

Fluorescência das clorofilas em plantas de batata doce (*Ipomoea batatas* L.) cultivadas *in vitro* e aclimatizadas

Francine Ferreira Cassana¹, Claudia Simone Madruga Lima², Antelmo Ralph Falqueto³, Marcos Antonio Bacarin⁴, Eugenia Jacira Bolacel Braga⁴ e José Antonio Peters⁴

Introdução

A batata doce (*Ipomoea batatas* L.) é uma planta dicotiledônea, pertencente à família Convolvulaceae, que agrupa, aproximadamente, 50 gêneros e mais de 1.000 espécies e, somente, a batata doce tem cultivo de expressão econômica [1].

A sacarose é importante como fonte de carbono para tecidos cultivados *in vitro*, em virtude das características heterotróficas do processo. A concentração de sacarose normalmente utilizada varia entre 1% a 3% [2], entretanto, estes níveis podem inibir a síntese de clorofila [3]. Na presença de açúcares, as plantas não desenvolvem capacidade fotoautotrófica, podendo ocorrer crescimento reduzido e morte de mudas durante a fase de aclimatização [4]. A redução da concentração de sacarose no meio de cultura resultou na melhoria da capacidade fotossintética de plantas de coco, porém, estas mostraram crescimento limitado em consequência da baixa densidade de fluxo de fótons utilizado no experimento [5].

A análise 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, estudos das mudanças conformacionais dos tilacóides [6], bem como um aumento no conhecimento dos processos fotoquímicos e não fotoquímicos que ocorrem na membrana dos tilacóides dos cloroplastos [7].

Por ser um método sensível e não destrutivo, a fluorescência das clorofilas permite rápidas informações sobre os processos no aparato fotossintético e, conseqüentemente, do estado fisiológico de vegetais, tendo tornado-se uma importante ferramenta na investigação da fisiologia básica e aplicada [6].

Este trabalho teve como objetivo determinar as características de fluorescência das clorofilas de plantas de batata doce, cultivar ILS19, na condição de cultivo *in vitro* e *ex vitro*.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas e na casa de vegetação do

Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UFPel.

Explantos de batata doce cv. ILS19, constituídos por nós contendo uma gema axilar, com cerca de 1 cm de comprimento, foram inoculados em meio MS [8], contendo diferentes concentrações de sacarose (5, 10, 20, 30 ou 40 g L⁻¹). Aos diversos meios foi acrescentado 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 0,5 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP). O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição de agar (7g L⁻¹). Os meios foram distribuídos em frascos erlenmeyers de 250mL e selados com algodão. A esterilização dos meios de cultura foi feita por autoclavagem (121°C e 1,5 atm por 20 minutos).

O desenvolvimento *in vitro* foi realizado, durante 60 dias, em sala de crescimento a uma temperatura de 25°C durante o período claro e 23°C durante o período escuro, fotoperíodo de 16 horas e diferentes densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, 14, 21, 42 ou 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, estipuladas através de um sensor quântico (Hansatech QSRED).

Ao término do cultivo *in vitro* foi determinada a eficiência fotoquímica máxima do Fotossistema II (F_v/F_m) na segunda folha a partir do ápice de cada planta, utilizando-se fluorômetro modulado (FMS 2, Hansatech, King's Lynn, UK).

Após uma semana de aclimatização das plantas em casa de vegetação, foi repetida a determinação da relação F_v/F_m , na mesma folha originada da cultura *in vitro*.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x4x5, com cinco meios de cultura, quatro densidades de fluxo de fótons e duas condições de cultivo (*in vitro* e *ex vitro*), sendo quatro repetições. Cada repetição constou de um frasco contendo cinco explantes.

A análise estatística foi realizada pelo Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores – SANEST [9], e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade de erro.

Resultados e Discussão

A razão F_v/F_m expressa a eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do

1. Mestranda do PPG em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário, Pelotas-RS, CEP 96010-900. E-mail: frafc@ibest.com.br

2. Estudante de Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), Universidade Federal de Pelotas. Campus universitário, Pelotas-RS, CEP 96010-900.

3. Doutorando do PPG em Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas. Campus universitário, Pelotas-RS, CEP 96010-900.

4. Professor Adjunto do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas. Campus universitário, Pelotas-RS, CEP 96010-900.

Apoio financeiro: CAPES.

Fotossistema II [6;10], o que pode representar a eficiência quântica do transporte de elétrons através do Fotossistema II [11]. Nas plantas cultivadas *in vitro*, verificou-se que a relação F_V/F_M decresceu quando submetidas a 42 e 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 5 g L^{-1} de sacarose no meio de cultivo (Fig. 1A). Entretanto quando as plantas foram mantidas em densidade de fluxo de fótons mais baixas (14 e 21 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), não foi observado efeito da concentração de sacarose e a razão F_V/F_M mantém-se praticamente constante (Fig. 1A).

Para o tratamento com 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ observou-se, *in vitro*, um aumento na eficiência fotoquímica máxima do Fotossistema II quando as plantas foram cultivadas com 10 g L^{-1} de sacarose, mantendo-se praticamente constante até 40 g L^{-1} e acima dos resultados de F_V/F_M obtidos para as outras densidades de fluxo de fótons (Fig. 1A). Tais resultados podem indicar que quando as plantas são cultivadas com baixa concentração de sacarose e alta densidade de fluxo de fótons as mesmas sofrem um processo de fotoinibição, fato que pode ser revertido quando se aumenta a concentração de sacarose no meio de cultivo.

Em relação às folhas das plantas aclimatizadas, verificou-se que não houve uma variação na razão F_V/F_M independentemente da densidade de fluxo de fótons e da concentração de sacarose a que as plantas foram submetidas quando cultivadas *in vitro* (Fig. 1B).

Os resultados obtidos indicam similaridade entre os valores de F_V/F_M obtidos nas densidades de fluxo de fótons de 14 e 21 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em todas as concentrações de sacarose utilizadas, quando comparadas as condições *in vitro* ou *ex vitro* (Fig. 2A e 2B).

Plantas desenvolvidas em meio contendo 5 g L^{-1} de sacarose e submetidas a densidades de fluxo de fótons de 42 ou 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram uma recuperação da condição de fotoinibição quando transferidas do cultivo *in vitro* para *ex vitro*, proporcionando um aumento da razão F_V/F_M , de 0,66 para 0,79 e de 0,62 para 0,80, respectivamente (Figura 2C e 2D).

Os valores obtidos para F_V/F_M neste experimento estão entre os relatados por Li *et al.* [12], que estudaram a relação F_V/F_M para 99 espécies nativas de diferentes habitats da região da Mongólia, obtendo uma média de 0,72 para plantas C3 e aqueles relatados por Björkman e Demming [13], os quais realizaram uma compilação de inúmeros trabalhos referentes a plantas C₃ e descreveram que o valor médio da relação F_V/F_M era de 0,83.

Os resultados obtidos neste experimento demonstram [14]

que baixas concentrações de sacarose e altas densidades de fluxo de fótons levam a um decréscimo da razão F_V/F_M em plantas de batata doce *in vitro*, entretanto não alteram a eficiência fotoquímica máxima do Fotossistema II *ex vitro*, evidenciando que não ocorre efeito residual dos tratamentos com este carboidrato no meio de cultura.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Referências

- [1] EDMOND, J.B. & AMMERMAN, G.R. 1971. *Sweet potatoes: production processing marketing*. The Air Publishing Company. 58p.
- [2] GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. 1990. Micropropagação. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (Eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA- CNPH. p.89-164.
- [3] GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. England: Exegetics. p.223-227.
- [4] KOZAI, T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, T.H. (Eds.). *Micropropagation technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic. p.447-469.
- [5] FUENTES, G.; TALAVERA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARIA, J.M. 2005. High irradiance can minimize the negative effect of exogenous sucrose on the photosynthetic capacity of *in vitro* grown coconut plantlets. *Biologia Plantarum*, 49: 7-15.
- [6] KRAUSE, G.H.; WEIS, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basic. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 313-349.
- [7] ROHÁČEK, K. 2002. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica*, 40: 13-29.
- [8] MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- [9] ZONTA, E.P. & MACHADO, A.A. 1987. *SANEST - Sistema de análise estatística para microcomputadores*. Pelotas: DMEC/IFM/UFPel. 138p.
- [10] BAKER, N.R. 1991. A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 81: 563-570.
- [11] HAEHNEL, W.; NAIRN, J. A.; REISBERG, P.; SAUER, K. 1982. Picosecond fluorescence kinetics and transfer in chloroplast and algae. *Biochemistry and Biophysical Acta*, 680: 161-173.
- [12] LI, Y.G.; LI, L.H.; JIANG, G.M. 2004. Traits of chlorophyll fluorescence in 99 plants species from the sparseelm grassland in Hunshandak Sandland. *Photosynthetica*, 42: 243-249.
- [13] BJÖRKMAN, O. & DEMMING, B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170: 489-504.

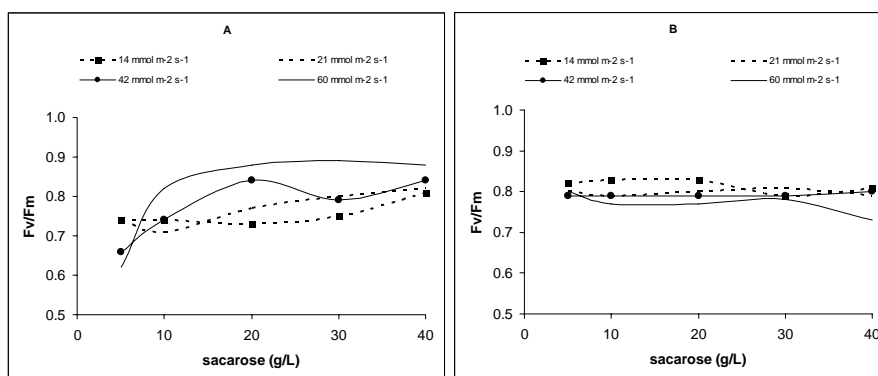


Figura 1. Eficiência fotoquímica máxima do Fotossistema II (F_v/F_M) de folhas de batata doce cultivadas *in vitro* (A), nas concentrações de sacarose de 5, 10, 20, 30 ou 40 g L⁻¹ e sob as condições de densidade de fluxo de fótons de 14, 21, 42 ou 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e após a aclimatização (*ex vitro*) (B).

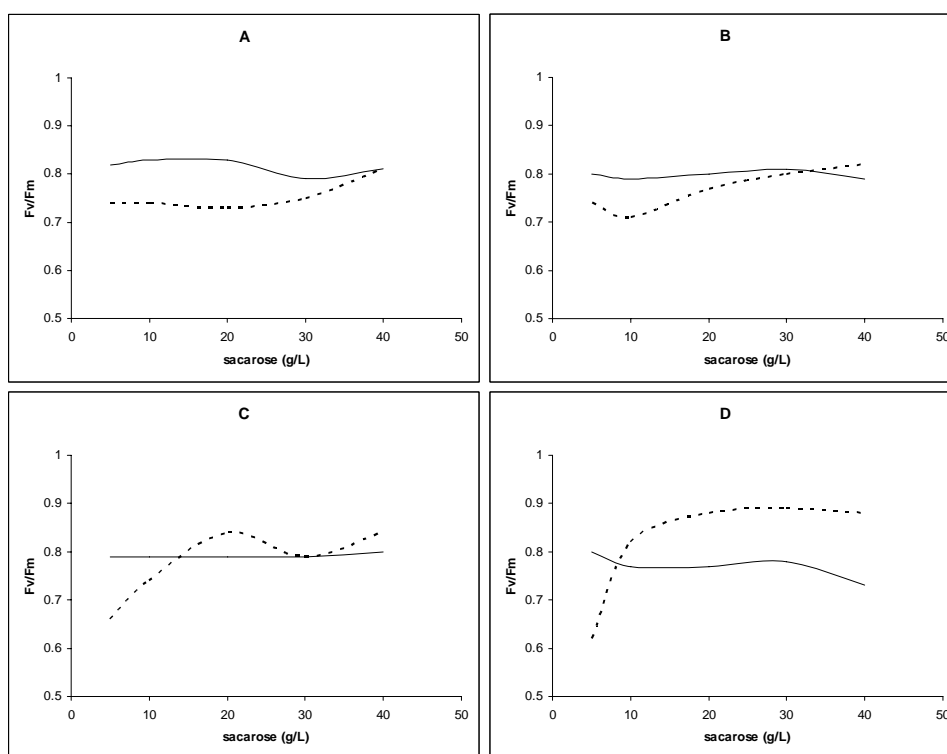


Figura 2. Eficiência fotoquímica máxima do Fotossistema II (F_v/F_M) em plantas de batata doce cultivadas *in vitro* (—) e após a aclimatização (*ex vitro*, ----) nas concentrações de sacarose de 5, 10, 20, 30 ou 40 g L⁻¹ e sob as condições de densidade de fluxo de fótons de 14, 21, 42 ou 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. A, B, C e D, respectivamente).