

INFLUÊNCIA CLOROPLASTÍDICA E EXTRA-CLOROPLASTÍDICA NOS PADRÕES ÓPTICOS DAS FOLHAS

Marina Ellen Giacomelli (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Thaise Moriwaki, Werner Camargos Antunes (Orientador), e-mail: marina.ellen@outlook.com.

Universidade Estadual de Maringá /Departamento de Biologia /Maringá, PR.

Área e subárea: Fisiologia Vegetal, Fisiologia das Plantas Cultivadas.

Palavras-chave: assinatura espectral, cloroplasto, folhas variegadas, pigmentos.

Resumo:

Os pigmentos fotossintéticos são responsáveis por grande parte da absorção da luz no espectro do visível (400-700 nm). No entanto, as propriedades físicas e químicas da folha influenciam fortemente os parâmetros espectrais, o que torna difícil separar os efeitos decorrentes da interação da luz com os pigmentos nos cloroplastos e a parte estrutural (extra-cloroplastídica). Uma importante ferramenta para este tipo de estudo é a utilização de folhas variegadas. Através de cruzamento de dados de refletância, transmitância e absorvância da luz com análises anatômicas de folhas albinas (sem pigmentos) e verdes da espécie *Hibiscus rosa-sinensis* "Variegata" bem como de folhas amarelas (com carotenoides, porém sem clorofilas) e verdes da espécie *Codiaeum variegatum*, buscou-se demonstrar qualitativamente os efeitos combinados da estrutura física e de seus pigmentos sobre a assinatura espectral das folhas. Os resultados mostram que os pigmentos cloroplastídicos respondem pela maior parte da absorvância foliar da luz no espectro do visível, sendo baixa a interferência extra-cloroplastídica nessa faixa espectral.

Introdução

As plantas dependem da luz para regular e conduzir várias respostas e processos fisiológicos no seu crescimento e desenvolvimento. A fotossíntese inicia-se na captura da energia luminosa por uma rede de pigmentos fotossintéticos. As clorofilas são essenciais para a conversão de energia luminosa em energia química armazenada em moléculas orgânicas complexas, assim como os carotenoides são responsáveis pela dissipação do excesso de energia que chega ao complexo antena. Assim, as variações no conteúdo dos pigmentos podem fornecer informações sobre o estado fisiológico das plantas.

A maior parte das análises envolvendo pigmentos fotossintéticos são realizadas através de métodos que envolvem a extração e quantificação por espectrofotometria, no entanto, não são representativas da condição *in vivo*. Não obstante, a folha é constituída por diversos componentes celulares como celulose nas paredes celulares, proteínas e lipídios, substâncias fenólicas, além de água contendo outros solutos. Ainda uma estrutura compartimentalizada de organelas incluindo o cloroplasto. Essa complexidade dificulta a análise da absorvância exclusiva dos pigmentos fotossintéticos uma vez que a radiação que chega à superfície da folha também interage com os componentes extra-cloroplastídicos.

Neste sentido, uma importante ferramenta para este tipo de estudo seria utilização de folhas variegadas. A variação de plantas é caracterizada pela presença de

setores brancos (albinos) ou amarelos em tecidos e órgãos normalmente verdes. Enquanto os setores albinos contêm alterações a níveis de plastídios e não possuem pigmentos fotossintéticos, e os setores amarelos possuem carotenoides, mas não clorofilas, os setores verdes contêm cloroplastos estruturalmente normais. Plantas variegadas podem auxiliar na distinção dos efeitos da estrutura foliar sobre as propriedades ópticas da folha que normalmente são mascarados pela presença de outras substâncias. Através de cruzamentos de dados entre os parâmetros espectrais de folhas verdes, albinas e amarelas, e perfis anatômicos pode-se avaliar as características específicas das propriedades ópticas de uma folha.

Materiais e métodos

1- Material vegetal: folhas variegadas das espécies *Hibiscus rosa-sinensis* “Variegata” e *Codiaeum variegatum*, disponíveis no Horto Didático do Departamento de Biologia na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

2- Análise dos parâmetros espectrais da folha *in vivo*: pequenos setores albinos e pigmentados, amarelos e verdes, foram coletados das folhas variegadas e imediatamente avaliado o espectro da reflectância (R) e transmitância (T) diretamente por meio de acoplamento de dois espectrorradiômetros (ASD inc; Fild Spec® 3) calibrados e colimados antes do uso. A absorbância (A) foi considerada como sendo a fração calculada pela equação $A = 1 - (R+T)$.

3- Determinação da curva de absorção de pigmentos extraídos: segmentos de 2 cm² de limbo de setores albinos e pigmentados, amarelos e verdes, foram utilizados para quantificação dos teores de clorofilas e carotenoides totais. A extração foi realizada com imersão, no escuro e em temperatura ambiente, por 24 horas em solução de acetona 80:20 (v/v) saturada com CaCO₃. Para leitura do espectro de absorção (400-700 nm) foi utilizado um espectrofotômetro (Shimadzu UV-2450 com software UV-Probe v.2.34, Shimadzu Corporation, Japan).

4- Análises de microscopia óptica: Foram cortadas seções à mão livre da epiderme do material fresco para observação dos estômatos. Em adição, seções de limbo foliar dos setores albinos e pigmentados, amarelos e verdes, das folhas variegadas foram fixadas em solução Karnovsky modificada contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,05 M (Karnovsky, 1965) mantidas na solução por no mínimo 1 hora. Foi realizada a desidratação em série de soluções alcoólicas (50, 70, 80, 90, 95 e 95%), e posterior infiltração e inclusão em historesina (Leica®, Historesin). Em seguida as amostras foram cortadas em micrótomo de mão para confecção de lâminas semi-permanentes conforme metodologia descrita em Souza et al. (2005). As imagens digitais foram obtidas em microscópio (Leica) acoplado a um computador com o software Leica Application Suite®. As medidas foram realizadas com auxílio do software Image-Pro-Plus® v.4.5 e calibrados com uso de lâmina de referência de medição.

Resultados e Discussão

Apesar de os pigmentos fotossintéticos serem responsáveis pela maior parte da absorção da luz no espectro do visível, há uma interação da luz com a própria estrutura foliar, uma vez que esta é constituída por diversos componentes celulares. As folhas albinas apresentam maiores fatores de reflectância e de transmitância que as folhas pigmentadas, já que estas, teoricamente, não possuem pigmentos capazes de absorver a luz. Para a espécie *C. variegatum*, efeito similar ocorre com as folhas

amarelas, as quais não possuem clorofilas, mas contém carotenoides. No entanto, ressalta-se que as assinaturas espectrais são distintas entre si (Figura 1).

Nas folhas albinas, há alguma absorção da luz na faixa correspondente ao violeta e azul, além de um pico característico de absorção de luz por clorofilas em 674 nm (vermelho). No entanto, as células parenquimáticas das folhas albinas se mostram ausentes de cloroplastos, e conseqüentemente sem clorofilas. Ao analisar mais detalhadamente, na epiderme abaxial das folhas albinas foram identificadas nas células guarda a presença de cloroplastos. Logo, o pico de absorbância encontrado nas folhas albinas, é resultante do efeito das clorofilas presentes nas células guarda. Ainda, as células guardas dos setores albinos tem aparência similar aos setores não mutantes e característica da planta em estudo, conforme apresentado na Figura 2. O fato de esta absorção da luz pela folha albina não ter sido encontrada na análise da absorbância de pigmentos "in vitro", se deve a baixa concentração de pigmentos. Entretanto, usando-se metodologias diferentes foi possível identificar a sua interferência sobre a assinatura espectral da folha.

O padrão de absorbância das folhas verdes de *C. variegatum* é comum à demais folhas verdes já mensuradas. No entanto, na folha amarela, considerando a presença dos carotenoides, mas não de clorofilas, possui maior absorbância de luz violeta e azul-esverdeada, apresentando inflexão dos 350 até 500 nm, em seguida, a absorbância decresce acentuadamente. Esse fenômeno separa o efeito dos carotenoides e da estrutura da folha, do efeito de absorção de luz pelas clorofilas.

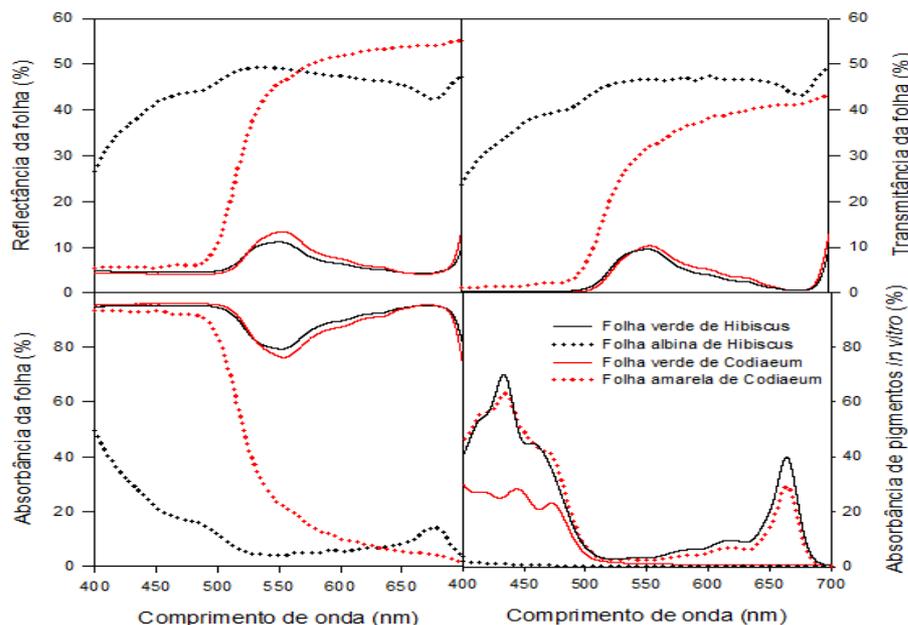


Figura 1– Dados de reflectância, transmitância, absorbância de folhas e pigmentos *in vitro* das espécies *Hibiscus rosa-sinensis* 'Variegata' e *Codiaeum variegatum*.

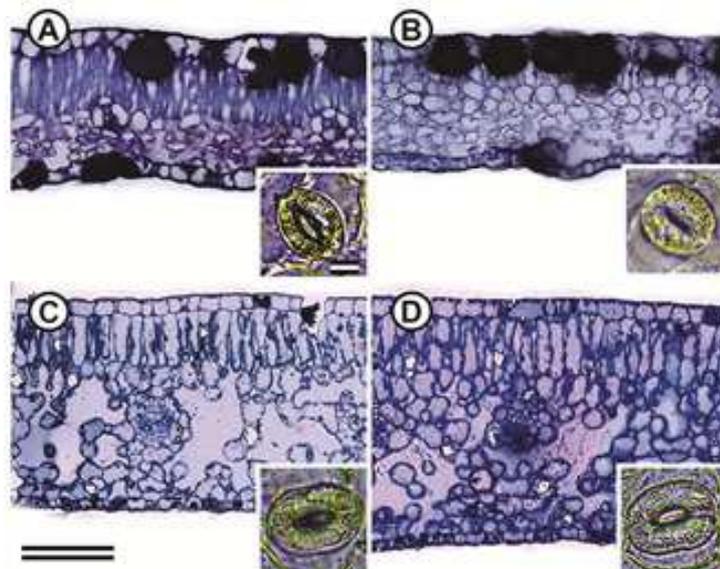


Figura 2- Imagens de microscopia óptica do mesófilo e estômatos de folhas verdes (A) e albinas, evidenciando a ausência de cloroplastos nas células mesofílicas (B) da espécie *Hibiscus rosa-sinensis* “Variegata” e folhas verdes (C) e amarelas (D) da espécie *Codiaeum variegatum*. Pontos escuros nos cortes de *Hibiscus* demonstram acúmulo de mucilagem. Escala: 50 μ m.

Conclusões

A assinatura óptica de folhas albinas mostram alguma interferência de componentes extra-cloroplastídicos em comprimentos de onda correspondentes ao violeta e ao azul, possivelmente sobre efeito das substâncias fenólicas presentes nas células. Ainda, em folhas amarelas demonstra-se um forte efeito dos carotenoides em comprimentos de onda inferiores a 500 nm. De maneira inesperada, folhas albinas (ou setores albinos das folhas) apresentam células-guarda com pigmentos e morfologia similares àquelas de folhas verdes, cuja interferência espectral pôde ser detectada. De modo geral, os pigmentos cloroplastídicos respondem pela maior parte da absorbância foliar da luz no espectro do visível, sendo baixa a interferência extra-cloroplastídica nessa faixa espectral.

Agradecimentos

Agradeço ao PIBIC/CNPq-UEM, ao prof. Dr. Werner Camargos Antunes e a toda a equipe que me ajudou na realização deste projeto.

Referências

SOUZA L.A., ROSA S.M., MOSCHETA I.S., MOURÃO K.S.M., RODELLA R.A., ROCHA D.C., LOLIS MIGA. **Morfologia e anatomia vegetal: técnicas e práticas**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2016.

KARNOVSKY M.J. **A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy**. The Journal of Cell Biology v.27, 137A, 1965.