



FLUORESCÊNCIA TRANSIENTE DA CLOROFILA A (O - J - I - P) EM ORQUÍDEAS INFECTADAS POR *PLANOCOCCUS CITRIS*

L.C. Oliveira (1)

D.D.C. Figueredo (1); F.C. Teotônio (1); R.F.A. Silva (1); M. B. Silva (1); D.M. Silva (2); A.R. Falqueto (1,2)

1 - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Departamento de Ciências da Saúde, Biológicas e Agrárias, Rodovia BR 101 Norte, Bairro Litorâneo, CEP 29932 - 540, São Mateus, ES. 2 - Programa de pós - graduação em biologia vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Av. Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras, 29075 - 910, Vitória, Espírito Santo, Brasil. laiss_caneva@hotmail.com; antelmofalqueto@ceunes.ufes.br

INTRODUÇÃO

O ataque de cochonilhas [*Planococcus citri* (Risso)] é comum em orquidários do Município de São Mateus, norte do Estado do Espírito Santo. Os sintomas característicos da infestação podem ou não serem expressos nas plantas. Fatores ambientais como temperatura, luz e estado nutricional influenciam o grau de infecção das plantas pelas cochonilhas.

Plantas doentes geralmente apresentam como sintoma inicial, folhas amareladas. Porém, em casos de infecções severas, o aparecimento de manchas necróticas e deformações na lâmina foliar são comuns (Chia & He, 1999). Tem sido mostrado que a perda de clorofila é o principal fator associado com o amarelecimento das folhas, com subsequente redução da atividade fotossintética das plantas (Balachandran *et al.*, 1997)

Maxilaria porphyrostele Rchb., uma Orquídeacea tropical, é, por muitos anos, intensivamente cultivada por orquidófilos da região norte do Espírito Santo. Entretanto, as dificuldades em torno do cultivo e manutenções adequadas das condições sanitárias dos viveiros são muitas. Neste sentido, até o momento, nenhum estudo sobre o comportamento ecofisiológico de *M. porphyrostele* em resposta à infecção por patógenos foi conduzido. Um estudo neste âmbito possibilitaria a produção de orquídeas livres de patógenos, e, portanto, de alta qualidade comercial e doméstica. Assim, o monitoramento dos sintomas da infecção por cochonilhas assume grande importância para a fortificação do mercado de orquídeas no norte do Estado do Espírito Santo, garantindo renda para muitas famílias, bem como a preservação do patrimônio genético de orquídeas tropicais do Espírito Santo.

A determinação dos efeitos de infecções patogênicas em orquídeas tem sido realizada, por alguns pesquisadores, utilizando - se o teste de ELISA (Khentry *et al.*, 006). Este método é rotineiramente usado para o monitoramento

de infecções viróticas em orquídeas, por ser um método econômico, apresentar elevada sensibilidade e permitir que um grande número de amostras sejam testadas. Em orquídeas tropicais do gênero *Oncidium*, a capacidade fotossintética das plantas infectadas por vírus foi investigada por meio de estimativas das trocas gasosas e da eficiência fotoquímica do fotossistema II (razão FV/FM) (Chia & He, 1999).

A fluorescência da clorofila a pode ser uma medida da eficiência fotossintética e fornecer informações importantes sobre a relação estrutural e funcional dos centros de reação do fotossistema II. A técnica constitui uma importante ferramenta para estudos de monitoramento sendo, assim, muito usada em pesquisas agrônomicas, florestais, marinhas, ecotoxicológicas e ecofisiológicas. A diagnose e detecção de vários fatores de estresse usando esta técnica não destrutiva é indubitavelmente de grande utilidade. Neste estudo, medidas da fluorescência transiente da clorofila a foram usadas para caracterizar os efeitos da infecção por cochonilhas em orquídeas cultivadas no norte do Estado do Espírito Santo.

OBJETIVOS

Analisar a fluorescência transiente da clorofila a em *Maxilaria porphyrostele* Rchb. infectadas por cochonilhas visando definir os padrões de comportamento dos centros de reação do fotossistema II bem como avaliar o monitoramento da fluorescência da clorofila como uma possível ferramenta na diagnose da infecção por cochonilhas em orquídeas

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Plantas de *Maxilaria porphyrostele* Rchb., uma das espécies de orquídeas mais abundantes nos orquidários do Município de São Mateus - ES foram usadas neste estudo. As plantas analisadas foram fornecidas por orquidófilos locais e mantidas em viveiros sob 50% de sombreamento (800 - 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa a meio-dia), temperatura média de 30°C (dia) 24°C (noite). As plantas eram irrigadas diariamente e, a cada quinze dias, adubadas com fertilizantes à base de nitrato (NPK comercial). No período de realização deste estudo, cerca de 50% das plantas apresentavam algum sintoma causado pelo ataque de cochonilhas [*Planococcus citri* (Risso)]. Plantas livres de sintomas visíveis foram usadas como controle. Todas as medidas fotossintéticas foram feitas em folhas jovens completamente expandidas (terceira folha do ápice à base). Antes de cada medida, as folhas foram mantidas no escuro por 30 minutos, usando-se cliques foliares (*Hansatech*).

Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente ou polifásica (O - J - I - P) da clorofila *a*

A fluorescência transiente da clorofila *a* foi medida em folhas jovens totalmente expandidas, utilizando-se um fluorômetro portátil (HandyPEA, Hansstech, King's Lynn, Norfolk, UK). As medidas foram realizadas sempre no período da manhã em folhas previamente adaptada ao escuro (uso de cliques foliares) durante 30 minutos. Os sinais de fluorescência foram registrados a cada 10 μs durante 1 s de iluminação (3000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A intensidade de fluorescência aos 50 μs foi considerada com sendo F0 (Strasser & Strasser, 1995). Os dados originados da curva O - J - I - P da fluorescência foram derivados de acordo com o teste JIP usando o programa BIOLYSER (Biolyser © R.M. Rodriguez, The Bioenergetics Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland). O teste JIP define o máximo fluxo de energia em termos de absorção (ABS), captura ("trapping", TR0), transporte de elétrons (ET0) e dissipação (DI0) e sua relação com sinais da fluorescência (Ft) entre F0 e FM. A partir destas variáveis basais, calculou-se a eficiência fotoquímica máxima do FSII (FV/FM = TR0/ABS). Atualmente, o uso de instrumentos de alta resolução tem permitido a aquisição, em escala de microssegundos, da inclinação da origem do aumento da fluorescência O - J - I - P (dF/dt0), permitindo o cálculo do fluxo de energia capturada por centro de reação ativo (TR0/RC) e do tamanho médio do sistema antena de captura de energia (ABS/RC). A intensidade de fluorescência obtido aos 2 ms (ponto J) possibilita estimar a probabilidade de redução da QA (QA+QA-) por elétrons movidos através da cadeia de transporte de elétrons [ET0/TR0 = (FM - FJ)/(FM - F0)]. ET0/TR0 é diretamente relacionado à redução do pool de plastoquinonas. O fluxo específico de dissipação da energia em nível de sistema antena (DI0/RC), que representa a razão da dissipação total de energia de excitação não capturada nos centros de reação em relação aos centros de reação ativos, o transporte de elétrons excitados (ET0/RC), que considera a reoxidação de QA - através da cadeia de transporte de elétrons, o índice de centros de reação ativos por sessão transversal excitada (RC/CS0) e a probabilidade de transporte de elétrons (ET0/TR0) que indica a probabilidade de um elétron que esteja no receptor QA seguir na cadeia de elétrons foram analisados (para maiores detalhes,

consultar Christen *et al.*, 007).

Análise estatística

Os gráficos dos sinais da fluorescência transiente O - J - I - P foram obtidos automaticamente pelo programa Handy - PEA (*Hansatec*). Os dados obtidos pelo teste JIP foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando os valores de F foram significativos, realizou-se teste de médias de acordo com Tukey (P < 0,05 e P < 0,01).

RESULTADOS

Grande parte das espécies de orquídeas cultivadas no Município de São Mateus - ES apresenta algum tipo de infecção por vírus, fungos ou alguma espécie de inseto. O ataque por insetos pode representar um problema sério na comercialização de flores, por reduzir a produção de orquídeas de alta qualidade tanto em nível de exportação como em nível de cultivo doméstico. Assim, a detecção precoce de infecções, por alguma técnica de monitoramento, torna-se de grande relevância. Neste estudo, medidas da fluorescência da clorofila *a* foram usadas como uma ferramenta potencial na detecção dos efeitos da infecção por cochonilhas em orquídeas cultivadas no Município de São Mateus, norte do Estado do Espírito Santo. Para conhecer as características da produção polifásica da fluorescência transiente da clorofila *a* (O - J - I - P) após ataque por cochonilhas, os dados de plantas infectadas e não - infectadas (saudáveis) foram comparados.

No presente estudo, os parâmetros da fluorescência da clorofila avaliados mostraram diferenças significativas entre plantas infectadas e saudáveis. As plantas infectadas por cochonilhas apresentaram menor porte e folhas amareladas, manchas cloróticas e deformações nas folhas. Geralmente, reduções no conteúdo de clorofila estão associadas ao amarelecimento das folhas. Em orquídeas do gênero *Oncidium*, a infecção por vírus reduziu a concentração de clorofila nas folhas, causando seu amarelecimento (Chia & He, 1999). Assim, o amarelecimento das folhas de orquídeas infectadas pode ser devido à redução nos teores de clorofila.

É de consenso geral que as infecções patogênicas em plantas são associadas com decréscimos na capacidade fotossintética das plantas. Neste sentido, o emprego de técnicas de monitoramento, como o da fluorescência transiente da clorofila *a*, poderia fornecer dados que nos levariam a uma melhor compreensão dos eventos que ocorrem durante os processos de infecção. Neste estudo, as curvas O - J - I - P da fluorescência da clorofila *a*, as quais apresentam um comportamento ascendente polifásico, mostraram um comportamento típico para as plantas saudáveis. A magnitude dos sinais de fluorescência aumentou desde um nível basal, ou F0, até um nível máximo (FM) com os pontos intermediários J e I bem definidos. Além disso, o tempo requerido para se atingir o ponto máximo da produção de fluorescência foi 209 e 304 ms nas plantas saudáveis e infectadas, respectivamente. Estes resultados indicam que a infecção por cochonilhas aumenta a extensão do período de produção dos sinais da fluorescência, o que, por conseguinte, reflete no retardo das reações de transferência de elétrons dos centros de reação do fotossistema II para os aceptores iniciais de elétrons da cadeia de transporte de elétrons da

fotossíntese. Ao contrário, a aparência polifásica da curva O - J - I - P nas plantas infectadas mostrou - se muito distinta quando comparada àquela obtida para as plantas saudáveis. A produção dos sinais da fluorescência inicial ou basal aumentou significativamente nas plantas infectadas. Incrementos de F0 refletem danos aos centros de reação do FSII sendo considerados, por alguns autores, um sinal de inibição da fotossíntese ou fotoinibição (Jiã *et al.*, 003). Aumentos em F0 estão associados a danos no lado aceptor do FSII. Em outros estudos, elevados valores de F0 estão associados a baixos valores do índice de desempenho (PIABS). A expressão "vitalidade" não é um termo rigorosamente definido em ecofisiologia vegetal. Para plantas, ele é expresso pela combinação de parâmetros associados à atividade, estabilidade, sensibilidade e resistência ao estresse (Christen *et al.*, 007).

As plantas infectadas foram caracterizadas também por apresentarem declínios na produção máxima dos sinais de fluorescência ou FM. Reduções em FM são indicativos da debilidade do FSII em reduzir a plastoquinona A (QA), o aceptor primário de elétrons.

Muito embora diferenças marcantes na produção dos sinais basais e máximos da fluorescência da clorofila tenham sido observadas como resultado da infecção por cochonilhas, nenhuma variação significativa na eficiência fotoquímica máxima do FSII (FV/FM) foi observada entre plantas saudáveis e infectada. Assim, a razão FV/FM, frequentemente o único parâmetro da fluorescência da clorofila usado para diagnosticar a ocorrência e extensão de alterações fisiológicas nas plantas, pode não ser uma ferramenta muito sensível. Esta relativa insensibilidade de FV/FM já havia sido relatada por Strasser *et al.*, (2000). Porém, a relação FV/F0, que também expressa a eficiência de captura de energia luminosa no FSII, tem dado boas indicações da eficiência fotoquímica máxima do FSII. A diferença entre os parâmetros está apenas na amplitude em que os valores são apresentados. Neste estudo, pelo fato dos valores da razão FV/F0 apresentarem maior amplitude, representaram com maior clareza às discretas variações na eficiência fotoquímica entre as plantas infectadas e saudáveis.

A área acima da curva de fluorescência entre F0 e FM também se reduziu em função da infecção por cochonilhas. A avaliação da área da curva da fluorescência tem um grande significado biológico, por dar um indicativo do tamanho ou dimensão do FSII, incluindo o *pool* de QA e QB (Strasser *et al.*, 995). Além disso, o decréscimo do tamanho do *pool* de aceptores de elétrons foi consistente com o aumento do fechamento dos centros de reação do FSII e com a redução no tempo requerido para a redução de QA (T_{FM}), como observado pela análise da fluorescência variável relativa em 2 ms ($VJ = (F_{2ms} - F_0) / (FM - F_0)$) e M0, medida da taxa líquida na qual a QA reduzida pode ser reoxidada via transporte de elétrons além de si, respectivamente.

A infecção por *P. citri* também causou um aumento significativo em DI0/RC. O aumento na taxa de dissipação está, de maneira geral, acoplada com aumentos em F0 (F50 μ s) em muitas espécies. Este incremento na taxa de dissipação, associado àqueles obtidos para F0 podem indicar que as folhas das orquídeas atacadas por cochonilhas foram fotoinibidas. Como já mencionado, o fenômeno da inibição

a fotossíntese tem sido convenientemente medido por meio da análise da razão FV/FM, após adequada adaptação das amostras foliares ao escuro, bem como de incrementos nos níveis da fluorescência inicial, F0. Enquanto DI0/RC refere - se à taxa de dissipação total da energia de excitação não capturada pelos centros de reação em relação ao número de centros de reação ativos, DI0/CS, um outro parâmetro da fluorescência da clorofila denotando também aspectos de dissipação, reflete a dissipação total medida por seção transversal ("cross - section") da amostra contendo centros de reação ativos e inativos (Force *et al.*, 2003). Dissipação, neste contexto, refere - se à perda da energia absorvida na forma de calor, fluorescência e transferência de energia a outros sistemas (Strasser *et al.*, 2000), e é representada pela equação $[DI0/RC = (ABS/RC) - (TR0/RC)]$. Não obstante, o termo "dissipação" pode fazer referência também à absorção de fótons em excesso, ou seja, suficientemente alto para ser capturado pelos centros de reação do FSII. Os valores de DI0/RC podem ser influenciados pela razão de centros de reação ativos/inativos. Assim, por meio da análise de DI0/RC pode - se estimar a proporção de centros de reação inativos na amostra foliar e a máxima energia perdida na forma por dissipação.

Por fim, a infecção das orquídeas por cochonilhas também resultou em aumentos nas taxas de captura máxima por centro de reação (TR0/RC). Estes acréscimos em TR0/RC nas plantas sob injúrias refletiram também no aumento do tamanho efetivo de um centro de reação ativo (ABS/RC). Estes dois parâmetros são relacionados através da equação $ABS/RC = (TR0/RC) / (TR0/ABS)$ (Force *et al.*, 003).

CONCLUSÃO

No presente estudo observou - se que a infecção de *Maxillaria porphyrostele* Rchb., uma Orquídea tropical comum nos orquidários do norte do Espírito Santo, por *Planococcus citri* esteve associada a expressivas reduções na capacidade fotossintética das plantas, como evidenciado pela análise dos parâmetros da fluorescência transiente O - J - I - P da clorofila a. A aparência polifásica da curva O - J - I - P nas plantas infectadas mostrou - se muito distinta quando comparada àquela obtida para as plantas saudáveis, e foram caracterizadas por elevados valores da fluorescência inicial ou basal (F0) e declínios significativos na produção máxima dos sinais de fluorescência (FM). Não houve variação significativa na eficiência fotoquímica máxima do FSII (FV/FM). Entretanto, a infecção por cochonilhas resultou em decréscimos do tamanho do *pool* de aceptores de elétrons (Área), os quais foram consistentes com o aumento do fechamento dos centros de reação do FSII (VJ) bem como com a redução no tempo requerido para a redução de QA (T_{FM}). Como era previsto, o ataque do patógeno causou um aumento significativo na taxa de dissipação da energia de excitação (DI0/RC), muito embora tenham sido observados aumentos nas taxas de captura máxima por centro de reação (TR0/RC). Estes acréscimos em TR0/RC nas plantas sob injúrias refletiram também no aumento do tamanho efetivo de um centro de reação ativo (ABS/RC). Os resultados obtidos mostram que a técnica da fluorescência da clorofila é muito sensível na detecção dos

efeitos da infecção por cochonilhas em orquídeas, e, portanto, adequada para a avaliação das alterações estruturais e funcionais do sistema fotossintético de plantas submetidas a estresse biótico.

REFERÊNCIAS

- Balachandran, S., Hull, R.J., Martins, R.A., Vaadia, Y., Lucas, W.J. 1997. Influence of environmental stress on biomass partitioning in transgenic tobacco plants expressing the movement protein of tobacco mosaic virus. *Plant Physiol.*, 114: 475-481.
- Chia, T - F. & He, J. 1999. Photosynthetic capacity in *Oncidium* (Orchidaceae) plants after virus eradication. *Env. Exp. Bot.*, 42: 11-16.
- Christen, D., Schonmann, S., Jermini, M., Strasser, R. J., Défago G. 2007. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Env. Exp. Bot.*, 60: 504 - 514.
- Force, L., Critchley, C., Rensen, J.J.S. 2003. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynth. Res.*, 78: 17 - 33.
- Jiao, D., Ji, B., Li, X.. 2003. Characteristics of chlorophyll fluorescence and membrane - lipid peroxidation during senescence of flag leaf in different cultivars of rice. *Photosynthetica*, 41, 33 - 41.
- Khentry, Y., Paradornuwat, A., Tantiwiwat, S., Phansiri, S., Thaveechai, N. 2006. Incidence of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ringspot virus in *Dendrobium* spp. in Thailand. *Crop Prot.*, 259: 926-932.
- Pospisil, P. & Dau, H. 2000. Chlorophyll fluorescence transients of Photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth. Res.*, 65: 41 - 52.
- Strasser, B.J, Strasser, R.J. 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental question: The JIP - Test. In: Mathis, P., (ed). *Photosynthesis: from light to biosphere*. The Netherlands, Kluwer Academy Publisher, Dordrecht, p. 977 - 980.
- Strasser, R.J., Srivasta, A., Tsimilli - Michel, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus, M., Pathre, U., Mohanty. P., (eds). *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*. London, Talor and Francis, p. 445 - 483.