

INFLUÊNCIA DO COBRE SOBRE A FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* EM PLANTAS DE *Alternanthera tenella*

AULER, Priscila Ariane^{1,3}; CUCHIARA, Cristina Copstein¹; PETERS, José Antonio¹, MARTINAZZO, Emanuela Garbin^{2,4}; BACARIN, Marcos Antonio^{2,5}

¹Laboratório de Cultura de Tecidos, UFPel, Instituto de Biologia, Depto. Botânica, Campus Universitário S/N. Capão do Leão, RS. CEP: 96160-000; ²Laboratório de Metabolismo Vegetal, UFPel, Instituto de Biologia, Depto. Botânica, Campus Universitário S/N. Capão do Leão, RS. CEP: 96160-000; ³Bolsista PIBIC CNPq; ⁴Bolsista PNPd-CAPES; ⁵Professor orientador (bacarin@ufpel.edu.br)

1 INTRODUÇÃO

Alternanthera tenella Colla, conhecida popularmente como apaga-fogo, é pertencente a família Amaranthaceae e, assim como outras plantas da mesma família, apresentam betalaínas na sua composição química (FERREIRA et al., 2003). As vias biossintéticas das betalaínas consistem de várias etapas de reações químicas e enzimáticas, nas quais o ponto inicial é a formação de DOPA (dihidroxifenilalanina), catalisado pela enzima cúprica tirosinase (TANAKA et al., 2008). As betalaínas podem ser divididas em betacianinas e betaxantinas, utilizadas na medicina popular e na indústria como corantes e conservantes antioxidantes (CAI et al., 2005; VOLP et al., 2009).

O cobre (Cu), micronutriente essencial para as plantas, é encontrado em maior quantidade nos cloroplastos das folhas e mais da metade deste está ligada à molécula de plastocianina, as quais são proteínas que participam do transporte de elétrons fotossintético (PRADO, 2008). Ainda, está presente no metabolismo respiratório e antioxidante, na biossíntese de componentes da parede celular, lignificação, percepção hormonal e produção de metabólitos secundários (YRUELA, 2009). Tanto a deficiência quanto o excesso de Cu podem causar distúrbios nutricionais, afetando de forma negativa os processos fisiológicos das plantas.

A fluorescência da clorofila *a* tem sido técnica importante para avaliar a eficiência fotossintética em plantas, mais especificamente o comportamento do fotossistema II (FSII) (BUONASERA et al. 2011). Esta técnica, direta e não destrutiva, tem permitido avanço no conhecimento dos processos fotoquímicos e não fotoquímicos que ocorrem na membrana dos tilacóides dos cloroplastos (ROHÁCEK, 2002) e, por meio do Teste-JIP, quantificar o fluxo de energia que passa pelos fotossistemas, além de avaliar o desempenho fotossintético das plantas e analisar o funcionamento do FSII (TSIMILLI-MICHAEL & STRASSER, 2008).

Tendo em vista que a tirosinase atua na rota de biossíntese de betalaínas e que o Cu pode aumentar a síntese deste metabólito secundário, somado ao uso da fluorescência da clorofila *a* como ferramenta para o entendimento do processo de transporte de elétrons fotossintético, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar os parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* em plantas de *A. tenella* cultivadas em diferentes concentrações de Cu.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas plantas de *A. tenella*, estabelecidas e multiplicadas *in vitro* e aclimatizadas durante quinze dias em sala de crescimento, sob densidade de fluxo de fótons de $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. Posteriormente, as plantas foram transferidas para um sistema hidropônico e cultivadas em solução nutritiva completa de Hoagland & Arnon (1938) por três dias. No quarto dia, as plantas foram submetidas aos diferentes tratamentos (concentrações de Cu), por meio do uso da solução nutritiva acima citada contendo as seguintes concentrações de Cu: 0,041; 0,082 (controle); 0,164; 0,246 e 0,328 mM, na forma de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), permanecendo nas mesmas condições de densidade de fluxo de fótons e fotoperíodo por treze dias. As soluções foram renovadas a cada três dias e, no décimo terceiro dia, foram realizadas medidas de fluorescência transiente da clorofila *a*.

A fluorescência transiente da clorofila *a* foi medida em folhas jovens, completamente expandidas, com o uso de um fluorômetro portátil Handy-Pea (Hansatech, King's Lynn, Norkfolk, UK). As determinações foram realizadas em 20 plantas de cada concentração, em folhas não destacadas e previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos. A intensidade da fluorescência foi medida aplicando um pulso de luz saturante de $3.000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante 1 s. A intensidade da fluorescência foi determinada em: 50 (fluorescência mínima), 100, 300 μs , 2 ms (F_J), 30 ms (F_I) e F_M (fluorescência máxima). Os dados coletados foram utilizados para calcular os parâmetros do Teste-JIP (STRASSER & STRASSER, 1995).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da fluorescência transiente da clorofila *a* fornece parâmetros capazes de descrever o comportamento fotossintético do FSII. Alguns destes parâmetros, deduzidos do Teste-JIP (STRASSER & STRASSER, 1995), estão representados na forma de gráfico radar (Fig. 1), sendo que todos os valores foram normalizados em relação às plantas do tratamento controle (0,082 mM).

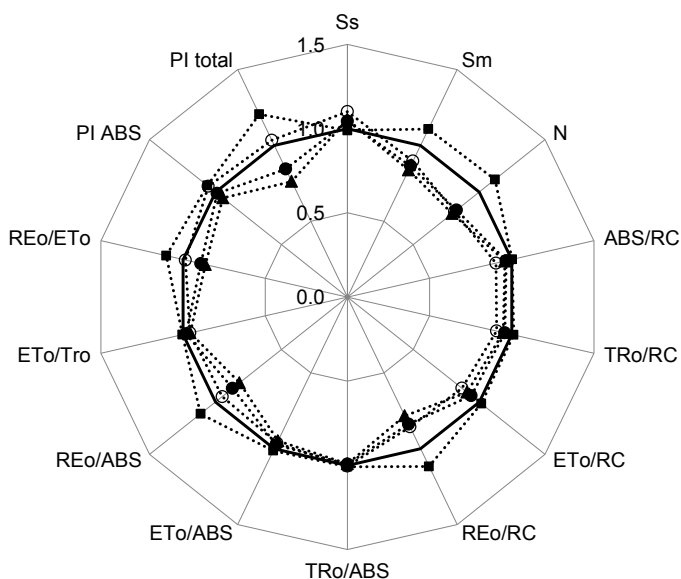


Figura 1. Parâmetros do Teste-JIP em plantas de *A. tenella* submetidas a diferentes concentrações de Cu: 0,041 (...■...); 0,082 (___); 0,164 (...○...); 0,246 (...●...) e 0,328 (...▲...) mM.

Identificou-se redução em S_m (medida da energia necessária para fechar todos os centros de reação do FS II) nas concentrações 0,164; 0,246 e 0,328 mM de Cu, refletindo na redução, em maior magnitude, no número de giros de redução, oxidação e re-redução de Q_A no tempo entre a luz ser ligada até atingir F_M (N) em relação ao controle.

Segundo Stirbet & Govindjee (2011), S_m representa eventos de múltiplos giros de redução de Q_A e N representa o número de giros. Com base nisso, foi possível revelar que as mudanças dose dependentes iniciaram no FSII, sendo identificadas através dos parâmetros que descrevem a oxidação e redução dos aceptores de elétrons do FSII (S_m e N).

Entre os parâmetros que descrevem os fluxos específicos por centro de reação do FSII e os parâmetros de rendimento ou razão de fluxo, houve diminuição da proporção de elétrons recebidos pelos aceptores finais em relação ao número de centros de reação (RE_0/RC) e diminuição no rendimento quântico para a redução do acceptor final de elétrons do fotossistema I (FSI) por fóton absorvido (RE_0/ABS) nas plantas tratadas com altas concentrações de Cu.

Em relação aos parâmetros que descrevem a eficiência de conservação de energia, a eficiência com que um elétron pode ser movido dos aceptores de elétrons do intersistema para os aceptores finais de elétrons do FSI ou probabilidade de redução de um acceptor final do FSI (RE_0/ET_0), este apresentou valores menores em plantas submetidas as concentrações de 0,246 e 0,328 mM de Cu. O mesmo foi observado para o índice de performance fotossintético total (PI_{total}), que mede a performance do fluxo de elétrons até os aceptores finais de elétrons do FSI (TSIMILLI-MICHAEL & STRASSER, 2008).

O comportamento nos parâmetros supracitados que avaliam o fluxo (RE_0/RC), o rendimento (RE_0/ABS) e a eficiência (RE_0/ET_0), podem ter sido fator limitante no fluxo de elétrons que permite a redução da plastoquinona no FSII. Assim, é possível inferir que, as altas doses de Cu testadas podem ter causado efeito de toxicidade nas plantas, estimulando mecanismos de detoxificação do metal, como a complexação do mesmo com aminoácidos (HÄNSCH & MENDEL, 2009), limitando a disponibilidade deste para a molécula de plastocianina, responsável por manter o transporte de elétrons do intersistema para o FSI. Coletivamente, os parâmetros de fluorescência transiente das clorofilas, indicam que o aumento na dose deste micronutriente reduziu as reações redox fotoquímicas e não-fotoquímicas nas plantas estudadas, como mostrado também pela redução do PI_{total} .

4 CONCLUSÃO

O excesso do micronutriente Cu causa redução nos parâmetros relacionados ao fluxo, rendimento e eficiência para redução dos aceptores finais do FSI de plantas de *A. tenella*. O principal efeito de altas doses de Cu é sobre a estrutura e funcionalidade do FSI.

5 REFERÊNCIAS

- BUONASERA, K.; LAMBREVA, M.; REA, G.; TOULOUPAKIS, E.; GIARDI, M. T. Technological applications of chlorophyll a fluorescence for the assessment of environmental pollutants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Tiergartenstr, v. 401, p. 1139-1151, 2011.
- CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. HPLC Characterization of betalains from plants in the Amaranthaceae. **Journal of Chromatographic Science**, Niles, v. 43 p. 454-60, 2005.
- FERREIRA, E. A.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; SILVA, E. A. M.; RUFINO, R. J. N. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. IV-*Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 263-271, 2003.
- HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, p. 259–266, 2009.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley, California, University of California College of Agriculture, Agricultural Experimental Station. Circular 347, 1938. p. 1–39.
- PRADO, R. de M. **Nutrição de Plantas**. São Paulo: Editora UNESP, 2008.
- ROHÁČEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. **Photosynthetica**, Praha, v. 40, p. 13-29, 2002.
- STIRBET, A.; GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 104, p. 236-257, 2011.
- STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transient to address environmental questions: The JIP-test. In: MATHIS, P. (Ed.) **Photosynthesis: from light to biosphere**. Dordrecht: Kluwer Academic publisher, 1995. p. 977-980.
- TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, Malden, v. 54, p. 733–749, 2008.
- TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. In vivo assessment of plants' vitality: applications in detecting and evaluating the impact of mycorrhization on host plants. In: VARMA, A. (Ed.) **Mycorrhiza: state of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 679–703.
- VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.
- YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 36, n. 5, p. 409-430, 2009.

6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio das agências de fomento CNPq e CAPES.