

CINÉTICA DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* EM DIFERENTES HÍBRIDOS DE CANOLA SOB ALAGAMENTO

OLIVEIRA, Pablo Valadão de^{1,2}; PERBONI, Anelise Tessari¹; CHIARELO, Henrique^{1,3}; DEUNER, Sidnei¹; BACARIN¹, Marcos Antonio

¹Laboratório de Metabolismo Vegetal, UFPel, Instituto de Biologia, Depto. Botânica, Campus Universitário S/N. Capão do Leão, RS. CEP: 96160-000; ²Bolsista PIBIC/CNPq; ³Bolsista Iniciação Científica/CNPq

1 INTRODUÇÃO

Dentre principais estratégias para melhorar a produtividade das culturas é a compreensão dos processos fisiológicos, bioquímicos e genéticos que são alterados por determinados tipos de estresses, de forma a permitir o desenvolvimento de genótipos altamente produtivos nestas condições ambientais desfavoráveis. A análise da fluorescência da clorofila tem revelado ser um método sensível, eficiente, rápido e não invasivo (Yusuf et al., 2010) para a detecção e quantificação das alterações induzidas no aparelho fotossintético, principalmente no fotossistema II (FS II). Sendo este o componente mais sensível do aparato fotossintético e pode ser temporariamente afetado por estresses ambientais antes que qualquer dano estrutural irreversível possa ficar aparente (Force et al., 2003; Panda et al., 2008). Sinais da fluorescência da clorofila *a* é amplamente utilizados para a avaliação de vários efeitos ambientais sobre o metabolismo fotossintético (Force et al., 2003). A avaliação da cinética de emissão da fluorescência das clorofilas permite o estudo de características relacionadas à capacidade de absorção e transferência da energia luminosa na cadeia de transporte de elétrons, sendo possível também verificar as mudanças conformacionais dos tilacóides (Krause & Weis, 1991). A canola (*Brassica napus* L.) pertence à família das Brassicaceae e constitui na terceira oleaginosa mais produzida no mundo, superada apenas pela soja e pela palma. No Brasil, o Rio Grande do Sul é o maior produtor do grão, com cerca de 23 mil hectares cultivados anualmente. O trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do alagamento sobre o aparato fotossintético de diferentes híbridos de canola.

2 METODOLOGIA

Sementes dos híbridos de canola Hyola 43, Hyola 401, Hyola 420 e Hyola 432, fornecidas pela empresa Celena Alimentos S/A, as quais foram semeadas em vasos plásticos, com capacidade de 0,5 L, contendo areia como substrato e mantidas em casa de vegetação. Após a emergência, foi realizado o desbaste deixando apenas uma planta por vaso. Aos sete dias após a emergência iniciou-se a aplicação de solução nutritiva Hoagland & Arnon (1950), a qual foi repetida a cada dois dias. Quando as plantas apresentaram 45 dias após a semeadura os vasos foram divididos em dois lotes: um lote que continuou recebendo as mesmas condições de suprimento de água, denominado controle; e outro lote o qual foi submetido ao estresse por alagamento, que consistiu na aplicação de uma lâmina de água de 2 a 3 cm acima do nível do solo por seis dias. No primeiro, segundo, quarto e sexto dia após indução do estresse foram realizadas as determinações de fluorescência da clorofila *a*.

A fluorescência transiente polifásica (OJIP) da clorofila *a* foi medida nas primeiras folhas jovens completamente expandidas, à temperatura ambiente, utilizando um fluorômetro portátil (Modelo Handy PEA, Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK). As medidas foram realizadas no período da manhã, entre as 8 e 9 horas, em folhas previamente adaptadas ao escuro por 20 minutos para oxidação completa do sistema fotossintético de transporte de elétrons. A emissão de fluorescência foi induzida em uma área de 4 mm de diâmetro da folha pela exposição da amostra a um pulso de luz saturante numa intensidade de fluxo de fótons de $3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As intensidades de fluorescência foram determinadas a 50, 100, 300 μs , 2 (F_J) e 30 (F_I) ms e F_M (fluorescência máxima). A partir das intensidades de fluorescência foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (Strasser & Strasser, 1995) e a cinética de emissão de fluorescência foi avaliada em comparação com o tratamento controle.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

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

A diferença das fluorescências variáveis entre as plantas alagadas e o controle [$\Delta W_t = (W_{t \text{ alagada}} - W_{t \text{ controle}})$] mostra o efeito do alagamento sobre a fluorescência variável transiente no tempo entre 50 μs e 1 s, podendo ser identificadas as diferentes bandas L, K e P (Figura 1B). As diferenças entre os tratamentos são mostradas nas Figuras 1C e 1D, sendo os dados de fluorescência normalizados entre os pontos O (50 μs) e K (300 μs) e apresentaram como fluorescência variável relativa [$W_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$] em escala linear entre estes dois tempos (Figura 1C) e como diferença cinética $\Delta W_{OK} = W_{OK \text{ alagada}} - W_{OK \text{ controle}}$ (Figura 1D). Foi possível observar pela cinética a presença da banda L positiva (aproximadamente em 150 μs) nas plantas dos híbridos Hyola 43, Hyola 401 e Hyola 432, o que significa diminuição da conectividade energética entre as unidades do FS II. Assim, pode ser inferido que as plantas do híbrido Hyola 420 não sofreram perda desta conectividade quando submetidas a alagamento.

A fluorescência transiente foi normalizada entre os pontos O (50 μs) e J (2ms), como [$W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$] (Figura 1E), a diferença cinética $\Delta W_{OJ} = W_{OJ \text{ alagada}} - W_{OJ \text{ controle}}$, na faixa de tempo de 50 μs a 2 ms (escala linear), na qual foi identificado a banda K positiva (ao redor de 300 μs) para as plantas dos híbridos Hyola 43, Hyola 401 e Hyola 432 (Figura 1F). Assim, provavelmente, as plantas do híbrido Hyola 420 não sofreram inativação do complexo de evolução de oxigênio.

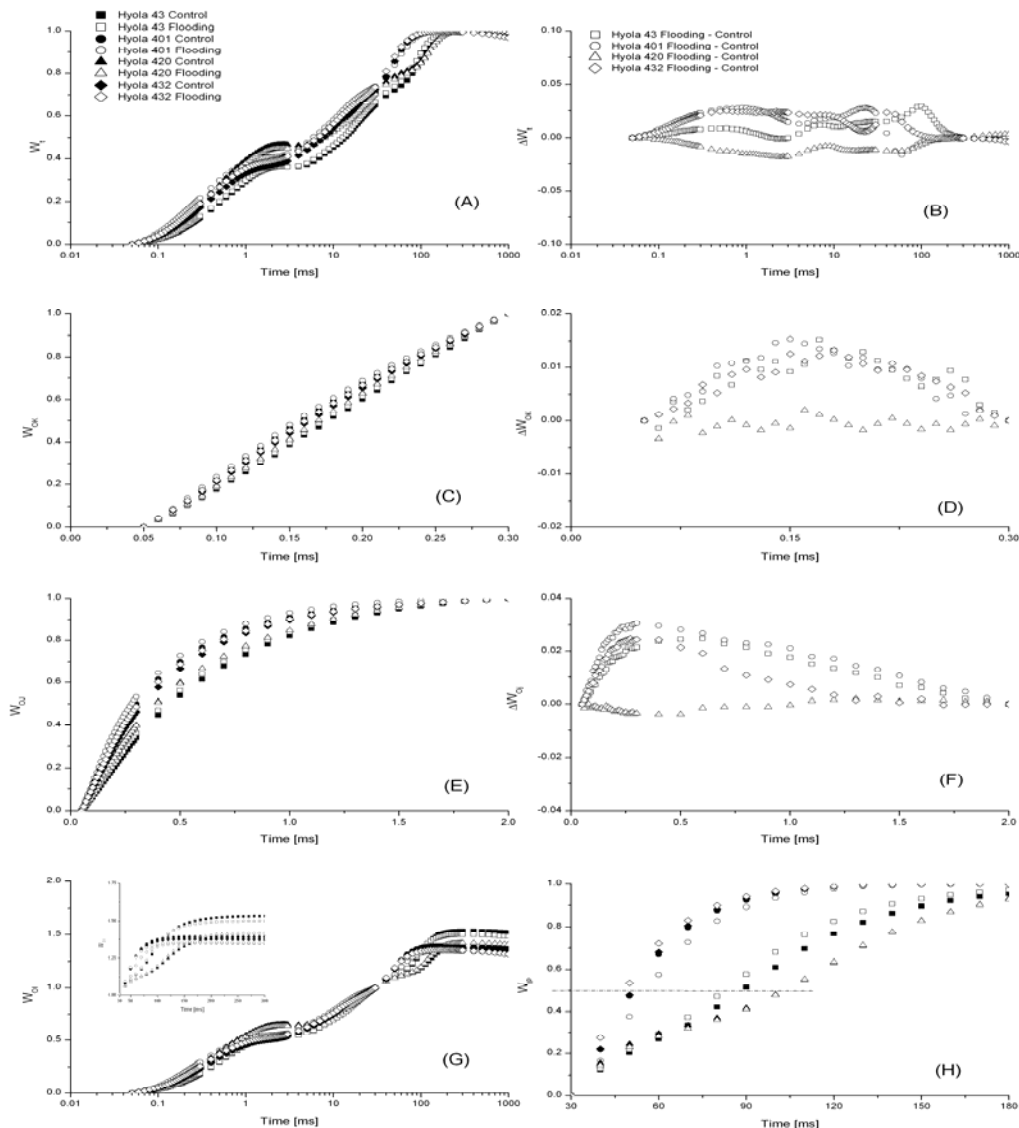


Figura 1: Fluorescência transiente da clorofila a de folhas adaptadas ao escuro em diferentes híbridos de canola (*Brassica napus* L.). (A) fluorescência variável relativa [$W_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$]; (B) diferença cinética de W_t [$\Delta W_t = (W_{t\text{ alagada}} - W_{t\text{ controle}})$]; (C) fluorescência variável entre os pontos O e K [$W_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$]; (D) diferença cinética de W_{OK} [$\Delta W_{OK} = W_{OK\text{ alagada}} - W_{OK\text{ controle}}$]; (E) fluorescência variável entre os pontos O e J [$W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$]; (F) diferença cinética de W_{OJ} [$\Delta W_{OJ} = (W_{OJ\text{ alagada}} - W_{Oj\text{ controle}})$]; (G) fluorescência variável entre os pontos O e I [$W_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$]; (H) fluorescência variável entre os pontos I e P [$W_{IP} = (F_t - F_I)/(F_I - F_I)$].

Para avaliar a fase O-I os valores de fluorescência da clorofila foram normalizados como [$W_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$], não sendo verificadas diferenças marcantes na fase O-I entre os tratamentos (Figura 1G). Para avaliação da fase I-P dois diferentes procedimentos foram utilizados: a) normalização das curvas $W_{OI} \geq 1$ (gráfico inserido na Figura 1G); e b) dados normalizados como [$W_{IP} = (F_t - F_I)/(F_I - F_I)$] (Figura 1H) em escala linear entre 30 e 180 ms. Em ambas as figuras identificaram-se diferenças apenas entre os híbridos, não sendo possível evidenciar efeito do estresse por alagamento nas plantas. No entanto, as plantas do híbrido Hyola 43, independente do estresse por alagamento, apresentaram maior pool de aceptores finais de elétrons do lado acceptor do FS I devido a incremento da fluorescência na fase I-P (Figura 1G). Para $W_{IP} = 0,5$ (linha

tracejada) o tempo correspondente é definida como a meia-vida, e conforme citado por Yusuf et al. (2010) o inverso da meia vida é a constante global de redução do pool de aceptores finais de elétrons do FS I (Figura 1H). Assim pode-se identificar que os híbridos Hyola 43 e Hyola 420 apresentaram menor constante de taxa global de redução dos aceptores finais do FS I.

O aparecimento das bandas L e K pode ser um excelente indicador potencial para identificação de distúrbios fisiológicos antes do aparecimento de danos visuais no caso de estresse por seca (Oukarroum et al., 2007). Assim, ao analisar as curvas de cinética de fluorescência, nas quais não se observou para as plantas do híbrido Hyola 420 sob alagamento, o aparecimento da banda L (Figura 1B) e banda K (Figura 1D), sugere que o mesmo foi mais tolerante ao alagamento do que o Hyola 43, Hyola 401 e Hyola 432.

4 CONCLUSÕES

Os híbridos de *Brassica napus* L., Hyola 43, 401, 420 e 432, demonstram comportamentos distintos em resposta ao alagamento do solo. As plantas do híbrido Hyola 420 apresentaram melhor desempenho fisiológico em condições de alagamento demonstrando que tal híbrido é menos sensível a determinado estresse quando comparado as híbridos Hyola 43, 401 e 432.

5 REFERÊNCIAS

- FORCE, L., CRITCHLEY, C., VAN RENSEN, J.J.S.. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. **Photosynthesis Research**, v. 78, p. 17-33, 2003.
- KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.42, p. 313-349, 1991.
- OUKARROUM, A.; EL MADIDI, S.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R.J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, v.60, p.438-446, 2007.
- PANDA, D.; SHARMA, S.G.; SARKAR, R.K.. Chlorophyll fluorescence parameters, CO₂ photosynthetic rate and regeneration capacity as a result of complete submergence and subsequent re-emergence in rice (*Oryza sativa* L.). **Aquatic Botany**, v. 88, p. 127-133, 2008.
- STRASSER, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A.. Analysis of the fluorescence transient In: Papageorgiou, G. C.; Govindjee (eds.), Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis. **Advances in Photosynthesis and Respiration Series**. Springer: Dordrecht, p. 321-362, 2004.
- STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M..The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. **Probing photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation**. Taylor e Francis, London, p. 443-480, 2000.
- YUSUF, M.A., KUMAR, D., RAJWANSHI, R., STRASSER, R.J., TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N.B.. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1-11, 2010.

6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio das seguintes agências de fomento – Fapergs, CNPq, FINEP, CAPES e MCT.