

Fotoinibição em espécies vegetais lenhosas, induzida por atrazina e avaliada por meio da fluorescência da clorofila



ISSN 0104-866X
Dezembro, 2007

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio-Norte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*



Documentos 159

Fotoinibição em espécies vegetais lenhosas, induzida por atrazina e avaliada por meio da fluorescência da clorofila

Eugênio Celso Emérito Araújo

Embrapa Meio-Norte
Teresina, PI
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio-Norte

Av. Duque de Caxias, 5.650, Bairro Buenos Aires

Caixa Postal: 01

CEP: 64006-220 Teresina, PI

Fone: (86) 3225-1141

Fax: (86) 3225-1142

Home page: www.cpamn.embrapa.br

E-mail: sac@cpamn.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Hoston Tomás Santos do Nascimento.*

Secretária: *Executiva: Ursula Maria Barros de Araújo*

Membros: *Paulo Sarmanho da Costa Lima, Humberto Umbelino Sousa, Fábio Mendonça Diniz, Flávio Flavaro Blanco, Cristina Arzabe, Eugênio Celso Emérito Araújo, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevêdo e Carlos Antônio Ferreira de Sousa.*

Supervisor editorial: *Lígia Maria Rolim Bandeira*

Revisor de texto: *Francisco de Assis David da Silva*

Normalização bibliográfica: *Orlane da Silva Maia*

Editoração eletrônica: *Erlândio Santos de Resende*

Foto da capa: *Eugênio Celso Emérito Araújo*

1ª edição

1ª impressão (2007): 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Meio-Norte

Araújo, Eugênio Celso Emérito.

Fotoinibição em espécies vegetais lenhosas, induzida por atrazina e avaliada por meio da fluorescência da clorofila / Eugênio Celso Emérito Araújo. - Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2007.

17 p. ; 21 cm. - (Documentos / Embrapa Meio-Norte, ISSN 0104-866X ; 159).

1. Planta lenhosa. 2. Fotossíntese. 3. Indução. I. Embrapa Meio-Norte. II. Título. III. Série.

CDD 572.46 (21. ed.)

© Embrapa, 2007

Autor

Eugênio Celso Emérito Araújo

Engenheiro agrônomo, Doutor em Ecologia e
Recursos Naturais, Embrapa Meio-Norte, Caixa
Postal 01, CEP 64006-220 Teresina, PI.

emerito@cpamn.embrapa.br

Apresentação

Os estresses ambientais abióticos (hídrico, de temperatura, salino, luz, etc), agindo isoladamente ou em conjunto, são responsáveis por significativas reduções na produção potencial das culturas agrícolas. O efeito final desses estresses geralmente só é avaliado no final do ciclo produtivo com a contabilização da produção final. Faz-se necessário o desenvolvimento de equipamentos e metodologias com os quais se possa avaliar a ocorrência e a intensidade desses estresses de forma rápida, prática e precoce, visando adotar medidas mitigatórias. O estresse luminoso que induz à fotoinibição é pouco abordado, principalmente em função do desenvolvimento muito recente de equipamentos portáteis e mais acessíveis, bem como da disseminação ainda restrita do método de avaliação (fluorescência da clorofila).

Esta publicação visa contribuir para sanar essas lacunas, apresentando uma metodologia simples para o treinamento de pesquisadores, técnicos e estudantes no manuseio do equipamento e entendimento da base teórica da fotoinibição.

Valdemício Ferreira de Sousa
Chefe-Geral da Embrapa Meio-Norte

Sumário

Fotoinibição em espécies vegetais lenhosas, induzida por atrazina e avaliada por meio da fluorescência da clorofila	9
Introdução	9
Objetivo	11
Procedimento	11
Referências	17

Fotoinibição em espécies vegetais lenhosas, induzida por atrazina e avaliada por meio da fluorescência da clorofila

Eugênio Celso Emérito Araújo

Introdução

A irradiância solar é imprescindível para a sobrevivência da planta em razão de sua participação em vários processos no crescimento e no desenvolvimento. Essa exigência é qualitativa (por exemplo, na fotomorfogênese) ou quantitativa (na conversão da radiação solar entre 400 e 700 nm pela fotossíntese). Entretanto, esse mesmo recurso natural pode ser danoso ao aparato fotossintético, dependendo de sua intensidade, duração e do estado da planta diante de outros fatores de estresse ambiental (BARBER; ANDERSSON, 1992; DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 1996; MÜLLER; LI; NIYOGI, 2001; NIYOGI, 2000). As plantas estão submetidas a uma grande variação na magnitude da irradiância incidente. Flutuações temporais e espaciais podem condicionar irradiância muito reduzida ou em excesso, mesmo durante o curso de apenas um dia. Ademais, no mesmo momento, um indivíduo pode estar sujeito a intensidades contrastantes de irradiância, como o interior e o exterior da copa de uma árvore (STYRING; JEGERSCHÖLD, 1994). Sob irradiância excessiva, as plantas utilizam vários mecanismos para evitar danos, como a redução da interceptação da luz (reduzindo o ângulo de incidência dos raios solares por movimentos foliares), a alteração da capacidade fotossintética (aumentando a quantidade da enzima Rubisco e de carregadores de elétrons entre os fotossistemas) ou a dissipação do

excesso de energia por meio da fluorescência e calor. Entretanto, esses mecanismos de alívio têm capacidade limitada. A ocorrência de estresses adicionais (por exemplo, hídrico ou térmico) reduz a eficiência da utilização da irradiância disponível e diminui a fotossíntese líquida (NIYOGI, 2000). A situação de inibição das reações fotoquímicas induzidas por excesso de irradiância recebe a denominação de "fotoinibição" (OSMOND, 1994). O método de determinação da fluorescência da clorofila tem-se apresentado como uma ferramenta adequada para estimar a fotoinibição. A fluorescência da clorofila informa a eficiência de trabalho do aparato fotoquímico, estimando também qual a extensão do dano causado pelo excesso de luz.

A análise da fluorescência é realizada principalmente a partir do fotossistema II, o qual sofre as principais injúrias durante o processo de fotoinibição (MAXWELL; JOHNSON, 2000). A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) é um herbicida do grupo das triazinas, que age por meio da sua ligação ao sítio da plastoquinona na proteína D1 do centro de reação do fotossistema II, inibindo o transporte de elétrons entre as quinonas Qa e Qb (HELDT, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004). Assim, o fluxo de elétrons até o fotossistema I é impedido, resultando em carência de poder redutor (NADPH) e de energia (ATP) para o funcionamento do ciclo de Calvin (responsável pela assimilação do CO₂ na matriz do cloroplasto). Sem esse dreno fotoquímico em funcionamento, a irradiância excede muito a capacidade de dissipação pela via fotoquímica (produção de NADPH e de ATP). A ação da atrazina e de outros herbicidas inibidores do fluxo acíclico de elétrons mimetiza de forma ampliada o efeito de vários estresses ambientais (seca, calor, frio, etc.), deprimindo a fotossíntese, aumentando a dissipação da energia radiante excessiva via fluorescência e reduzindo a utilização da energia captada pelo sistema antena. Uma das conseqüências do efeito da atrazina é a redução da razão entre a fluorescência variável (Fv) e a fluorescência máxima (Fm), indicando a perda da eficiência do fotossistema II (diminuição dos valores de Fv/Fm). O valor de Fv é calculado pelo valor de Fm menos o valor da fluorescência basal (Fo). A diminuição da razão Fv/Fm ocorre em conseqüência de um aumento proporcionalmente maior do valor de Fo após a aplicação da atrazina (como exemplo, os valores de Fo nos resultados da Tabela 1 após a aplicação de várias doses de atrazina).

Objetivo

O objetivo principal desta prática é demonstrar, utilizando um desacoplador do transporte eletrônico entre os fotossistemas II e I (atrazina), que a fluorescência da clorofila está intimamente relacionada aos processos de oxidação e redução durante a fotoquímica da fotossíntese.

Procedimento

a) Confeccionar dez etiquetas de marcação de folhas em papel de 2,0 cm x 1,0 cm, escritas a lápis e impermeabilizadas com fita adesiva tipo "durex". Atar a etiqueta a um cordão para fixação. Das dez etiquetas, duas devem ser rotuladas com a dose "0", duas com a dose "5", duas com a dose "50", duas com a dose "200" e duas com a dose "250".

b) Preparar soluções de atrazina nas concentrações 5, 50, 200 e 250 g L⁻¹ (gramas de atrazina por litro de solução). Essas concentrações são bem mais elevadas do que as recomendadas para plantas herbáceas. Utilizar qualquer produto comercial à base de atrazina (Atranex, Atrazina Nortox, Atrazinax, Gesaprim, Herbitrim, Siptran, Stauzina, etc.). Por exemplo, o produto Gesaprim apresenta concentração de 50 % m/v (500 g L⁻¹). Preparar 200 mL de cada concentração em um béquer de 250 mL (utilizar luvas e avental). Se for utilizar uma planta herbácea (o feijoeiro é conveniente), siga a recomendação do rótulo do produto para simular uma dose elevada e dilua essa dose em 25 % para efeitos reduzidos. Plantas herbáceas são suscetíveis a concentrações menores de atrazina e a solução poderá ser aplicada diretamente no substrato de um vaso.

c) Selecionar dez ramos de uma espécie lenhosa comum em jardim ou pomar, por exemplo, *Hibiscus rosa-sinensis* (hibiscus), *Mangifera indica* (mangueira), *Malpighia puniceifolia* (aceroleira), *Coffea arabica* (cafeeiro), *Bougainvillea glabra* (primavera), *Citrus limonia* (limoeiro), situados a uma altura máxima de 1,60 m. As plantas devem estar irrigadas e bem nutridas.

d) Em cada ramo, etiquetar apenas uma folha (totalmente expandida), geralmente entre as de número 9 até 14, considerando-se a folha mais nova no ápice do ramo como a folha de número 1. A folha escolhida deve ser de tonalidade verde-escura, sem sinais de herbivoria, deficiências nutricionais ou senescência.

e) Cada dose deve ser aplicada a duas folhas diferentes, conforme a etiqueta, ficando as duas restantes como controle (dose "0"). Aplicar a solução por meio da imersão total da folha na solução contida no béquer por 30 segundos e esperar o escoamento do excesso de volta ao béquer. Antes da imersão, agitar a solução com bastão de vidro, dissolvendo o soluto precipitado no fundo do béquer.

f) Realizar as medições em dia claro e sem chuva no quinto dia após a aplicação da atrazina, entre 8 e 10h da manhã. Colocar um clipe de escurecimento (Fig. 1) em cada folha etiquetada. Antes da colocação do clipe, limpar uma área circular de cerca de 1,5 cm de diâmetro com algodão umedecido em água caso alguma folha esteja coberta pela precipitação do soluto formando um pó branco. Manter o clipe de escurecimento fechado.

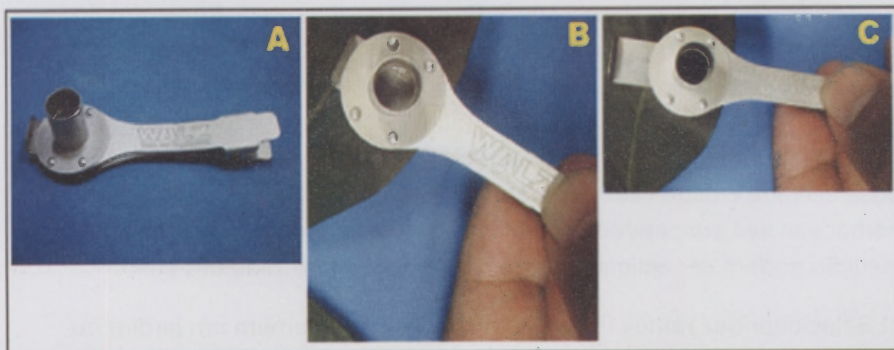


Fig. 1. A) Clipe de escurecimento foliar do fluorômetro PAM-2000 (Heinz Walz, Alemanha). B) Clipe fechado escurecendo uma área de cerca de 0,38 cm². C) Clipe aberto após a medição da fluorescência. O clipe deve ser aberto somente após a introdução da fibra óptica para a medição da fluorescência.

g) Após 20 minutos da colocação do clipe, realizar as leituras da fluorescência utilizando-se fluorômetro de luz modulada modelo PAM-2000 (Heinz Walz, Alemanha, Fig. 2). Ligar o console do PAM-2000 e o computador acoplado ao console. Abrir o programa de gerenciamento (DA-2000) do console. O monitor do computador deve apresentar a "tela de parâmetros" (*parameter screen*). Após a introdução da fibra óptica no clipe (Fig. 3), abrir a janela do clipe e apertar a tecla "M" do computador conectado e esperar aparecer no visor os valores de F_0 , F_m e F_v/F_m (Fig. 4). Proceder da mesma forma para todas as folhas etiquetadas. Para a determinação dos valores de F_v/F_m , pode ser utilizado como alternativa um fluorômetro convencional de luz contínua.



Fig. 2. Fluorômetro PAM-2000, Heinz Walz (Alemanha). A) Conexão do computador palm top ao console pronto para ser ligado. B) Conexão da fibra óptica ao console. Na extremidade da fibra, é possível observar um pulso de saturação de luz aplicado (cerca de $8.000 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). C) Equipamento montado para a medi\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia, sem a bolsa externa de fixa\u00e7\u00e3o ao corpo do operador.

Embrapa
A/SEDE



Fig. 3. Clipse de escurecimento preso à folha de hibiscus (esquerda), crescendo em condições de campo, e a fibra óptica (direita) do fluorômetro PAM-2000 (Heinz Walz, Alemanha), sendo introduzida para a medição da fluorescência da clorofila.



Fig. 4. Medição da fluorescência com o fluorômetro PAM-2000 (Heinz Walz, Alemanha) em mudas envasadas de mangueira (à esquerda) no momento da medição com a fibra óptica acoplada à amostra. A foto à direita ilustra a tela de parâmetros (*parameter screen*), na qual os valores de fluorescência máxima (F_m), basal (F_o), variável (F_v calculada como $F_m - F_o$) e a razão F_v/F_m poderão ser observados.

h) Com os dados coletados, preencher o quadro abaixo:

Doses de Atrazina (g L ⁻¹)	Parâmetros de fluorescência								
	Folha 1			Folha 2			Média		
	Fo	Fm	Fv/Fm	Fo	Fm	Fv/Fm	Fo	Fm	Fv/Fm
0 (controle)									
5									
50									
200									
250									

i) O valor de Fv/Fm representa a eficiência quântica potencial do fotossistema II ou a capacidade que tem o fotossistema II de capturar a energia radiante e transferi-la para as reações fotoquímicas (formação de NADPH). Em condições ótimas (sem a ocorrência de fatores estressantes), esse valor está ao redor de 0,83. Valores muito menores indicam a ocorrência de fotoinibição (MAXWELL; JOHNSON, 2000). O controle (sem atrazina) deve apresentar valor de Fv/Fm entre 0,83 e 0,70 dependendo da hora exata da medição e das condições ambientes (que podem ser mais ou menos estressantes, mesmo para o controle). A dose de 5 g L⁻¹ já deve reduzir o valor de Fv/Fm em relação ao controle, indicando diminuição da eficiência do fotossistema II em razão do bloqueio do fluxo de elétrons pela atrazina. A intensidade da fotoinibição deve aumentar proporcionalmente com a dose de atrazina, pois quanto maior a quantidade de moléculas de atrazina na solução utilizada, maior o número de moléculas de plastoquinona (Qb) impedidas de ser reduzidas para dar seguimento ao fluxo acíclico de elétrons entre os fotossistemas I e II. Na Tabela 1, estão os valores típicos para plantas lenhosas.

Tabela 1. Valores típicos (médias \pm desvio-padrão) dos parâmetros de fluorescência da clorofila em folhas de espécies lenhosas após cinco dias da aplicação de diferentes doses de atrazina. Esses valores foram obtidos após uma aplicação de cada dose (duas folhas por espécie em cada dose, totalizando 12 amostras por dose): *Hibiscus rosa-sinensis* (hibiscus), *Mangifera indica* (mangueira), *Malpighia puniceifolia* (aceroleira), *Coffea arabica* (cafeeiro), *Bougainvillea glabra* (primavera) e *Citrus limonia* (limoeiro).

Dose de atrazina (g L ⁻¹)	Parâmetro de fluorescência		
	Fo	Fm	Fv/Fm
0 (controle)	0,398 \pm 0,088	1,628 \pm 0,412	0,744 \pm 0,069
5	0,723 \pm 0,294	1,699 \pm 0,373	0,561 \pm 0,172
50	0,861 \pm 0,212	1,454 \pm 0,567	0,439 \pm 0,110
200	0,805 \pm 0,199	1,525 \pm 0,394	0,465 \pm 0,116
250	0,851 \pm 0,138	1,504 \pm 0,286	0,424 \pm 0,090

Referências

- BARBER, J.; ANDERSSON, B. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 61-66, 1992.
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W., III. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, Oxford, v. 1, n. 1, p. 21-26, 1996.
- HELDT, H. W. *Plant biochemistry*. San Diego: Elsevier, 2004. 630 p.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.
- MÜLLER, P.; LI, X. P.; NIYOGI, K. K. Non-photochemical quenching: a response to excess light energy. *Plant Physiology*, Minneapolis, v. 125, n. 4, p. 1558-1566, 2001.
- NIYOGI, K. K. Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 3, n. 6, p. 455-460, 2000.
- OSMOND, C. B. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: BAKER, N. R.; BOWYER, J. R. *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. Oxford: Bios Scientific, 1994. p. 1-24.
- STYRING, S.; JEGERSCHÖLD, C. Light-induced reactions impairing electron transfer through photosystem II. In: BAKER, N. R.; BOWYER, J. R. *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. Oxford: Bios Scientific, 1994. p. 51-73.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.



Embrapa

Meio-Norte

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

