



COMPARAÇÃO ENTRE RESPOSTAS ANTIOXIDATIVAS E OCORRÊNCIA DE SINTOMAS FOLIARES VISÍVEIS EM PLANTAS ORIGINADAS DE SEMENTES PROVENIENTES DE POPULAÇÕES DISTINTAS DE *IPOMOEA NIL* 'SCARLET O'HARA' EM AMBIENTE CONTAMINADO POR OZÔNIO.

Ricardo Keiichi Nakazato

Marcelle Dafré; Sandra R. A. S. Viola; Clarice Sun Duk Kin; Ana Paula Souza Dias; Mirian Cilene Spasiani Rinaldi; Regina Maria de Moraes; Marisa Domingos

Instituto de Botânica, Seção de Ecologia, Av. Miguel Stéfano, nº 3687, 04301 - 902, Água Funda, São Paulo, Brasil.

Tel. (11) 5073 - 6300, ramal. 297 rickejao@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Entre os poluentes presentes na troposfera, o ozônio (O_3) constitui, atualmente, o principal agente causador de danos à vegetação e de perdas na produtividade agrícola, em escala global. Na cidade de São Paulo, o O_3 é o poluente aéreo com maior número de ultrapassagens dos padrões legais de qualidade do ar. Isto se deve às altas emissões de seus principais precursores pela grande frota automotiva desta cidade e às condições climáticas da região, como alta intensidade da radiação solar e temperaturas elevadas, que favorecem a formação de ozônio, durante quase o ano inteiro (CETESB 2008, Emberson *et al.*, 001, Guderian 1985).

A alta toxicidade do ozônio às plantas deve - se, entre outros aspectos, ao seu alto poder oxidativo, gerando um quadro de estresse devido à formação excessiva de espécies ativas de oxigênio (EAOs). Porém cabe lembrar que a formação destas EAOs é um fenômeno natural, resultante do metabolismo do oxigênio, durante os processos de fotossíntese e respiração. Na ausência de fatores de estresse oxidativo, há um balanço nas células vegetais entre a produção de EAOs e o sistema antioxidante, formado por diversos compostos, entre os quais ácido ascórbico, a glutatona e as enzimas superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutatona redutase e catalase. Estes, em conjunto, neutralizam substâncias oxidativas e impedem danos celulares (Bray *et al.*, 2000, Burkey *et al.*, 2006).

Reações de oxi - redução envolvendo ácido ascórbico e a glutatona são fundamentais para manutenção desse balanço. O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), formado, por exemplo, em consequência da reação entre ozônio e água, pode se converter em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Por meio da oxidação do ácido ascórbico a ácido monodeidroascórbico, catalisada pela enzima ascorbato peroxidase (APX), o H_2O_2

é convertido em água. A enzima catalase igualmente contribui para a conversão de H_2O_2 e em oxigênio molecular. A oxidação da glutatona reduzida (GSH) também permite a remoção de H_2O_2 e ainda previne a peroxidação dos lipídios e elimina o radical hidroxila ($OH\bullet$) e 1O_2 . A redução do ácido monodeidroascórbico a ácido ascórbico ocorre por redução enzimática nos cloroplastos ou por sua dismutação espontânea a dehidroascórbico, que reage com a glutatona (GSH), produzindo ácido ascórbico e glutatona oxidada (GSSH). A GSSH, por sua vez, é reduzida pela glutatona redutase (GR). Na condição reduzida, ácido ascórbico e glutatona podem ser novamente utilizados, caracterizando o denominado ciclo ascorbato - glutatona (Bray *et al.*, 2000, Halliwell & Gutteridge 2007).

No entanto, fatores de estresse, como o ozônio, podem alterar esse balanço oxidante - antioxidante, momento em que as moléculas vitais, como lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos, podem ser danificadas pelas EAO. Assim, as consequências da ação tóxica das EAO nas plantas podem ser detectadas nos níveis bioquímicos, fisiológicos e morfológicos. Em espécies vegetais sensíveis ao ozônio, supõe - se que a capacidade de oxi - redução é pequena, de modo que o referido equilíbrio é rapidamente rompido, surgindo os sintomas foliares visíveis típicos (Muggli 1993). Plantas com tais características, inclusive, podem ser muito apropriadas para o monitoramento da presença de ozônio na atmosfera (Arndt & Schweiser 1991, Krupa & Manning 1988, VDI 2003).

Nouchi & Aoki (1979), através de experimentos de fumigação com ozônio, concluíram que plantas de *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara' são sensíveis a esse poluente, por terem surgido em suas folhas pontos cloróticos e necroses interveinais. Os autores concluíram que as necroses nestas plantas ocorreram após exposição a concentrações limites de 196 ppb por uma hora e de 76 ppb por 8 horas. Portanto, em

tese, essa cultivar é adequada para biomonitoramento de ozônio. Mas, sabe-se que o surgimento e a intensidade dos sintomas foliares visíveis, quando expostas em campo, podem ser condicionados, entre outros aspectos, por variações na capacidade de oxidação induzidas pela ação conjunta de múltiplos fatores ambientais locais. Teoricamente, quanto menos a espécie bioindicadora for perturbada por fatores de estresse meteorológicos e mais por poluentes atmosféricos, quando exposta em um dado ambiente, melhor será seu desempenho em programas de biomonitoramento. Pode-se supor, baseado nos conceitos colocados acima, que esse modelo bioindicador pode ser condicionado por respostas antioxidativas a variações nos fatores ambientais locais, sejam poluentes oxidantes ou parâmetros climáticos e que a eficiência bioindicadora dessa cultivar em uma dada condição ambiental é maior na medida em que seu sistema antioxidante for menos ativado em resposta aos fatores abióticos. As enzimas APX, GR e SOD são importantes para este processo.

OBJETIVOS

É possível, também, que sementes de mesma espécie oriundas de populações distintas possam originar plantas com respostas antioxidativas e fisiológicas diferentes. Portanto, o presente estudo se apoiou nesta hipótese e teve como objetivo avaliar comparativamente a capacidade bioindicadora de plantas de *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara' originadas de sementes adquiridas em fornecedores distintos, complementando os demais estudos que pretendem definir se essa cultivar poderá ser utilizada para biomonitoramento de poluição atmosférica por ozônio.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *I. nil* 'Scarlet O'Hara' foram adquiridas dos fornecedores Park Seed e CNSeeds, localizados nos Estados Unidos e Inglaterra respectivamente, sendo referidas neste trabalho como "pseed" e "cnseed". Estas foram germinadas em caixas plásticas (gerbox), que eram mantidas dentro de Casa de Vegetação, sob ar filtrado. Após o aparecimento das folhas cotiledonares, cada plântula foi transplantada em vaso plástico com substrato padronizado, onde foram mantidas com irrigação por capilaridade, através de 3 cordões de nylon submersos em água de torneira contidas em caixas plásticas cobertas por tela de arame, seguindo modelo proposto pelo VDI (2003). As plantas foram adubadas semanalmente com solução de Peters (NPK).

Após o aparecimento das folhas 6 e 7, (considerando a folha número um como a mais velha), 18 plantas "pseed" e 18 plantas "cnseed" foram colocadas para fora da casa de vegetação, em um ambiente caracteristicamente contaminado por O₃ (PEFI - Instituto de Botânica), sendo mantidas em estantes apropriadamente cobertas com sombrite de acordo com o VDI, por 28 dias, o que caracterizou um experimento de campo. Ao longo desse período, em três dias sorteados, retiraram-se 6 plantas de cada grupo de plantas. Realizaram-se três experimentos similares durante o inverno

e mais três durante a primavera/2008. Durante os experimentos de inverno, foram realizadas somente as análises de injúria foliar e durante os da primavera também foram realizadas as análises das enzimas antioxidantes APX, GR e SOD.

Durante todo esse período, os fatores ambientais mais importantes foram monitorados por outros integrantes da equipe, para caracterizar o comportamento dos oxidantes fotoquímicos na região.

Métodos Analíticos:

Atividade da glutatona redutase (GR)-Para a extração da enzima glutatona redutase (GR), o material vegetal foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio e logo após centrifugado. A atividade da enzima foi medida em uma mistura de reação contendo o extrato foliar, tampão fosfato, DTNB, NADPH e glutatona oxidada (GSSG) a 30°C (Ramachandra Reddy *et al.*, 2004). A reação foi iniciada a partir da adição de NADPH que permite a redução da GSSG pela enzima GR e a atividade da enzima foi medida em espectrofotômetro a 412nm, pela formação de composto formado pelo DTNB na presença de GSSG.

Atividade da superóxido dismutase (SOD)-A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada por método proposto por Oswald *et al.*, (1992), com modificações. O material vegetal foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio, ácido ascórbico e depois centrifugado. O extrato obtido foi dividido em duas alíquotas, pois este foi também utilizado para avaliar a atividade da enzima ascorbato peroxidase. A atividade da enzima SOD foi medida em uma mistura de reação contendo nitro blue tetrazolium (NBT), metionina, EDTA, tampão fosfato, riboflavina e o extrato vegetal. Após 15 minutos de exposição à luz fluorescente, mediu-se a absorvância da mistura a 560nm. Os controles de cada amostra foram protegidos da luz. A atividade da enzima foi determinada pela inibição da redução do NBT, pela dismutação enzimática do superóxido.

Atividade da ascorbato peroxidase (APX)-Para determinação da atividade da enzima APX, foi utilizada a metodologia proposta por Asada (1984), com modificações. A mistura de reação consistiu de tampão fosfato, 1mM de EDTA, ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). 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 290nm, por 2 minutos, por meio da decomposição do H₂O₂.

Sintomas foliares visíveis A porcentagem de área foliar afetada por sintomas visíveis, quando ocorreram, foi estimada visualmente, seguindo as recomendações do VDI (2003). Os resultados foram expressos em classes de 5 em 5% de área foliar danificada (média de danos nas folhas analisadas por planta). Nas medidas ao longo de cada exposição, foi estimada a porcentagem acumulada de área foliar afetada por sintomas visíveis.

Análise estatística

As diferenças na atividade das enzimas entre experimentos, em cada estação climática e entre os dias de amostragem, no mesmo experimento foram localizadas por análises de variância não paramétrica (teste de Kruskal - Wallis), seguidas de teste de comparações múltiplas (teste de Dunn).

Análise de componentes principais (PCA) foi feita para relacionar a ocorrência de injúrias foliares visíveis com a atividade dos antioxidantes.

RESULTADOS

Durante o inverno, a porcentagem de injúrias visíveis diferiu entre os dois grupos de plantas somente em dois dias de amostragem, sendo significativamente menores no grupo pseed em um dia, e no grupo cnseed no outro dia. No entanto, não houve diferenças estatísticas entre os dois lotes de plantas, quando se considerou o total de dados obtidos no inverno. Durante a primavera, em 3 dias de amostragem, a porcentagem de danos foi menor nas plantas "pseed" do que nas "cnseed". O inverso ocorreu em apenas um dia de amostragem. No total de dados obtidos na primavera, os danos nas plantas do lote pseed foram significativamente menores do que nas plantas do lote cnseed. Nesse período, maior porcentagem de danos visuais no lote cnseed pode ser atribuída não somente ao ozônio, mas também a fatores de herbivoria e patógenos.

A atividade da APX foi similar nas plantas dos lotes pseed e cnseed expostas na primavera. Para a enzima GR, houve diferenças apenas em dois dias do terceiro experimento realizado nessa estação, quando se observaram maiores atividades nas plantas "pseed". No segundo experimento da primavera, a atividade de GR no lote pseed foi significativamente menor que em cnseed, enquanto no terceiro experimento a atividade foi menor no lote cnseed.

A análise de componentes principais indicou que atividade de APX nas plantas do grupo pseed esteve associada à ocorrência de danos e inversamente relacionada à atividade de GR. Para o lote cnseed a mesma análise indica que a enzima GR esteve associada à ocorrência de danos e a atividade de SOD e inversamente relacionada à atividade de APX.

A atividade da enzima GR foi mais variável na primavera, período com baixas concentrações de ozônio. Para o lote cnseeds, a menor atividade de GR na terceira exposição da primavera pode indicar um desequilíbrio no sistema antioxidante, que possivelmente contribuiu com a maior ocorrência de danos em comparação ao lote pseed.

Verificou-se, assim, que quando o ozônio esteve em maiores concentrações no inverno, as plantas cultivadas a partir dos dois lotes de sementes pareceram manifestar danos de modo semelhante. Entretanto, durante a primavera, num período de concentrações mais baixas de ozônio, as plantas "cnseed" aparentemente foram mais suscetíveis a outros fatores causadores de danos, entre os quais herbivoria e patógenos, como mencionado anteriormente, resultando em maior porcentagem de danos, em comparação ao outro lote. Isto parece indicar que o lote de sementes da Park Seed produziu plantas mais vigorosas e com respostas mais homogêneas.

CONCLUSÃO

A menor interferência de fatores externos à contaminação por ozônio, tanto em termos de danos visuais quanto na atividade dos antioxidantes, parece indicar que o lote pseed é uma melhor alternativa para produção de plantas para uso da espécie em programas de biomonitoramento.

(Agradecemos Fapesp - 05/511695, Cnpq e Capes)

REFERÊNCIAS

- Arndt U & Schweizer B. 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In: Biological monitoring. Signals from the environment (Ellenberg *et al.*, eds.). Vieweg, Eschborn, pp. 199 - 298.
- Asada, K. 1984. Assay of ascorbate - specific peroxidase. *Methods Enzymological*, v.105, p.427 - 429.
- Bray EA, Bailey - Serres J & Werentilnyk E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Buchanan BB, Gruisen W & Jones RL, eds.) American Society of Plant Physiologists (USA), New York, pp. 1158 - 1203.
- Burkey, K.O., Neufeld, H.S., Souza, L., Chappelka, A. H., Davison, A. W. 2006. Seasonal profiles of leaf ascorbic acid content and redox state in ozone - sensitive wildflowers. *Environmental Pollution* 143: 427-434.
- CETESB. 2008. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo 2007. Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. P.284.
- Emberson LD, Ashmore MR, Murray F, Kuylenstierna JCI, Percy KE, Izuta T, Zheng Y, Shimizu H, Sheu BH, Liu CP, Agrawal M, Wahid A, Abdel - Latif NM, Van Tienhoven M, Bauer LI & Domingos M. 2001. Impacts of air pollutants on vegetation in developing countries. *Water, Air and Soil Pollution* 130 (1/4): 107 - 118.
- Guderian, R. 1985. Air Pollution by photochemical oxidants: formation, control and effects on plants. Springer Verlag, Berlin.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. 2007. Free Radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford University Press. pp. 1-851.
- Krupa SV, Manning WJ. 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environ Pollution*. 50(1 - 2):101 - 37.
- Muggli R. 1993. Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In: *Free radicals and antioxidants in nutrition* (F. Corongiu, S. Banni, M.A. Dessi and C. Rice - Evans eds) Richelieu Press, London, p. 189 - 250.
- Nouchi I & Aoki K. 1979. Morning glory as a photochemical oxidant indicator. *Environmental Pollution* 18: 289 - 303.
- Oswald, W.F., Kraus, R., Hipelli, S., Benz, B., Volpert, R., Elstner, E.F. 1992. Comparison of the enzymatic activities of dehydroascorbic acid reductase, glutathione reductase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst). *Plant Physiology*, v.139, p.742 - 748.
- Rachamandra RA, Chaitanya KV, Jutur PP, Sumithra K. 2004. Diferencial antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environmental and Experimental Botany*.
- 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 phytotoxic effects of photooxidants. Method of the standardized tobacco exposure. VDI 3957. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol.1 Beuth, Berlin.