



# RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E HISTOQUÍMICAS DE PLANTAS DE *NICOTIANA TABACUM* 'BEL W3' EXPOSTAS EM REGIÃO CONTAMINADA POR OZÔNIO.

D.T. Silva<sup>1</sup>

A.P.S. Dias<sup>1</sup>; A.N.V. Pedroso<sup>1</sup>; R.M. Moraes<sup>1</sup>; S.T. Meirelles<sup>2</sup>; E.S. Alves<sup>1</sup>; M.C.S. Rinaldi<sup>1</sup>; M. Domingos<sup>1</sup>

1. Instituto de Botânica, Seção de Ecologia, Av. Miguel Stéfano, 3687, 04301 - 902, São Paulo, Brasil. 2. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Ecologia, Rua do Matão, 321, 05508 - 900, São Paulo, Brasil. Tel. 55 11 505073 - 6300 (ramal 297)-321ana@gmail.com

## INTRODUÇÃO

Os efeitos dos poluentes sobre plantas das regiões temperadas já são estudados há várias décadas. Disso resultou a seleção de algumas espécies que respondem de modo característico e facilmente reconhecível a determinados poluentes e a elaboração de protocolos de cultivo e exposição (VDI, 2003). Na atualidade, várias espécies são rotineiramente usadas no biomonitoramento de poluentes (Skelly, 2003). Uma espécie bioindicadora sensível é aquela que exibe sintomas foliares visíveis quando exposta a um determinado poluente ou mistura de poluentes (Manning, 2003). *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' é a espécie bioindicadora sensível de ozônio (O<sub>3</sub>) mais estudada. Ela manifesta injúrias foliares visíveis muito características e vem sendo empregada há várias décadas no mapeamento da distribuição geográfica de concentrações fitotóxicas de O<sub>3</sub> em amplas áreas (Heggstad *et al.*, 1991; Klumpp *et al.*, 1994; Klumpp *et al.*, 2004).

A fitotoxicidade do O<sub>3</sub> é decorrente de seu caráter altamente reativo, pois promove a formação de espécies ativas de oxigênio (EAO) no apoplasto, as quais são capazes de causar danos aos constituintes celulares. Entretanto, a formação de EAO é um resultado normal do metabolismo do oxigênio e as plantas possuem um sistema de defesa antioxidante, formado por enzimas (como a Ascorbato Peroxidase-APX) e compostos não enzimáticos (como o Ácido Ascórbico-AA) capazes de neutralizá-las. Estas EAO são altamente reativas e causam danos logo que entram em contato com biomoléculas, mas um sistema de defesa eficiente pode retardar estes danos. Uma reação dentro do sistema antioxidante é a conversão do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água através da oxidação do AA a ácido monodeidroascórbico (MDHA), catalisada pela APX. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma EAO com maior estabilidade, porém ainda tóxica, que pode ser acumulada em tecido vegetal e observada próxima a estômatos em cortes histoquímicos após coloração específica.

O O<sub>3</sub> entra na planta diretamente pelos estômatos durante

as trocas gasosas. A fotossíntese é um processo particularmente sensível ao O<sub>3</sub> e sua redução é provocada por danos envolvendo os movimentos estomáticos, o transporte de elétrons e reações enzimáticas (Rodríguez & Tascon, 2001). A enzima responsável pela fixação do CO<sub>2</sub>, a ribulose bis-fosfato carboxilase - oxigenase, tem sua síntese e atividade afetadas, sendo, geralmente, a principal causa da redução da fotossíntese líquida (Farage & Long, 1999).

Todos os distúrbios acima descritos acabam por provocar sintomas como cloroses, descoloração da folha e necrose em tecidos e órgãos, que podem evoluir levando à morte do indivíduo (Klumpp *et al.*, 2006).

Neste contexto, o estudo de respostas fisiológicas (assimilação líquida de carbono), bioquímicas (determinação da atividade da enzima ascorbato peroxidase) e histoquímicas (acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) podem auxiliar na avaliação de efeitos deletérios induzidos pelo O<sub>3</sub> em determinadas espécies, e na análise de eficiência de espécies bioindicadoras sensíveis em biomonitoramento.

## OBJETIVOS

O presente estudo visa avaliar a relação entre a assimilação líquida de carbono (Asat), a atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) e o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nos tecidos foliares, observando como estas variáveis interferem no surgimento de sintomas foliares visíveis de plantas de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3'

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1-Cultivo e Exposição das Plantas

Plantas de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' foram cultivadas a partir de sementes, em vasos plásticos contendo substrato

comercial Plantimax (Eucatex) e vermiculita fina, misturados na proporção de 3:1, respectivamente. Durante o cultivo, as plantas permaneceram em casa de vegetação com ar filtrado e condições climáticas favoráveis ao seu crescimento e receberam, semanalmente, 100 ml da solução nutritiva (Epstein 1975).

A exposição das plantas foi realizada no Instituto de Botânica durante as quatro estações climáticas do ano de 2008. Situado na zona sul da cidade de São Paulo, o local é intensamente afetado pelo smog fotoquímico (Klumpp *et al.*, 1994, Domingos *et al.*, 2002; Sant'Anna 2008). As plantas foram mantidas, sob sombreamento de 50%, em suportes construídos segundo o modelo proposto por Arndt & Schweizer (1991) e por VDI (2003). Em cada estação do ano, foram realizadas exposições consecutivas de plantas, com duração de 14 dias cada. A exposição foi sempre iniciada com 18 plantas previamente numeradas e, ao longo de cada exposição, em três dias sorteados, eram retiradas seis plantas igualmente sorteadas. Para cada dia de amostragem, nas folhas 6 e 7 das plantas sorteadas (considerando a folha mais velha número como a número 1 a partir da base do caule), foram realizadas as análises descritas a seguir. A concentração de O<sub>3</sub> foi monitorada continuamente por técnicos da Seção de Ecologia do IBt.

## 2 - Variáveis Estudadas

### Assimilação líquida de Carbono (Asat)

Foi avaliada entre 9:00h e 11:00h nos dias sorteados, com um analisador de gases por infravermelho (LCPro, ADC, UK) sob radiação fotossinteticamente ativa saturante (400 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, valor definido a partir da realização de curvas de respostas à luz) e CO<sub>2</sub>, temperatura e umidade do ar ambientes.

### Injúrias foliares visíveis

A porcentagem de área foliar afetada por injúrias visíveis foi estimada visualmente, seguindo as recomendações de VDI (2003) e conforme adotado em vários estudos similares realizados nos continentes europeu e americano (Heggestad 1991, Klumpp *et al.*, 2001, Vergé *et al.*, 2002). Os resultados foram expressos em classes de 5 em 5% da superfície do limbo coberta por sintomas, calculando - se a média de danos nas folhas analisadas por planta em seis plantas.

### Atividade da ascorbato peroxidase (APX)

O material vegetal foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, Triton 0,05%, polivinilpolipirrolidona (PVPP) 10% e 1 mM ácido ascórbico (AA) e centrifugado por 10 min, a 10000 rpm. O extrato obtido foi congelado a - 80°C para posterior análise. Para determinação da atividade enzimática da APX, foi utilizada a metodologia proposta por Asada (1984), com modificações. A mistura de reação consistiu de tampão fosfato 80 mM, pH 7,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de AA e 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi iniciada com a adição do extrato vegetal, descrito anteriormente, à mistura. A atividade da APX foi medida em um espectrofotômetro UV/VIS a 290 nm, por 2 minutos, onde se observou o consumo de AA utilizado pela enzima para decompor o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água.

### Análise histoquímica

O acúmulo de peróxido de hidrogênio nos tecidos foliares foi localizado em fragmentos de folhas frescas, (6 e 7) com cerca de 1 cm<sup>2</sup>, imersos em solução contendo 1mg mL -

1 de 3,3' - diaminobenzidina (DAB) - HCl, (pH 5,6 ajustado com hidróxido de sódio); estes foram incubados em câmara escura por oito horas. Em seguida, os fragmentos foram clarificados em álcool fervente a 96% (Iriti *et al.*, 2006, Faoro & Iriti 2005). As células que apresentaram acúmulo de peróxido de hidrogênio apresentaram a coloração marrom. Como controle negativo acrescentou - se 10mM de ácido ascórbico à solução de DAB. As células com acúmulo foram quantificadas e identificadas como componentes da epiderme, parênquima paliçádico ou parênquima lacunoso). Todas as amostras foram examinadas em microscópio equipado com câmera para captura de imagens e sistema semi - automático de medições-Olympus modelo BX41 - BF - III, com software de análise de imagens Image - ProExpress versão 4.0.1, Media Cybernetics.

## RESULTADOS

Durante o presente estudo foram verificados sintomas foliares característicos de exposição ao ozônio em plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' expostas no ambiente contaminado. Estes se iniciaram como pontos brilhantes nos espaços intervenais da superfície adaxial das folhas, progredindo para pontos necróticos acinzentados ou amarronzados. Os mesmos ocorrem inicialmente nas folhas mais velhas, progredindo para as mais jovens com o prosseguimento da exposição ao poluente. Normalmente não alcançam a superfície inferior das folhas, salvo danos muito severos que podem levar ao amarelecimento total da folha, acelerando a senescência e a abscisão. Este padrão é indicado pelo VDI (2003) como indicativo de exposição ao O<sub>3</sub> para plantas de *N. tabacum* 'Bel W3', além de também ter sido observado em estudos de Sanz *et al.*, (2002) e Domingos, *et al.*, (2002), dentre vários outros.

A incidência de injúrias nas plantas avaliadas em cada dia de amostragem (porcentagem de plantas afetadas por injúrias em cada exposição) variou entre 0 e 100% e a porcentagem da superfície foliar coberta por injúrias variou entre 0 e 70%, chegando a 90% no inverno. Foi observada uma correlação positiva entre danos e concentração acumulada de O<sub>3</sub> no ambiente. A maior frequência de danos ocorreu na primavera, no entanto os danos mais severos foram observados no inverno, período em que foi registrado o maior acúmulo do poluente ao longo de todo o estudo.

Estes resultados diferem dos obtidos por Sant'Anna (2007), que observou em plantas da mesma espécie baixa porcentagem de injúrias visíveis no período de inverno. Isso decorre das características das exposições de cada um dos estudos.

Com relação aos valores de Asat, observou - se também correlação negativa com danos visíveis, fato que se explica devido à redução de tecido fotossintetizante. Ao longo das exposições, observou - se que as plantas de *N. tabacum* obtiveram os valores mais baixos de Asat na primavera. No entanto, no inverno, período com a maior concentração acumulada de O<sub>3</sub> de todo estudo, verificou - se a correlação negativa mais alta entre Asat e concentração de O<sub>3</sub>. As demais estações apresentaram valores mais altos em relação à primavera. Essas oscilações são esperadas uma vez que se trata de experimento conduzido em condições de campo

em que vários fatores estão atuando em conjunto sobre os processos fisiológicos da espécie em estudo.

Como se viu, tanto os danos visíveis como os invisíveis decorrem do fato do O<sub>3</sub> induzir direta ou indiretamente a formação de espécies ativas de oxigênio (EAOs) nas células, as quais são muito reativas e danificam moléculas vitais como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, com intensidade dependente da eficiência do sistema celular antioxidativo. O acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, um indicador desse estresse que ocorre quando há um desequilíbrio na proporção oxidante/antioxidante, pode ser detectado. Comparando - se este acúmulo a atividade da enzima APX, observou - se que atividade desta enzima foi maior durante o verão e outono, apresentando respectivamente medianas de 43,74 e 44,62 dA/min/gs, período em que foram observados menores acúmulos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto que o inverno e primavera apresentaram valores mais baixos, com medianas de 25,38 e 33,77 dA/min/gs resultando em menor capacidade de neutralização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e conseqüente maior acúmulo visualizado durante este período, como detalhado a seguir.

As plantas expostas nos períodos correspondentes ao verão e primavera apresentaram maior acúmulo do peróxido de hidrogênio, principalmente no parênquima paliçádico, quando comparadas às plantas expostas no outono e inverno períodos esses com maior concentração de ozônio. A relação entre acúmulo de peróxido e maior concentração de ozônio foi constatada por Iriti *et al.*, 006 em *Lycopersicon pimpinellifolium* submetido a diferentes concentrações de ozônio. O maior acúmulo no parênquima paliçádico está de acordo com resultados de vários autores que informam ser esse o tecido mais afetado pelo ozônio (Iriti *et al.*, 003; Faoro & Iriti 2005, Faoro & Iriti 2009), principalmente nas células ao redor da cavidade subestomática e também nos estômatos (Iriti & Faoro 2003, Iriti *et al.*, 006)

## CONCLUSÃO

Em estudos realizados com *N. tabacum* 'Bel W3' em regiões temperadas têm se encontrado uma relação mais forte e, às vezes linear, entre danos e concentração de O<sub>3</sub> (Ribas & Peñuelas, 2004). Na cidade de São Paulo, onde a contaminação por ozônio apresenta níveis semelhantes à das regiões onde se efetuaram estes estudos, mas cujas condições climáticas caracterizam - se por sua instabilidade, isto não tem sido verificado (Esposito *et al.*, 008; Sant'Anna *et al.*, 008) o que está de acordo com o verificado neste estudo.

A relação observada entre menores atividades enzimáticas da APX acompanhadas do maior acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verificadas de forma mais clara durante a primavera, período com maiores concentrações de O<sub>3</sub>, evidenciam que estas plantas expostas ao local de estudo apresentaram um quadro de estresse oxidativo que pode ter desencadeado os danos visíveis vistos em maior grau durante este período. A redução de Asat verificada neste período corrobora essa conclusão e indica que a planta ao produzir menor quantidade de produtos fotoassimilados, possivelmente dispôs de menos recursos para investir em defesas. Assim, a espécie *N. tabacum* 'Bel W3' demonstrou baixa capacidade antioxidativa, o que deve estar relacionado à sua alta sensibilidade ao ozônio.

Os autores agradecem à FAPESP pelo auxílio ao projeto (Proc. FAPESP 06/61024 - 0) e pela bolsa a D.T. Silva e à CAPES pelas bolsas de mestrado a A.P.S. Dias e doutorado a A.N.V. Pedroso.

## REFERÊNCIAS

- Arndt U & Schweiger B. 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In: Biological monitoring. Signals from the environment (Ellenberg *et al.*, ds.). *Vieweg, Eschborn*, pp. 199 - 298.
- Domingos M, Klumpp A & Klumpp G. 1998. Air pollution impact on the Atlantic Forest at the Cubatão region, SP, Brazil. *Ciência e Cultura* 50: 230 - 236.
- Epstein E. 1975. Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas. Tradução e notas de E. Malvolta. *Livros técnicos e científicos. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.*
- Esposito, M., Ferreira, M., Snat'Anna, S, Domingos, M., Souza, S.R. 2008. Relationship between leaf antioxidants and ozone injury in *Nicotiana tabacum* Bel W3 under environmental conditions in São Paulo, Brazil. *Atmosph Environ (in press).*
- Faoro, F. & Iriti, M. 2009. Plant cell death and cellular alterations induced by ozone: Key studies in Mediterranean conditions. *Environmental Pollution* 157: 1470 - 1477.
- Faoro, F. & Iriti, M. 2005. Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. *Biologia Plantarum* 49: 585 - 592.
- Heggestad HE. 1991. Origin of Bel - W3, Bel - C, and Bel - B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environmental Pollution* 74: 264 - 291.
- Iriti, M., Rabotti, G., Ascensão, A. & Faoro, F. 2003. Benzothiadiazole - induced resistance modulates ozone tolerance. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4308 - - 4314.
- Iriti, M., Belli, L., Nali, C., Lorenzini, G., Gerosa, G. & Faoro, F. 2006. Ozone sensitivity of currant tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium*), a potential bioindicator species. *Environmental Pollution* 141: 275 - 282.
- Iriti, M. & Faoro, F. 2003. Benzothiadiazole (BTH) Induces cell - death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. *Phytopathology* 151, 171-180.
- Klumpp A, Ansel W, Klumpp G, Vergne P, Sifakis N, Sanz MJ, Rasmussen S, Ribas H, Peñuelas J, Kambezidis H, He S, Garrec JP, Calatayud V. 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone - induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment*. 40 (38): 7437-7448.
- Klumpp A, Klumpp G. & Domingos M. 1994. Active biomonitoring at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Environmental Pollution* 85: 109 - 16.
- Manning, W.J. 2003. Detecting plant effects is necessary to give biological significance to ambient ozone monitoring data and predictive ozone standards. *Environmental Pollution* 126: 375 - 379.

**Peñuelas, J., Ribas, A., Gimeno, B.S., Filella, I. 1999.** Dependence of ozone biomonitoring on meteorological conditions of different sites in Catalonia (N.E. Spain). *Environ. Monitor. Assess.* 56, 221 - 224.

**Sant'Anna SM, Esposito MP, Domingos M & Souza SR. 2008.** Suitability of *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' for biomonitoring photochemical compounds in São Paulo, Southeast Brazil. *Environmental Pollution* 151: 389 - 394.

**Sanz, M.J., Sánchez, G., Calatayud, V., Minaya, M.A. & Cerveró, J. 2002.** La contaminación atmosférica en los bosques: guía para la identificación de daños visibles por ozono. 1ª ed. *Artegraf S.A, Madrid.*

**Skelly, J.M. 2003.** Native plants as bioindicators of air pollutants: contributed papers to a symposium held in conjunction with the 34th Air Pollution Workshop. *Environmental Pollution* 125:1 - 2.

**VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 1999.** Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Fundamentals and aims. VDI 3957/1. *VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.*

**VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 2003.** Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants (bioindication). Determination and evaluation of the phytotoxic effects of photooxidants. Method of the standardized tobacco exposure. VDI 3957/6. *VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.*

**Vergé X, Chapuis A & Delpoux M. 2002.** Bioindicator reliability: the example of 'Bel W3' tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Environmental Pollution* 85: 337 - 349.