plants. *Plant Physiology*, v.32, p.115-121, 1974.

- MITCHELL, R. L. Evaluation of washing techniques for a removal of external fluoride from ironbark and grape leaves. *The Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*, v.52, p.99-101, 1986.
- PADINHA, C.; SANTOS, R.; BROWN M.T. Evaluating environmental contamination in Ria Formosa (Portugal) using stress index of *Spartina maritima*. *Marine Environmental Research*, v.49, p.67-78, 2000.
- PARRY, M.A.J. SCHMIDT, C.N.G; GUTTERIDGE, S. Inhibition of ribulose-P₂ carboxylase/ oxigenase and inorganic fluoride. *Biochemistry*, v.22, p.1641-1645, 1983.
- QUICK, P.; NEUHAUS, E.; FEIL, R.; STITT, M. Fluoride leads to an increase of inorganic pyrophosphate carboxilase/oxigenase and inorganic and an inhibition of photosynthetic sucrose in spinach leaves. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.973, p.263-271, 1989.
- RALPH, P. J.; BURCHETT. M. D. Impact of petrochemical on the photosynthesis of *Halophila ovalis* using chlorophyll fluorescence. *Marine Pollution Bulletin*, v.36, p. 429-436, 1998.
- ROGER, M. J. R.; WEISS, O. Fluorescence techniques. In: Roger, M. J. R. (Ed), *Handbook of plant ecophysiology techniques*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001, p.155
- SILVA, L. C.; AZEVEDO, A. A.; SILVA, E. A. M., OLIVA, M. A. CANO. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. *Revista Brasileira de Botânica*, v.23, n.4, p.383-391, 2000.
- SUN, E.J.; SU, H.J. Fluoride injury to rice plants caused by air pollution emitted from ceramic and brick factories. *Environmental Pollution*, v.37, p. 335-342, 1985.
- VDI-RITHTLINIE 2310, Maximale Immissions-Werte zum schutze der vegetation-maximale immissions konzentrationen für fluorwasserstoff. Blatt 3. Düsseldorf, dez 1989.48S.
- WEINSTEIN, L. H. Effects of atmospheric fluoride on metabolic constituents of tomato and bean leaves. *Country Boyce Thompson Institute of Plant Research*, v.21, p.215-231, 1961.
- WEINSTEIN, L.H.; MANDAL, R.H. The separation and collection of gaseous and particulate fluorides. *VDI-Berichte*, n.164, p.53-63, 1971.
- WEINSTEIN, L. H. Fluoride and plant life. *Journal of Occupational Medicine*, v.1, p. 49-78, 1977.

WEINSTEIN, L. H.; ALSCHER-HERMANN, R. Physiological responses of plants to fluorine. *In*: Unsworth, M. H.; Ormorod, D. P. (Eds). *Effects of gaseous air pollution in agriculture and horticulture*. London: Butterworth, 1983. 368 pp.