UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES

CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS - CCHN

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL - PPGBV

RAQUEL ALVES ARAUJO

Estresse por Al: alterações ecofisiológicas e bioquímicas em variedades de maracujazeiro

Vitória – ES

2012

RAQUEL ALVES ARAUJO

Estresse por Al: alterações ecofisiológicas e bioquímicas em variedades de maracujazeiro

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (PPGBV), da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Vegetal, na área de concentração Fisiologia Vegetal, linha de pesquisa em Comportamento Ecofisiológico de Vegetais.

Orientador: DSc. Antelmo Ralph Falqueto

Co-orientadora: DSc. Diolina Moura Silva

Vitória – ES

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Araujo, Raquel Alves, 1985-
A663e Estresse por Al : alterações ecofisiológicas e bioquímicas em variedades de maracujazeiro / Raquel Alves Araujo. – 2012.
110 f. : il.

Orientador: Antelmo Ralph Falqueto.
Coorientadora: Diolina Moura Silva.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Maracujá. 2. Fotossíntese. 3. Enzimas. 4. Fluorescência. 5. Clorofila. I. Falqueto, Antelmo Ralph, 1979-. II. Silva, Diolina Moura. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

Dedico aos meus pais, Maria José e Rogério, que sempre investiram em minha formação com muita luta e determinação.

AGRADECIMENTOS

É grande minha lista de agradecimentos, o que faz de mim uma pessoa de sorte.

Agradeço a Deus pela vida.

Muito obrigada Professor Dsc. Antelmo Falqueto, orientador deste trabalho, pela orientação segura e amiga, pela acolhida, pelo estímulo, interesse, e, acima de tudo, pela confiança depositada.

Obrigada à Professora DSc. Diolina Moura, co-orientadora deste trabalho, que muito me ensinou, colocando-se sempre a disposição. Agradeço também pela paciente revisão e sugestões apresentadas.

Agradeço muito às amigas de turma! Maisa, Manuela, Flávia, Thais, Tatiane, Irany e Eveline, jamais vou esquecer-me das infinitas discussões em sala de aula que muito contribuíram para a minha formação. Agradeço também pela acolhida e por toda ajuda, amizade, carinho e por todos os momentos de descontração e cumplicidade. Agradeço especialmente á Irany e Tatiane, que fizeram com que os dias, noites, madrugadas, fins de semana e feriados de trabalho fossem muito mais agradáveis. Muito obrigada pela ajuda, pela confiança, pelo aprendizado, pelo apoio nos momentos difíceis, pelo carinho e pelas risadas! Sem a ajuda de vocês a conclusão do mestrado não seria possível. Vocês se tornaram grandes amigas!

Agradeço a todos que passaram pelo NEF (Núcleo de Estudos da Fotossíntese) por toda ajuda e aprendizado. Nossas conversas durante e além das reuniões de estudo foram fundamentais. Agradeço especialmente à professora Dsc. Renata Fontes, ao Leonardo e ao Joilton pela disposição a ajudar, ao Vinícius, pelo grande auxílio na pós-colheita, ao Gleydson pela valiosa ajuda na montagem do experimento e ao Lorenzo na execução.

Muito obrigada professora DSc. Maria do Carmo pela amizade, carinho e contribuições, Professora Dsc. Viviana Borges e Professor Dsc. Geraldo Cuzzuol pelo aprendizado no estágio em docência, Professor MSc. Inobert de Melo pela sua imensa boa vontade e ajuda na escolha das lavouras e na coleta de solos.

Agradeço também a todos os professores pelos ensinamentos, que muito contribuíram para minha formação e à turma 2009/2, do curso de Ciências Biológicas, pelo carinho e respeito durante meu estágio em docência.

Muito obrigada Ricardo, secretário do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, por estar sempre disposto a ajudar com gentileza, alegria e responsabilidade, e Beth, agradeço pelos momentos de descontração e alegria.

Obrigada à Cooperativa dos Produtores Rurais de Jaguaré (COOPRUJ), especialmente ao técnico Rafael, que muito nos auxiliou na escolha das lavouras e na coleta de dados, e a Seu Israel pela doação das sementes. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) agradeço pelo apoio financeiro durante o curso.

Não posso deixar de agradecer aos meus pais Maria José e Rogério sem os quais não estaria aqui, e por terem me fornecido condições para me tornar a profissional e mulher que sou. Obrigada meus queridos irmãos. André pela amizade, apoio e incentivo, e Angélica que já me ensina tantas coisas. Agradeço a toda minha família que me mesmo de longe está cheia de orgulho com mais essa conquista!

Aos amigos Fernanda, Maykon e Lorena e principalmente ao José Maurício pela amizade desde os tempos de graduação, que fizeram com que eu percebesse que a distância não é suficiente para separar os amigos.

Agradeço ao meu marido Rodolfo, pessoa com quem amo partilhar a vida. Obrigada pelo carinho, pelo companheirismo e por sua capacidade de me trazer paz na correria do mestrado. Não posso deixar de agradecer também pela ajuda, companhia e paciência nas várias madrugadas e finais de semana de trabalho. Agradeço a Celia, Clever, Vinicius, Rose, Pedro, Nilzete, Secundino, Dona Madalena, Maria, e toda minha nova família por ter me acolhido aqui no Espírito Santo.

Muito obrigada todos aqueles que, durante todo o mestrado, de alguma forma, estiveram e estão próximos de mim, fazendo tudo valer cada vez mais a pena.

Agradeço por todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito."

Chico Xavier

RESUMO

A toxidez do alumínio (Al) é um fator limitante do crescimento e desenvolvimento da maioria das culturas agrícolas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do Al sobre aspectos fisiológicos do maracujazeiro cv. Maguary (FB 100) e cv. Yellow Master (FB 200) em plantas jovens, em casa de vegetação (Capítulo 1), e adultas, em campo (Capítulo 2). Foram analisados aspectos das trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, índice de clorofila e atividade específica da SOD, catalase e peroxidase do ascorbato, no maracujazeiro, nas duas situações distintas. As determinações em casa de vegetação foram realizadas em plantas cultivadas por 45 dias em vasos plásticos contendo areia lavada e irrigadas com solução nutritiva diferenciada, com 0 mM Al (pH 6); 0; 0,2 e 2,0 mM de Al (pH 4) durante 10 dias. As medidas em campo foram realizadas em três lavouras, no município de Jaguaré – ES, de um ano de idade contendo 0 (pH 6); 0,33 (pH 5,6) e 2,6 mM de Al (pH 4,7). Nas plantas jovens, houve apenas tendências ao declínio na assimilação líquida de CO2 que não se concretizaram em eventos significativos. Também não foram observadas grandes mudanças na atividade das enzimas antioxidantes. Apesar disso, as cultivares FB 100 e FB 200 de maracujazeiro apresentam respostas diferenciadas à exposição ao Al em solução nutritiva. Contudo, o padrão apresentado pelas bandas L e K ao longo dos dias de tratamento indicam que a presença do Al em solução é um fator estressante apenas até os cinco dias de tratamento na cultivar FB 100 e apenas aos 10 dias na cultivar FB 200. Nas plantas expostas ao Al em condições naturais também não foram observadas grandes alterações nas trocas gasosas. Porém a atividade da SOD e da peroxidase do ascorbato foram maiores apenas nas plantas expostas à maior concentração de Al. Nas plantas expostas à menor concentração, houve a presença das bandas K e L negativas, indicando que as plantas se encontravam em situação de estresse. Os resultados indicam que o Al não é capaz de causar grandes prejuízos ao aparato fotossintético do maracujazeiro.

Palavras chave: fluorescência da clorofila a, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Effect of aluminum on physiological aspects of FB100 and FB200 varieties of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. Flavicarpa)

The toxicity of aluminum (Al) is a limiting factor on growth and development of most crops. The objective of this study was to evaluate the effect of Al on physiological aspects of the passion fruit cv. Maguary (FB 100) and cv. Yellow Master (FB 200) of seedlings, in the greenhouse, grown in the field. Were analyzed aspects of gas exchange, chlorophyll fluorescence, chlorophyll content and specific activity of SOD, catalase and ascorbate peroxidase, in plants, in two different situations. Measurements in the greenhouse were conducted on plants grown for 45 days in plastic pots containing washed sand and irrigated with nutrient solution containing 0 mM Al (pH 6), 0, 0.2 and 2.0 mM Al (pH 4) for 10 days. The measurements in field were performed in three crops of one year old containing 0 (pH 6), 0.33 (pH 5.6) and Al 2.6 mM (pH 4.7). In young plants, there was only declining trends in net assimilation of CO2 that have not materialized in significant events. There were also no major changes in antioxidant enzyme activity. Nevertheless, the cultivars FB 100 and FB 200 exhibit differential responses to exposure to Al solution. However, the pattern shown by K and L bands over the days of treatment show that the presence of Al in solution is a stressor only up to five days of treatment in the cultivar FB 100 and only 10 days to grow in the FB 200. In plants exposed to Al in natural conditions there were also no significant changes in gas exchange. But the activity of SOD and ascorbate peroxidase were higher only in plants exposed to higher concentration of Al in plants exposed to lower concentrations, there was the presence of K and L bands negative, indicating that plants were under stress. The results indicate that Al is not capable of causing great damage to the photosynthetic apparatus of passion.

Keywords: chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes.

Sumário

Índice de figuras 13

Índice de tabelas 18

Lista de abreviaturas 19

1 Introdução Geral 20

2 Revisão de literatura 21

2.1 O alumínio no solo 21

2.2 O Efeito do Alumínio nas plantas 22

2.3 O maracujazeiro e o Alumínio 24

2.4 Técnicas indicadoras de estresse vegetal 26

CAPÍTULO I 28

EFEITO DO AL EM SOLUÇÃO NUTRITIVA SOBRE O APARATO FOTOSSINTÉTICO DO MARACUJAZEIRO CV. FB 100 E FB 200. 28

Resumo 29

1 Introdução 31

2 Objetivos 33

2.1 Objetivo geral 33

2.2 Objetivos específicos 33

3 Materiais e métodos 33

3.1 Material vegetal e condições de crescimento 33

3.2 Avaliações Fisiológicas 36

3.2.1 Potencial Hídrico foliar (ψ_w) 36

3.2.2 Trocas gasosas e assimilação líquida do CO_2 37

3.2.3 Conteúdo de clorofila 37

3.2.4 Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* 37

3.2.5 Determinação do conteúdo de proteína total e da atividade de enzimas antioxidantes 38

3.3 Delineamento experimental e análises estatísticas 42
4 Resultados 42
4.1 Potencial hídrico foliar 42
4.2 Trocas Gasosas 43
4.3 Índice de clorofila 47
4.4 Fluorescência da clorofila *a* 47
4.5 Atividade Específica de enzimas antioxidantes 61
5 Discussão 63
6 Conclusões 68
CAPÍTULO II 70
EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AL NO SOLO SOBRE ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LAVOURA DE MARACUJAZEIRO CV. FB 200 70
Resumo 71
Abstract 72
1 Introdução 73
2 Objetivos 75
2.1 Objetivos gerais 75
2.2 Específicos 75
3 Materiais e Métodos 76
3.1 Material Vegetal e condições de crescimento 76
3.2 Características fisiológicas avaliadas 76
3.2.1 Conteúdo de água no solo 76
3.2.2 Trocas gasosas e Assimilação líquida do CO_2 77
3.2.3 Índice de clorofila A, B e Total 77
3.2.4 Fluorescência transiente da clorofila *a* 77
3.2.5 Fluorescência da clorofila *a* com pulso modulado 78

3.2.6 Determinação do conteúdo de proteína total e da atividade de enzimas antioxidantes 78
3.2.7 Características físicas e químicas dos frutos 82
3.3 Delineamento experimental e análises estatísticas 83
4 Resultados 83
4.1 Conteúdo de água no solo 83
4.2 Trocas gasosas e Assimilação líquida de CO_2 84
4.3 Índice de clorofila foliar 86
4.4 Fluorescência transiente da clorofila a 86
4.5 Fluorescência da clorofila a com pulso modulado 92
4.6 Atividade das enzimas antioxidantes 92
4.7 Características físico-químicas dos frutos 93
5 Discussão 95
6 Conclusão 98
Considerações Finais 98
Anexo I – Análise de Solo 100
Anexo II – Análise de Nutrientes Foliar 101
Referências 102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Relação entre pH e disponibilidade de elementos no solo. (FONTE: EMBRAPA, 2000)..... 31

Figura 2: Potencial hídrico foliar do maracujazeiro cv. FB 100 (A) e FB 200 (B) antes e após dois, cinco e 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva. Letras diferentes revelam diferenças estatísticas entre os tratamentos (p<0,05) (Tuckey). Barras = desvio padrão da média..... 43

Figura 3: Fotossíntese, condutância estomática e transpiração do maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) antes e após dois, cinco e 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva. Letras diferentes revelam diferenças estatísticas (p<0,05) (Tuckey). Barras = desvio padrão da média. ... 45

Figura 4: Concentração de carbono interno (Ci), razão entre o Carbono interno e o carbono ambiente (Ci/Camb) e eficiência do uso da água (fotossíntese/transpiração) do maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) antes e após dois, cinco e 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva. Letras diferentes revelam diferenças estatísticas (p<0,05) (Tuckey). Barras = desvio padrão da média. 46

Figura 5: Índice de clorofila do maracujazeiro cv. FB 100 (A) e FB 200 (B) antes e após dois, cinco e 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva. Letras diferentes revelam diferenças estatísticas (p<0,05) (Tuckey). Barras = desvio padrão da média. 47

Figura 6: Intensidade da fluorescência transiente da clorofila a de plantas adaptadas ao escuro do maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) após dois (A e D), cinco (B e E) e 10 dias de exposição (C e F) a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva. 49

Figura 7: Fluorescência variável relativa ($V_{OP}=(F_t-F_0)/(F_M-F_0)$) de plantas adaptadas ao escuro do maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB

200 (D, E e F) após dois (A e D), cinco (B e E) e 10 dias de exposição (C e F) a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva. 50

Figura 8: Diferença cinética entre os pontos O e P [V_{OP} = ($V_{OP(Tratamento)}$- $V_{OP(Controle)}$] em relação ao controle de folhas adaptadas ao escuro do maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) após dois (A e D), cinco (B e E) e 10 dias de exposição (C e F) a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva..... 52

Figura 9: Fluorescência variável entre os passos O e K [V_{OK} = (F_t − F_0) / (FK − F_0)] e diferença cinética entre os pontos O e K evidenciando a Banda L [ΔV_{OK} = ($V_{OK\ (Tratamento)}$ – $V_{OK\ (Controle)}$].de folhas adaptadas ao escuro de maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) após dois (A e D), cinco (B e E) e 10 dias de exposição (C e F) a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva. 54

Figura 10: Diferença cinética entre os pontos O e J evidenciando a Banda K [ΔV_{OJ} = ($V_{OK\ (Tratamento)}$ – $V_{OJ\ (Controle)}$)] de folhas de maracujazeiro cv. FB 100 e FB 200 adaptadas ao escuro e submetidas a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva após dois (A e D), cinco (B e E) e 10 dias de tratamento (C e F). 56

Figura 11: Parâmetros da fluorescência da clorofila a derivados do Teste-Jip de folhas de maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) cultivados em casa de vegetação sob diferentes concentrações de Al em solução. ABS/RC=Fluxo de absorção de energia luminosa por centro de reação ativo. TR_0/RC=Fluxo de captura de energia por centro de reação ativo. ET_0/RC=Fluxo de transporte de elétrons por centro de reação ativo. DI_0/RC=Fluxo de energia dissipada por centro de reação ativo..... 59

Figura 12: Índice de desempenho (PI) e parâmetros derivados em plantas jovens de maracujazeiro cv FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) em casa de vegetação após dois, cinco e 10 dias de tratamento com diferentes concentrações de Al. 60

Figura 13: Atividades específicas das enzimas catalase (A e D), peroxidase (B e E) e superóxido dismutase (SOD) (C e F) do maracujazeiro cv. FB

100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) submetido a diferentes condições de Al e pH em solução. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as méidas (Tuckey 5%). Barras = desvio padrão da média..... 62

Figura 14: Umidade do solo de lavouras de maracujazeiro com diferentes concentrações de Al no solo. Barras = desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatística (Tukey a 5% de probabilidade) 84

Figura 15: Fotossíntese, transpiração, relação entre o carbono interno e o carbono ambiente (C_i/C_{amb}) e eficiência do uso da água em folhas de maracujazeiro (FB 200) cultivadas em campo sob diferentes concentrações de Al. Barras=desvio padrão da média. Letras diferentes se referem à diferença estatística (Tukey a 5% de probabilidade)..... 85

Figura 16: Índice de clorofila a, b, total e razão clorofila a/clorofila b de folhas de maracujazeiro FB 200 cultivadas em lavouras com diferentes concentrações de Al no solo. Barras = desvio padrão da média. Letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas (Tukey a 5% de probabilidade)..... 86

Figura 17: Fluorescência transiente da clorofila *a* do ponto O ao ponto P após dupla normalização entre os passos F_0 e F_P de folhas de maracujazeiro (FB 200), adaptadas ao escuro, cultivadas em campo sob diferentes concentrações de Al. (A) Intensidade de fluorescência (F_t); (B) Fluorescência variável relativa [$V_{OP} = (F_t-F_0)/(F_M-F_0)$; (C) diferença cinética de V_{OP} [$\Delta V_{OP} = (V_{OP(Tratamento)} - V_{OP(Contrele)}$]. 88

Figura 18: Fluorescência transiente da clorofila *a* do ponto O ao ponto J e do ponto O ao ponto K após dupla normalização entre os passos F_0 e F_K de folhas de maracujazeiro (FB 200) adaptadas ao escuro cultivadas em campo sob diferentes concentrações de Al. (A) Fluorescência variável entre os passos O e J [$V_{OJ} = (F_t - F_0) / (F_J - F_0)$] e diferença cinética entre os pontos O e J evidenciando a Banda K [$\Delta V_{OJ} = (V_{OK\ (Tratamento)} - V_{OJ\ (Controle)}$]. (B) Fluorescência variável entre

os passos O e K [V_{OK} = (F_t − F_0) / (FK − F_0)] e diferença cinética entre os pontos O e K evidenciando a Banda L [ΔV_{OK} = ($V_{OK\ (Tratamento)}$ – $V_{OK\ (Controle)}$]. 89

Figura 19: Valores relativos de parâmetros do JIP-Teste de folhas de maracujazeiro (FB 200) cultivadas em lavouras sob diferentes concentrações de Al no solo. Fluxos de energia por centro de reação: ABS/RC = Fluxo de absorção de energia luminosa por centro de reação. TR_0/RC = Fluxos de captura de energia por centro de reação. ET_0/RC = Fluxos de transporte de energia por centro de reação. DI_0/RC = Fluxos de dissipação de energia por centro de reação. Índices de performance e os parâmetros envolvidos: RC/ABS = Densidade de centros de reação ativos no PSII. $\varphi P_0/(1-\varphi P_0)$ = Performance das reações luminosas do PSII. $\Psi_0/(1-\Psi_0)$ = Performance das reações de oxi-redução do PSII. $\delta R_0/(1-\delta R_0)$ = Performance das reações de oxi-redução do PSI PI_{abs} = Índice de performance das reações luminosas do PSII (PI_{abs} = [RC/ABS] x [$\varphi P_0/(1-\varphi P_0)$] x [$\Psi_0/(1-\Psi_0)$]. P_{ITotal} = Índice de performance total das reações luminosas (PI_{Total} = [RC/ABS] x [$\varphi P_0/(1-\varphi P_0)$] x [$\Psi_0/(1-\Psi_0)$] x [$\delta R_0/(1-\delta R_0)$]). 91

Figura 20: Valores relativos de parâmetros da fluorescência do estado adaptado à luz. Produtividade quântica efetiva do fotossistema II, (FV`/FM`); Taxa de transporte de elétrons, (ETR); Coeficiente de extinção fotoquímico [qP = (FM'- Fs)/(F_M'- F_0')]; Eficiência fotoquímica atual do FS II [φPSII = (F_M'- F_S)/ FM'] do maracujazeiro *Passiflora edulis* Sims cv. FB 200 submetidas a diferentes concentrações de Al no solo. 92

Figura 21: Atividades específicas da catalase, peroxidase do ascorbato e superóxido dismutase (SOD) de folhas de maracujazeiro crescidos em lavouras com diferentes concentrações de Al e pH no solo. Barras = desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatística (tuckey 5%). 93

Figura 22: Características físicas dos frutos de maracujazeiro sob diferentes concentrações de Al no solo. Barras = desvio padrão da média. Letras iguais indicam similaridade estatística (Tuckey 5% de probabilidade) 94

Figura 23: Características químicas dos frutos de maracujazeiro sob diferentes concentrações de Al no solo. Barras = desvio padrão da média. Letras iguais indicam similaridade estatística (Tuckey 5% de probabilidade) 95

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da análise da água utilizada para o preparo das soluções nutritivas. 35

Tabela 2: Resultado da análise de solo de lavouras de maracujazeiro FB 200. 100

Tabela 3: Resultados da análise de nutrição mineral de folhas de maracujazeiro FB 200 cultivadas em lavouras com diferentes concentrações de Al no solo. 101

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Fotossíntese líquida
ABS/RC	Fluxo de absorção de energia por centro de reação ativo
APX	Peroxidase do ascorbato
C_a	Carbono ambiente
CAT	Catalase
CEO	Complexo de evolução do oxigênio
C_i	Carbono interno
Di_0/RC	Fluxo de dissipação de energia por centro de reação
E	Transpiração
ET_0/RC	Fluxo de transporte de elétrons por centro de reação ativo
ETR	Taxa de transporte de elétrons
F_0	Fluorescência inicial
F_m	Fluorescência máxima
FSI	Fotossistema I
FSII	Fotossistema II
F_t	Fluorescência em cada unidade de tempo
FV`/FM`	Produtividade quântica efetiva do fotossistema II
g_s	Condutância estomática
Pi_{abs}	Índice de desempenho do PSII
PI_{Total}	Índice de desempenho total do aparato fotoquímico (PSI e PSII)
qP	Coeficiente de extinção fotoquímico
RC/ABS	Densidade de centros de reação ativos no PSII
SOD	Superóxido dismutase
TR_0/RC	Fluxo de captura de energia por centro de reação ativo
V_{OP}	Intensidade de fluorescência variável entre os passos O e P
$\delta R_0/(1-\delta R_0)$	Desempenho das reações de oxi-redução no PSI
$\varphi_0/(1-\varphi_0)$	Desempenho das reações luminosas no PSII
φPSII	Eficiência fotoquímica atual do FSII
$\psi_0/(1-\psi_0)$	Desempenho das reações de oxi-redução no escuro

1 INTRODUÇÃO GERAL

Com o crescente aumento da população mundial, cresce também a necessidade de aumentar a produção de alimentos (MORAES et al 2009). Porém, para que a atividade agrícola obtenha o sucesso almejado, além da adoção de técnicas agrícolas de manejo que minimizem condições restritivas do ambiente, é necessária a utilização de cultivares com alto desempenho produtivo mesmo sob estas condições (EMBRAPA 2006).

Segundo Lobato (2004) um dos principais fatores que oferecem restrições para os cultivos agrícolas nos trópicos está relacionado à acidez dos solos. Esta acidez é frequentemente associada à presença do alumínio (Al), que é considerado tóxico para a maioria das culturas (KOCHIAN et al 2004). Segundo Curi et al (2009), é comum a presença de Al na região sudeste do Brasil, particularmente no Espírito Santo (MAGNAGO et al 2010). No Estado é frequente a presença de Latossolos que, além de ricos em Al, apresentam baixo poder tampão, havendo, portanto, maiores possibilidades de ocorrerem desbalanços, principalmente no pH e nos teores de micronutrientes (COSTA & COSTA, 2005).

O Al pode levar a alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas em plantas de diversas culturas, cujos efeitos nocivos e de severidade variam de acordo com a espécie e a cultivar (KOCHIAN et al., 2004). Dentre os efeitos causados na planta, em consequência da toxidez por Al, destacam-se os prejuízos na raiz, incluindo crescimento, absorção de água e nutrientes, e na parte aérea, como decréscimo na assimilação líquida de CO_2 nas folhas (JIANG et al 2008; AKAYA & TANENAKA, 2001) e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (LI et al 2011).

O Brasil é grande produtor mundial de frutas, inclusive de Maracujá tendo o Espírito Santo posição de destaque neste setor. Contudo, são escassas as pesquisas envolvendo os efeitos do baixo pH e da presença do Al tóxico na cultura do Maracujazeiro. Assim, com o objetivo de estudar os efeitos de diferentes concentrações de alumínio nos processos relacionados à

fotossíntese e à atividades de enzimas antioxidantes, no maracujazeiro, este trabalho foi conduzido em duas etapas. A primeira foi desenvolvida com o objetivo de estudar o efeito do Al em plantas jovens de duas cultivares de maracujazeiro em condições controladas, a fim de avaliar isoladamente os efeitos do pH baixo e do Al no maracujazeiro. A segunda etapa objetivou verificar como o maracujazeiro, já em fase reprodutiva, se comporta na presença do Al no solo, mesmo com a interação entre outros fatores presentes em estudos em campo. Esse conhecimento contribuirá de maneira significativa para programas de melhoramento genético, no sentido de desenvolver cultivares mais resistentes ao excesso de Al no solo, além de fornecer embasamento para a melhoria de técnicas de cultivo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ALUMÍNIO NO SOLO

O alumínio está presente em cerca de 50% dos solos com potencial agrícola no mundo e a disponibilização deste metal para as raízes das plantas está diretamente relacionada á acidez do solo (FOY, 1978). A presença do Al disponível pode se dar tanto em solos naturalmente ácidos como em solos submetidos ao uso intensivo de fertilizantes ou á chuva ácida (ZHANG et al., 2007).

Ao longo do processo de formação dos solos de regiões que apresentam altas precipitações pluviométricas, os cátions Na^+, K^+, Ca^{2+} e Mg^{2+} e os ânions cloreto, sulfato e nitrato vão sendo lixiviados. Quando essa lixiviação de cátions é maior que sua liberação por intemperização, o pH do solo diminui (TEDESCO & BISSANI 2004). A perda de cátions do solo leva a retenção preferencial de cátions de maior valência como o Al^{3+} nos sítios de troca da argila e da matéria orgânica (BISSANI et al 2006) fazendo com que o alumínio seja um dos principais componentes da acidez potencial dos solos.

Quando presente em soluções ácidas (pH<5), o Al pode ser encontrado na forma tóxica para as plantas ($Al(H_2O)_6^{3+}$) (também chamada de Al^{3+}). Quando o pH se eleva, esta molécula sofre hidrólise formando complexos mononucleares ($Al(OH)^{2+}$ e $Al(OH)_2^{+}$ (ROSSIELLO & JACOB NETO, 2006). Em pH neutro predominam a gibsita ($Al(OH)^3$), que é praticamente insolúvel no citoplasma da célula (pH 7,4), e o íon aluminato $Al(OH)^{4-}$, que é a forma dominante (KOCHIAN, 1995).

A acidificação do solo pode ser corrigida pela calagem, num processo que neutraliza os íons H^+ e Al^{3+}. Entretanto, como os corretivos da acidez são pouco solúveis, e os produtos da reação do calcário com o solo têm mobilidade limitada, a ação da calagem é restrita ás camadas superficiais do solo. Ainda no sistema de plantio direto, em que o calcário é aplicado na superfície e sem incorporação, a toxidez provocada pelo Al no subsolo torna-se uma das principais causas da limitação à produção agrícola e funciona como uma barreira química para o crescimento das raízes (CAMBRI, 2004).

2.2 O EFEITO DO ALUMÍNIO NAS PLANTAS

Um dos primeiros e mais importantes efeitos da toxidade do Al está relacionado à inibição do crescimento radicular (KOCHIAN, 1995; KOLLMEIER et al 2000), efeito que já se manifesta após poucos minutos de exposição em cultivares sensíveis de milho (LUGANY et al 1995). A região apical da raiz é frequentemente apontada como alvo primário da ação inibitória do Al, levando a comprometimentos na absorção de água e nutrientes minerais (CALBO & CAMBRAIA, 1980; MENDONÇA et al 2003; DELHAIZE et al 1993) .

O Al também pode levar a prejuízos no crescimento da parte aérea que podem ocorrer como consequência da diminuição da atividade fotossintética; esta, por sua vez, pode estar relacionada tanto com fatores estomáticos como não estomáticos. Em algumas espécies a exposição ao Al pode levar a queda na condutância estomática e nas reações bioquímicas de fixação de CO_2 (LINDON et al 1999; PEREIRA et al 2000; AKAYA & TAKENAKA, 2001;

PEIXOTO et al 2002;). Também pode levar a injúrias na formação e na função do cloroplasto, afetando as membranas do tilacóide e o transporte de elétrons (MOUSTAKAS et al 1995; PEREIRA et al 2000; PEIXOTO et al 2002; JIANG et al, 2008; HE et al 2011; MIHAILOVIC et al 2011) interferindo de forma direta na taxa de assimilação de CO_2, resultando, em grandes perdas em crescimento e produtividade de diversas culturas.

Devido à intensidade de sua carga elétrica positiva, o Al reage com inúmeros sítios nas células, como a parede celular, o citoesqueleto, o núcleo e, principalmente, a membrana plasmática, alterando diversas funções fundamentais da mesma (KOCHIAN et al 2004; OTEIZA,1994; WAGATSUMA et al 1995; MERIGA et al 2004). Evidências sugerem que parte dos efeitos tóxicos do Al sobre a membrana deve-se ao estresse oxidativo sendo a peroxidação de lipídios, induzida por Al, considerada um evento secundário e posterior à ação do Al (YAMAMOTO et al 2001) que seria, inicialmente, a de induzir processos que resultariam na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelo aparato fotossintético e respiratório (LI et al 2011; MOHAMMADIRAD & ABDOLAHI 2011)

Apesar da extensa literatura existente e das inúmeras hipóteses, não há, no meio científico, um consenso sobre os mecanismos fisiológicos de toxidade do Al (MENDONÇA et al, 1999; VITORELLO, 2005). Esta dificuldade é decorrente, dentre outros fatores, das diferentes respostas apresentadas por cada espécie vegetal (MENDONÇA et al 1999). Contudo, quando presente em baixas concentrações, o Al pode, muitas vezes, não ser considerado tóxico para muitas culturas. Baixas concentrações de Al são capazes de provocar efeito positivo no crescimento e na produção de matéria seca, de folhas, caules e raízes de pimenteira (VELOSO et al 1995) e goiabeira (SALVADOR et al 2000).

2.3 O MARACUJAZEIRO E O ALUMÍNIO

O maracujazeiro pertence à ordem Violales, família Passifloraceae e gênero *Passiflora*, que compreende trepadeiras herbáceas ou lenhosas, de hastes cilíndricas ou quadrangulares, angulosas, suberificadas, glabras ou pilosas (SIQUEIRA, 2009). No Brasil, existem cerca de 200 espécies do gênero Passiflora (SEMIR & BROWN, 1975), sendo que somente 70 espécies apresentam frutos comestíveis (COSTA & COSTA, 2005). Os cultivos comerciais no Brasil se baseiam, principalmente, na espécie *Passiflora edulis* Sins f. *flavicarpa* Degener, (maracujá amarelo ou maracujá azedo) (MELETTI, 2002) sendo elas de grande importância no setor agrícola, devido às características físico-químicas e fármaco-terapêuticas dos frutos (CAVICHIOLI et al., 2008).

Tem-se verificado que o maracujazeiro se desenvolve bem em uma grande amplitude de diferentes tipos de solo, desde os vulcânicos no Hawai, aos solos de cerrado de Goiás (PIZA JUNIOR, 1991). No Espírito Santo, destaca-se a produção do maracujá amarelo, sendo as seguintes cultivares algumas das mais comercializadas:

- Seleção Maguary ou Araguary – FB 100

Tem como principais características o alto rendimento de suco, alto teor de açúcares, alta produtividade e rusticidade. A polpa apresenta cor amarela-alaranjada. É resultado de uma mistura de clones desenvolvida com o intuito de atender ao mercado industrial. Não apresenta uniformidade no tamanho, sabor ou coloração da casca. O potencial produtivo é de 50 ton/há/ano e o rendimento do suco gira em torno de 42% (COSTA & COSTA, 2005).

- Híbrido Flora Brasil – FB 200 (Yelow Master)

Apresenta plantas vigorosas, frutos grandes e de formato ovalado, polpa amarela-alaranjada, além de bom rendimento de suco e normal teor de açúcares. Destinado tanto à indústria de sucos como ao mercado de frutas ‘in natura’. Os frutos apresentam uniformidade de tamanho, formato e cor. A

produtividade em média é de 50 ton/há/ano e o rendimento do suco é de cerca de 36% (COSTA & COSTA, 2005).

Segundo o Anuário Brasileiro da Fruticultura (2011), a produção de maracujá no Brasil em 2009 ocupou 50.853 hectares produzindo 798.798 toneladas. O Espírito Santo é o quarto maior produtor (42.320 toneladas ao ano) tendo a fruta grande destaque na agricultura capixaba. O maracujá tem grande aceitação pública de seu sabor, fazendo com que seja bem requisitado pela indústria de sucos prontos, indústria esta que vem crescendo no Estado, tendo, portanto, grandes perspectivas para o aumento na demanda pela fruta (ESTA TERRA, 2011; COSTA & COSTA, 2005).

Na literatura são escassos os trabalhos que avaliam respostas do maracujazeiro ao Al ou à aplicação de corretivos de acidez. Estes trabalhos revelaram que, com a elevação das doses de Al, houve redução no crescimento da parte aérea, no peso de matéria seca das plantas e na área foliar, além de redução na concentração de fósforo foliar. Além disso, houve também aumento no diâmetro de raízes, do comprimento dos internódios e no número de gavinhas, além de acúmulo de fósforo nas raízes (MENDONÇA et al, 1999). O trabalho de Silva (2009) mostra que, a partir de 160 µM de Al ocorreu efeito de toxidez em plântulas de maracujazeiro mas, em 20, 40 e 80µM, ocorreu estímulo ao crescimento radicular.

Estudos em solução nutritiva, indicam a sensibilidade da fruteira ao alumínio tóxico (MENDONÇA et al., 1999), de forma que têm sido indicados valores de saturação por bases de 70% (LIMA, 1999) até 80% (PIZA JÚNIOR et al.,1996; RIZZI et al.,1998; SILVA & OLIVEIRA, 2000) para o maracujazeiro adulto. Entretanto, estas indicações carecem de experimentação. Em mudas, existe ainda uma indicação da baixa resposta do maracujazeiro à calagem (FONSECA et al., 2002). Vale et al. (1997) explicam que, dependendo da tolerância de determinadas espécies vegetais a solos ácidos, pode-se ter crescimento muito satisfatório com saturação por bases menores que 50%. Assim, observa-se que as indicações da literatura sobre a resposta do

maracujazeiro à calagem são contraditórias e, praticamente, inexistem estudos realizados em campo.

2.4 TÉCNICAS INDICADORAS DE ESTRESSE VEGETAL

Há interesse crescente da comunidade científica em compreender os mecanismos fisiológicos de resposta das plantas aos diversos estresses abióticos (ASHRAF & FOOLAD, 2007). O desenvolvimento de um método rápido de determinação de estrese por Al nos vegetais requer a escolha correta dos fatores que afetam a toxidade desse elemento, bem como de parâmetros de avaliação fáceis de serem determinados e suficientemente sensíveis para discriminar as diferenças de tolerância entre as cultivares (CAMBRAIA et al., 1991). Além de rápidos, estes métodos devem ser eficientes e de baixo custo operacional, a fim de acelerar os programas de melhoramento genético (FURLANI & HANNA, 1984; LITTLE, 1988).

Considerando a sensibilidade do aparato fotossintético ao estresse vegetal, o uso da técnica da fluorescência da clorofila *a* tem sido importante para a quantificação de determinados tipos de estresse. O fotossistema II é o componente do aparato fotossintético mais sensível, sendo, portanto, considerado como chave para o entendimento de inúmeras perturbações ambientais (JIANG et al 2008). O uso desta técnica, além de contribuir para o aumento do conhecimento dos processos fotoquímicos e não fotoquímicos, que ocorrem na membrana dos tilacóides dos cloroplastos (ROHÁCEK, 2002), possibilita o estudo de características relacionadas à capacidade de absorção e transferência de energia luminosa na cadeia de transporte de elétrons (KRAUSE; WEIS, 1991). Contudo, pouco se sabe sobre como os fluxos de absorção, captura, transporte e dissipação de energia no FSII são afetados em resposta ao Al (JIANG et al 2008).

O comprometimento da fase fotoquímica pode ter como consequência a formação de baixo poder redutor ($NADPH_2$), tendo como resultado, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CHEN et al 2005). As enzimas

antioxidantes desempenham papel importante na detoxificação de EROs produzidas em condições de estresses (SHIGEOKA et al 2002). A SOD atua na primeira linha de defesa dismutando o superóxido ($O_2^{\cdot -}$) a peróxido de hidrogênio e (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (BOSCOLO et al 2003). A Peroxidase do Ascorbato (APx) e a Catalase (CAT) agem subsequentemente de forma a catalisar a redução do peróxido de hidrogênio - formado também pelas reações de oxi-redução - em água.

O aumento na atividade das enzimas antioxidantes tem sido relatado em diversas espécies de plantas submetidas a diferentes estresses ambientais (YOSHIMURA et al 2000; MITTOVA et al 2004; SHARMA & DUBEY, 2004) incluindo o Al (PANDA & MATSUMOTO 2010; SHUCH et al 2010; LI et al 2011). Segundo Gonzales-Santana et al (2012) a exposição ao Al pode induzir ao aumento na atividade das enzimas antioxidantes em folhas, diminuindo assim os níveis de H_2O_2 nas células, prevenindo dano adicional à membrana.

CAPÍTULO I

EFEITO DO AL EM SOLUÇÃO NUTRITIVA SOBRE O APARATO FOTOSSINTÉTICO DO MARACUJAZEIRO CV. FB 100 E FB 200.

RESUMO

A acidez dos solos, associada à presença do alumínio (Al), é um fator limitante do crescimento e desenvolvimento da maioria das culturas agrícolas no Brasil e no mundo, prejudicando, portanto, a produção de alimentos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do baixo pH sobre a atividade fotoquímica do maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims. f. Flavicarpa Deg) cv. Maguary (FB 100) e Yellow Master (FB 200), somado à presença do Al. As plantas foram cultivadas por 45 dias em vasos plásticos (4,5 L) contendo areia lavada, sendo irrigadas com solução nutritiva com 0 mM de Al (pH 6,0); 0, 0,2 e 2,0 mM de Al (pH 4). Durante 10 dias de tratamento foram realizadas medidas de trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, índice de clorofila e atividade de enzimas antioxidantes. Contudo, em todos os tratamentos foram observadas apenas tendências ao declínio na assimilação líquida de CO_2 que não se concretizaram em eventos significativos. Também não houve grandes mudanças na atividade das enzimas antioxidantes ou índice de clorofila, sendo observados efeitos apenas na fase fotoquímica da fotossíntese. As cultivares de maracujazeiro FB 100 e FB 200 mostraram respostas diferenciadas à exposição Al em solução nutritiva. O padrão apresentado pelas bandas L e K e pelos parâmetros do teste-Jip ao longo dos dias de tratamento indicam que a presença do Al em solução é um fator estressante apenas até os cinco dias de tratamento na cultivar FB 100 e apenas aos 10 dias na cultivar FB 200. De forma geral, o estresse causado pelo baixo pH do solo foi potencializado com o acréscimo de Al em solução. Porém, os efeitos do Al diferiram entre as doses aplicadas, sendo 2,0 mM de Al a concentração de maior interferência na atividade fotoquímica das plantas.

Palavras chave: Casa de vegetação, baixo pH, teste-JIP, toxidez. 27

ABSTRACT

The acidity of the soil, associated with the presence of aluminum (Al), is a limiting factor for growth and development of most crops in Brazil and worldwide, affecting therefore the production of food. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of low pH on the photochemical activity of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. F. Flavicarpa Deg) cv. Maguary (FB 100) and Yellow Master (FB 200), plus the presence of Al plants were grown for 45 days in plastic pots (4.5 L) containing washed sand and irrigated with nutrient solution containing 0 mM Al (pH 6 , 0), 0, 0.2 and 2.0 mM Al (pH 4). During 10 days of treatment were measured gas exchange, chlorophyll fluorescence, chlorophyll content and activity of antioxidant enzymes. However, in all treatments were observed only declining trends in net assimilation of CO_2 that have not materialized in significant events. There was also no major changes in antioxidant enzyme activity or content of chlorophyll, observed only in phase photochemical effects of photosynthesis. Cultivars FB 100 and FB 200 showed different responses Al exposure in solution. The pattern shown by the bands K and L and the parameters of the Jip-Test over the days of treatment show that the presence of Al in solution is a stressor only to the five days of treatment in cultivar FB 100 and only 10 days to grow in FB 200. In general, the stress caused by low soil pH was enhanced with the addition of Al in solution. However, the effects of Al differed between the rates, and 2.0 mM Al concentration higher interference photochemical activity in the plants.

Keywords: Greenhouse, low pH, JIP-test, toxicity

1 INTRODUÇÃO

Dentre os estresses ambientais que restringem a produtividade agrícola, a acidez do solo merece destaque. Segundo Lucas & Davis (1961), à medida que o pH do solo diminui, ocorre também redução na disponibilidade de muitos nutrientes para as raízes das plantas (Figura 1), podendo causar estresse por deficiência nutricional. Segundo Brandoni & Paiva (1996), no Brasil, cerca de 60% do território nacional apresenta solos ácidos, sendo esta acidez frequentemente associada a presença do Al (KOCHIAN et al 2004).

Segundo Foy et al (1978), o pH abaixo de 5 geralmente promove a decomposição da argila, o que faz com que o Al se desloque para a fração trocável ou para a solução do solo (Figura 1).

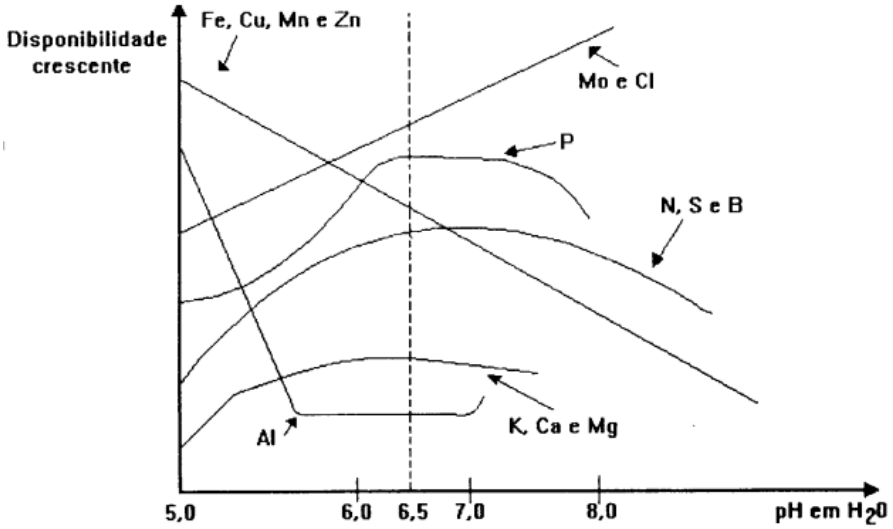

Figura 1: Relação entre pH e disponibilidade de elementos no solo. (FONTE: EMBRAPA, 2000)

Alguns trabalhos relatam que prejuízos a diversas culturas podem estar relacionados ao baixo pH do solo. Fageria & Baligar (1999), trabalhando com várias culturas em casa de vegetação, verificaram que todas tiveram o peso da matéria seca da parte aérea afetado pelo pH. Borkert & Cox (1999) notaram que, com a diminuição de pH numa faixa de 5,0 a 7,0, o peso seco de plantas

de soja diminuiu. Contudo, diversos estudos demonstram que, associado ao baixo pH do solo, a presença do Al pode levar a sintomas de toxidez (LINDON et al 1999; PEREIRA et al 2000; JIANG et al 2008).

Segundo Silva & Sodek (1997) o pH baixo parece ser um fator mais limitante na inibição do estabelecimento dos nódulos em soja do que a presença do Al, enquanto a inibição do crescimento dos nódulos é mais devida ao Al do que ao pH.

Há evidências que indicam a existência de diferenças quanto à tolerância ao Al, que pode ser observada tanto entre espécies quanto entre cultivares da mesma espécie (FOY et al 1978). Em diversas espécies foram verificadas respostas diferenciais da taxa de assimilação de CO_2 e de variáveis relacionadas à indução da fluorescência da clorofila *a* em função do grau de tolerância ao Al (MACHADO & PEREIRA, 1990; MOUSTAKA et al, 1995; PEREIRA et al 2000; PEIXOTO et al 2002). A fotossíntese, em espécies ou cultivares menos tolerantes, geralmente é menos afetada, podendo apresentar estratégias de adaptação do aparelho fotossintético em função do tempo de duração do estresse (PEIXOTO et al (2002). BRACCINI et al (1998) e KONRAD et al (2005) verificaram que em espécies de cafeeiro podem haver diferentes níveis de tolerância em relação à presença do Al tóxico, quando se avaliam variáveis relacionadas ao crescimento das raízes.

A fruticultura é um dos setores da economia capixaba que apresenta grande potencial de crescimento, principalmente pela elevada demanda das agroindústrias por polpa de frutas para a produção de sucos (COSTA & COSTA, 2005). Dentre as frutíferas, o maracujazeiro apresenta posição de destaque no agronegócio no ES, já que em 2009 foram produzidas quase 50 mil toneladas (ANUAL BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2011). Ainda assim, existem gargalos na produção do maracujá, principalmente em relação a informações técnicas que propiciem sistemas de cultivo adaptados ás condições edafoclimáticas do Estado (COSTA & COSTA, 2005) e ainda são escassas as informações sobre as respostas do maracujazeiro ao baixo pH do solo (MENDONÇA et al 1999; SILVA, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar as respostas fisiológicas de plantas jovens de maracujazeiro cvs. FB 100 (Maguary) e FB 200 (*Yellow Master*) a diferentes níveis de pH e concentrações de Al em solução nutritiva, a fim de identificar se o Al é tóxico ao maracujazeiro ou se o baixo pH da solução nutritiva já é capaz de causar estresse fisiológico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Discutir se diferentes concentrações de Al e pH podem afetar o potencial hídrico das cultivares FB 100 e FB 200;

- Analisar se há alterações nas características da fluorescência da clorofila *a* e das trocas gasosas nas duas cultivares de maracujazeiro expostas a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva;

- Investigar se diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva podem afetar o índice de clorofila de cada cultivar;

- Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes na presença de diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Neste estudo foram utilizadas sementes de maracujazeiro *Passiflora edulis* Sins f. *flavicarpa* Degener cv. FB 100 – “Maguary” e FB200 –“Yellow Master”, ambas amplamente cultivadas no Estado do Espírito Santo para a indústria de sucos e consumo *in natura*. O experimento foi realizado em casa de vegetação na Universidade Federal do Espírito Santo/UFES (20º18’52’’S e 40º19’06’’W), sob temperatura média de 28 °C (±2) e fotoperíodo natural.

As sementes foram germinadas em março de 2011 em bandejas plásticas contendo areia lavada e esterilizada com HCl 5%. Após a germinação, as plântulas com altura uniforme foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade para 4,5 L contendo areia lavada. Uma planta foi mantida por vaso. Após o transplantio as plantas foram irrigadas três vezes por semana com 50 mL de solução nutritiva completa modificada (HOAGLAND & ARNON, 1950) ½ força, contendo:

Macronutrientes	**(concentração final – mM)**
KH_2PO_4,	4
KNO_3,	4
$MgCl_2.6H_2O$	1
$MgSO_4.7H_2O$,	3
$CaCl_2.2H_2O$,	3
$CaSO_4.2H_2O$,	1,2
$NaNO_3$,	2
NH_4NO_3,	1

Micronutrientes	**(concentração final – mM)**
H_3BO_3	0,0092
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0003
$CuSO_4.5H_2O$	0,00006
$MnCl_2.4H_2O$	0,00036
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,00012

Fe-EDTA	**(concentração final – mM)**
$FeCl_3.6H_2O$	0,0038
Na_2EDTA	0,0038

Passados 45 dias após o transplantio as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos:

a) <u>0 Al pH 6.0</u> (solução nutritiva de Hoagland, ½ força, sem Al e pH 6)

b) 0 Al pH 4.0 (solução nutritiva de Hoagland, ½ força, sem Al e pH 4)

c) 0,2 Al pH 4,0 (solução nutritiva de Hoagland, ½ força, 0,2 mM de Al (AL-EDTA) e pH 4)

d) 2,0 de Al pH 4,0 (solução nutritiva de Hoagland, ½ força, 2,0 mM de Al (Al-EDTA) e pH 4)

As soluções para os tratamentos com Al foram preparadas segundo metodologia proposta por Mendham et al (2002) e continham:

Al-EDTA	**(concentração final – 0,2 Al)**	**(concentração final – 2,0 Al)**
$AlCl_3$	0,2 mM	0,2 mM
Na_2EDTA	0,2mM	0,2mM

O pH de cada solução foi ajustado com o uso de solução HCl 1M e NaOH 1M sendo:

Solução:	**HCl 1M**	**NaOH 1M**
0 Al pH 6,0	-	2,5mL/L
0 Al pH 4,0	250µL/L	-
0,2 Al pH 4,0	-	75µL/L
2,0 Al pH 4,0	4,2ml/L	-

A água utilizada para o preparo das soluções nutritivas foi levada pra análise em laboratório especializado (FULLIN) e apresentava as seguintes características:

Tabela 1: Resultados da análise da água utilizada para o preparo das soluções nutritivas.

Parâmetro	**Amostra**
Condutividade elétrica dS/m	0,09
pH	6
Razão de Adsorção de Sódio	0,29
Ferro reduzido (mg/L)	Nd

Ferro oxidado (mg/L)	Nd
Ferro total (mg/L)	0,06
Sódio (meq/L)	0,16
Cloro (meq/L)	0,1
Carbonato (CO_3^{-2}) (mg/L)	Nd
Dureza ($CaCO_3$) (mg/L)	32,47
Bicarbonato (HCO_3^{-2}) (mg/L)	Nd
Sulfato (SO_4^{-2})	0,22
Fosfato (PO_4^{-2}) (mg/L)	0,09
Potássio (mg/L)	1,8
Calcio (meq/L)	0,51
Magnésio (meq/L)	0,14
Boro (mg/L)	0,02
Manganês (mg/L)	0,01
Zinco (mg/L)	0,01
Cobre (mg/L)	0,01
Aluminio (µmol/L)	**2,096**
Nitrogênio (mg/L)	0,38

3.2 AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS

As avaliações fisiológicas foram realizadas antes do início da exposição das plantas aos diferentes níveis de pH e concentrações de Al (dia 0) e após dois, cinco e 10 dias de exposição aos tratamentos. Com exceção das plantas que foram utilizadas para a determinação das atividades das enzimas antioxidantes, as plantas foram retiradas da casa de vegetação e deixadas ao ar livre ao fim da tarde anterior a cada coleta de dados.

3.2.1 Potencial Hídrico foliar (ψ_w)

O potencial hídrico das plantas (ψ_w) foi determinado em três folhas jovens completamente expandidas de cada tratamento com o auxilio de uma bomba de pressão (SHOLANDER et al 1965). As medidas foram realizadas antes do nascer do sol (aproximadamente 5:00 horas da manhã). Os

resultados foram obtidos em Bar e convertidos em megapascal (MPa) dividindo-se cada valor obtido por 10.

3.2.2 Trocas gasosas e assimilação líquida do CO_2

A taxa de assimilação líquida do CO_2 (*A*, µmol m^{-2} s^{-1}), a condutância estomática (g_s, mmol m^{-2} s^{-1}), a taxa de transpiração (*E*, mmol m^{-2} s^{-1}), a relação entre o carbono interno e o carbono ambiente (C/C_a) e a eficiência do uso da água (*A/E*) foram determinados em folhas jovens completamente desenvolvidas de três plantas por tratamento, utilizando-se um analisador de gás infravermelho IRGA (LCI System, ADC) em sistema aberto, fluxo de ar de 200 mL min^{-1} e concentração de CO_2 no ambiente em torno de 400 µmol m^2 s^{-1}. Todas as medições ocorreram sempre entre 8:00h e 9:00h, utilizando-se radiação fotossinteticamente ativa de 1500 µmols m^{-2} s^{-2}, temperatura e umidade ambiente.

3.2.3 Conteúdo de clorofila

Para estimar o conteúdo de clorofila foi utilizado um clorofilômetro SPAD (Hansatech). As leituras foram realizadas na folha jovem completamente expandida de cada uma de cinco plantas por tratamento. Os resultados foram expressos em “índice de clorofila” (CASSOL et al. 2008). Foram realizadas três medidas por folha e sua média calculada pelo próprio aparelho.

3.2.4 Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a*

A fluorescência transiente da clorofila *a* foi determinada com o auxílio de um fluorômetro portátil (Handy PEA, Hansatech Instruments Ltd., King’s Lynn, Norfolk, UK). Todas as leituras foram realizadas no período da manhã (entre 7:00h e 8:00h) em folhas jovens completamente expandidas, de cinco plantas de cada tratamento, após a aclimatização das amostras em escuro por 30

minutos. Foram realizadas duas leituras em cada folha, totalizando 10 leituras por tratamento. A emissão de fluorescência foi induzida em uma área de quatro mm de diâmetro da folha, com o auxílio de um clip, pela exposição da amostra a um pico de luz vermelha saturante (3.000 µmol $m^{-2}s^{-1}$) (CASCIO et *al.* 2010). Os dados foram processados por meio do software Biolyzer (R. Maldonado, Rodriguez, Laboratório de Bioenergética. Genebra, CH) para a obtenção dos parâmetros do Teste-JIP (STRASSER & STRASSER, 1995).

3.2.5 Determinação do conteúdo de proteína total e da atividade de enzimas antioxidantes

Para as análises da atividade de enzimas antioxidantes foram retiradas a primeira folha jovem completamente expandida de cinco plantas de cada tratamento. Imediatamente após a coleta, cada folha foi rapidamente envolvida em papel alumínio, congelada em nitrogênio líquido e armazenada em ultra freezer a -85°C.

a) Obtenção do extrato enzimático

Para obtenção do extrato enzimático, foram macerados 0,2 g de cada amostra coletada de massa fresca foliar, com uma pitada de polivinilpolipirolidona (PVPP) 1% (p/v). Em seguida, foi acrescentado 750µL de solução de extração contendo tampão fosfato de potássio 100mM (pH 6,8), 30µL de EDTA 10 mM, 150µL de ácido ascórbico 100mM e 585µL de água ultra pura. O macerado foi centrifugado por 15 minutos, em centrífuga (Hermle Labortechnik GmbH), a 15000g e a 4ºC. O sobrenadante foi então separado, armazenado em eppendorf e congelado em ultra freezer a 85°C para posterior determinação do teor de proteína total e das atividades da catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APx) e superóxido dismutase (SOD).

b) Dosagem doTeor de Proteína Total

Para a determinação do teor de proteína total foi utilizada metodologia proposta por Bradford (1976).

Para o preparo de cada 100mL de reagente de Bradford, 10mg de Comassie Brilliant Blue G250 foram dissolvidos em 4,7mM de etanol absoluto. Após misturar, foi adicionado 10mL de ácido fosfórico (H_3PO_4 85% p/v). Após homogeinizar a solução obtida, completou-se o volume para 100mL com água deionizada. A solução obtida foi filtrada antes de cada dia de leitura e filtrou-se a solução obtida em papel de filtro de filtragem média. O filtrado foi reservado em frasco escuro.

Para a obtenção da curva padrão, foram preparados seis tubos de ensaio contendo 5 mL de reagente de cor e, nos tubos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram acrescentados respectivamente 100µL, 80 µL, 60 µL, 40 µL, 20µL e 0 µL de água deionizada e 0µL, 20µL, 40µL, 60µL, 80µL, 100µL de solução de *Bovine Serum Albumine* (BSA) na concentração de 1mg/L. As amostras foram lidas em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis) a 595 nm utilizando-se o tubo 1 como branco.

O resultado das leituras de cada amostra foram plotados em um gráfico de regressão linear, para a obtenção de uma fórmula, na qual, foram inseridos os resultados de cada amostra.

c) Dosagem da Atividade da enzima Catalase (E.C. 1.11.1.6)

Para a determinação da atividade bruta da catalase foi adicionado 25µL do extrato bruto e 200 µL de H_2O_2 250 mM a um tubo de ensaio incubado em banho maria a 28°C contendo 1,775 mL água ultra pura e 2mL de tampão fosfato 100mM (pH 6,8) a 28°C (HAVIR & MCHALE, 1989). As amostras foram então levadas para leitura de 15 em 15 minutos em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis), por um período de 1 minuto e 30 segundos a 240 nm.

Para a determinação da atividade da enzima foi utilizada a fórmula de acordo com a lei de Lambert-Beer:

A = E x C x L

Onde:

A=Absorbância a 240nm,

E= Atividade bruta,

C=Coeficiente de extinção molar (0,036 cm^2 $umol^{-1}$)

L=Largura da cubeta (1cm).

A atividade específica de cada amostra foi determinada dividindo-se o valor da atividade bruta da catalase pelo teor de proteína total obtido em cada amostra.

d) Dosagem da Atividade da enzima Peroxidase do Ascorbato (E.C. 1.11.1.11)

Para a determinação da atividade bruta da Peroxidase do Ascorbato foi adicionado 50µL do extrato bruto e 200 µL de H_2O_2 2mM a um tubo de ensaio incubado em banho maria a 28°C contendo 1,775 mL água ultra pura e 2mL de tampão fosfato 100mM (pH 6,8) a 28°C (HAVIR e MCHALE, 1989). As amostras foram então levadas para leitura de 15 em 15 minutos em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis), por um período de 1 minuto e 30 segundos a 20 nm. Para a determinação da atividade da enzima foi utilizada a fórmula de acordo com a lei de Lambert-Beer:

A=E x C x L

Onde:

A=Absorbância a 240nm,

E= Atividade bruta,

C=Coeficiente de extinção molar (240 nm de 0,0028 cm^2 $umol^{-1}$)

L =Largura da cubeta (1cm).

A atividade específica de cada amostra foi determinada dividindo-se o valor da atividade bruta da peroxidase pelo teor de proteína total obtido em cada amostra.

e) Dosagem da Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Para a determinação da atividade bruta da SOD foi preparado um coquetel como meio de reação da enzima contendo 1,5mL de tampão fosfato de potássio 100mM pH 6,8; 780µL de metionina 13mM; 60 µL de riboflavina 2mM; 60 µL de EDTA 0,1mM; 320 µL de água deionizada e 225 µL de NBT 75µM para cada tubo de ensaio. A metionina, a riboflavina e o NBT foram preparados no escuro e mantidos em recipientes envolvidos em papel alumínio a fim de evitar foto-oxidação. O NBT foi preparado na hora da reação. Um tubo de ensaio foi identificado como branco do claro, no qual foi adicionados 50 µl de água no lugar da amostra. Outros três tubos foram envolvidos em papel alumínio e identificados como branco do escuro, nos quais foram adicionados 50 µl da amostra em cada um. Nos demais tubos, foram adicionados 50 µl da amostra. Os tubos do branco claro e os demais tubos contendo a amostra foram levados à uma câmara de fotorredução (uma caixa fechada, contendo uma lâmpada) onde foram mantidos por 30 minutos, até que a reação fosse identificada com a mudança da coloração do branco claro de transparente para roxo (indicando a máxima redução do NBT para formar formazana azul). Os tubos foram, então, levados para leitura espectrofotométrica (Genesys 10S UV-Vis) a 560 nm (GIANNOPOLITIS & REIS, 1977).

A atividade da SOD foi definida em unidade SOD, sendo uma unidade SOD a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BAILEY et al, 1996; GOEL & SHEORAN, 2003), e foi definida segundo a fórmula:

$$SOD = (A/(a-b))-1$$

Onde:

A = absorbâncias dos tubos sem amostra (branco claro)

a = médias das absorbâncias dos tubos contendo as amostras

b = média das absorbâncias dos tubos contendo amostras, mantidos no escuro (branco do escuro).

A atividade específica de cada amostra foi determinada dividindo-se o valor da atividade bruta da SOD pelo teor de proteína total obtido em cada amostra

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com quatro (tratamentos) x duas (cultivares) x três, cinco ou dez (repetições). Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o programa Origin 8.0. Os dados não paramétricos (fluorescência da clorofila *a*) foram normalizados subtraindo-se o valor obtido por cada tratamento pelo tratamento 0 Al pH 4,0, de forma que o tratamento 0 Al pH 4,0 igualou-se a zero (curvas OJIP e suas derivadas), ou dividindo-se o valor obtido por cada tratamento pelo valor obtido pelo tratamento 0 Al pH 4,0, de forma que o controle igualou-se a 1 (parâmetros derivados da curva OJIP).

4 RESULTADOS

4.1 POTENCIAL HÍDRICO FOLIAR

De maneira geral, o baixo pH da solução nutritiva e os tratamentos com Al não levaram a diferenças estatísticas significativas no potencial hídrico das plantas ao longo de 10 dias de exposição em ambas as cultivares, com exceção da cultivar FB 100 aos dois dias de tratamento ($p<0,05$) (Figura 2). Neste tempo, a cultivar apresentou potencial hídrico mais elevado nos tratamentos com pH 4,0 ($p<0,05$), apresentando valores ainda mais elevados

com o aumento do Al em solução (p<0,05) (Figura 2A). Porém, a partir dos cinco dias de exposição, o potencial hídrico das plantas não apresentou diferença significativa até o fim do experimento (p>0,05). Na cultivar FB 200, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos ao longo do experimento (Figura 2B).

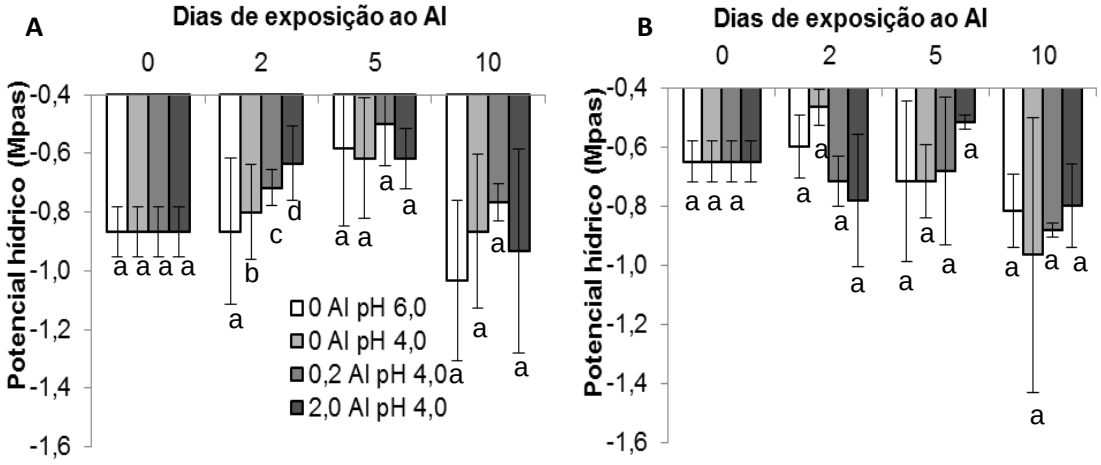

Figura 2: Potencial hídrico foliar do maracujazeiro cv. FB 100 (A) e FB 200 (B) antes e após dois, cinco e 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva. Letras diferentes revelam diferenças estatísticas entre os tratamentos (p<0,05) (Tuckey). Barras = desvio padrão da média.

4.2 TROCAS GASOSAS

Não foram observadas diferenças significativas na fotossíntese líquida dos tratamentos (p>0,05), em nenhuma das cultivares analisadas, sendo verificadas apenas tendências de variação que, durante os 10 dias avaliados, não se concretizaram em eventos significativos (Figura 3A e D).

As cultivares analisadas mostraram tendências distintas na fotossíntese líquida, quando expostas aos tratamentos com Al e pH baixo. Em FB 100, observa-se que o pH baixo influencia pouco a assimilação do CO_2, sendo observada tendência mais pronunciada ao declínio quando as plantas são expostas ao Al (Figura 3A), principalmente no tratamento com a dose mais alta de Al (2,0 Al pH 4,0). Ainda em relação a cultivar FB 100, a exposição a 0,2 Al pH 4,0 levou a uma tendência inicial ao aumento da fotossíntese líquida até os

cinco dias de exposição, apresentando, a partir daí, tendência ao declínio dos valores. O tratamento 0 Al pH 6,0 foi o que levou a valores de taxa fotossintética mais constantes em relação aos outros tratamentos nesta cultivar (Figura 3A).

A cultivar FB 200 mostrou maior tendência ao decréscimo da taxa fotossintética quando exposta a todos os tratamentos, com exceção do tratamento 0 Al pH 6,0, que tendeu a aumentar aos cinco dias de tratamento, tendo, a partir daí, tendência ao decréscimo. Ao contrário da cultivar FB 100, não foi possível observar tendência a decréscimo na fotossíntese líquida entre as doses de Al (Figura 3D).

Aos dois dias de exposição, a condutância estomática e a taxa de transpiração de ambas as cultivares não seguiram o padrão da assimilação líquida de CO_2. Neste tempo de exposição aos tratamentos, as plantas expostas a ambas as concentrações de Al, apesar de apresentarem incremento das taxas fotossintéticas, demonstraram decréscimo da condutância estomática (Figuras 3B e E) e taxas transpiratórias (Figuras 3C e F), refletindo em uma maior eficiência no uso da água, principalmente pela cultivar FB 100 no tratamento 0,2 Al pH 4,0.

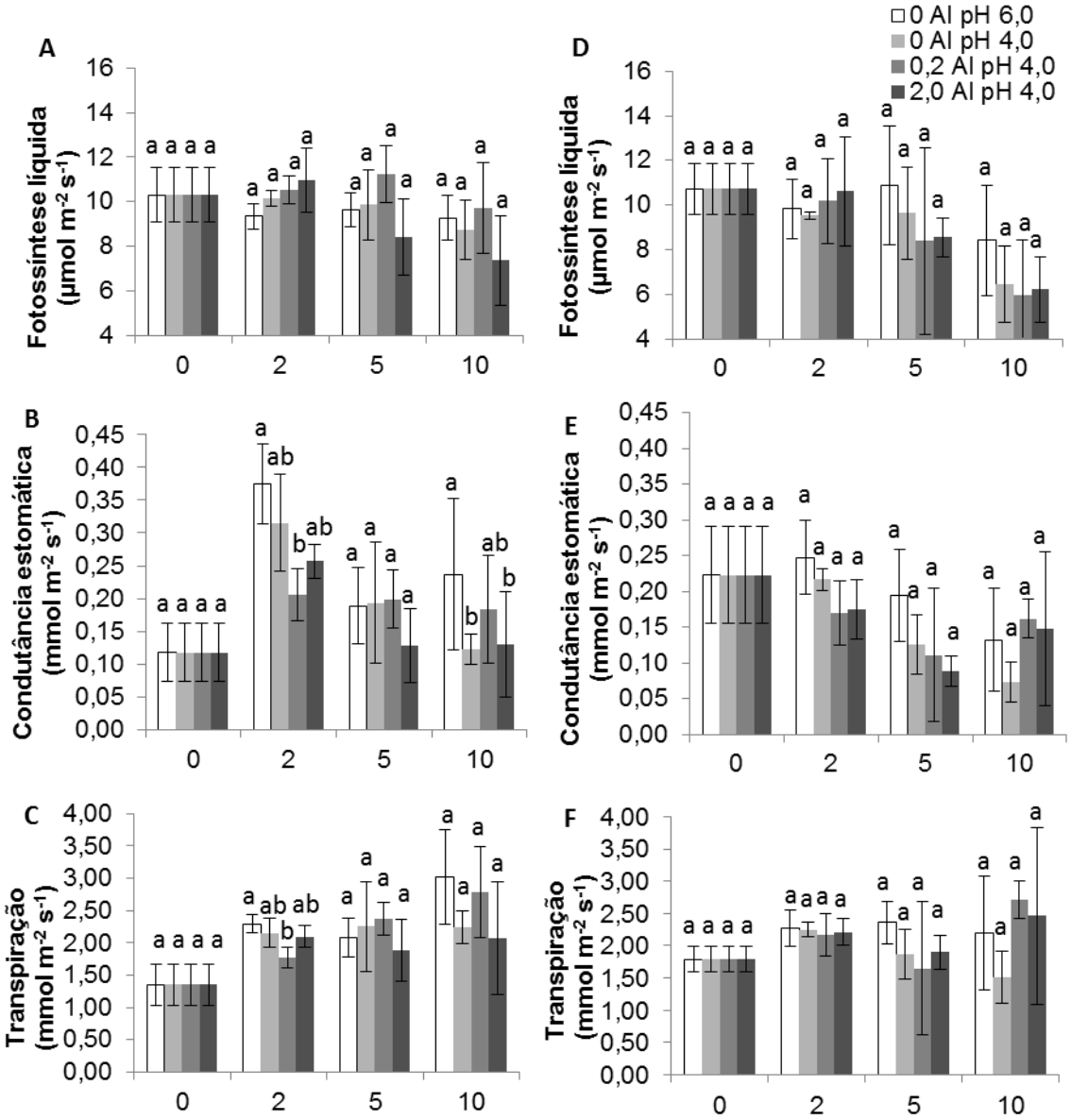

Figura 3: Fotossíntese, condutância estomática e transpiração do maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) antes e após dois, cinco e 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva. Letras diferentes revelam diferenças estatísticas ($p<0,05$) (Tuckey). Barras = desvio padrão da média.

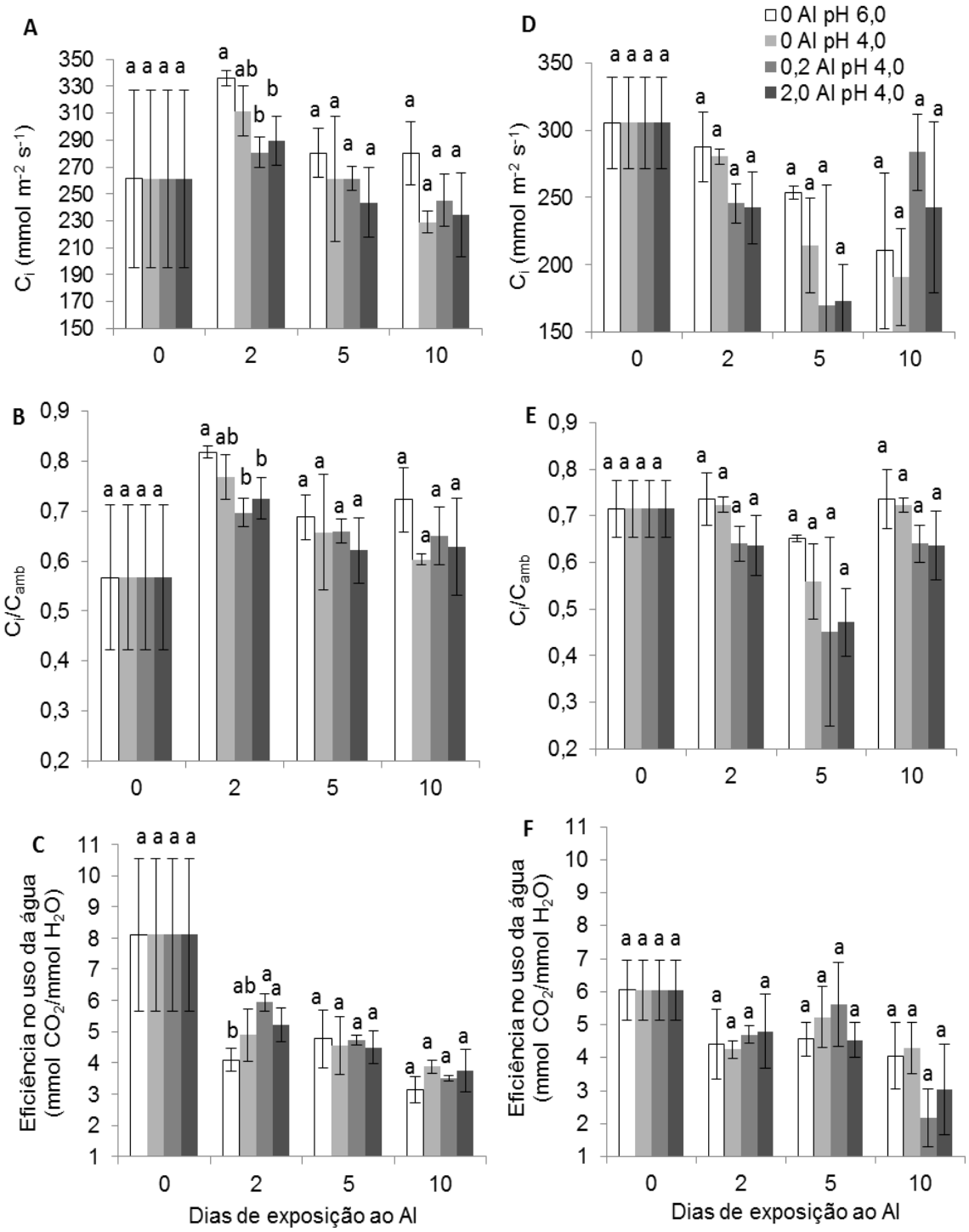

Figura 4: Concentração de carbono interno (Ci), razão entre o Carbono interno e o carbono ambiente (Ci/Camb) e eficiência do uso da água (fotossíntese/transpiração) do maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) antes e após dois, cinco e 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva. Letras diferentes revelam diferenças estatísticas ($p<0,05$) (Tuckey). Barras = desvio padrão da média.

4.3 ÍNDICE DE CLOROFILA

A exposição aos tratamentos por 10 dias não levou a diferenças significativas entre os índices de clorofila de cada cultivar (p>0,05), sendo possível observar apenas tendências (Figura 5). O índice de clorofila da cultivar FB 100 tendeu ao aumento nos tratamentos com Al e baixo pH em relação ao tratamento 0 Al pH 6,0, de forma que aos 10 dias de exposição, os tratamentos 0,2 Al pH 4,0 e 2,0 Al pH 4,0 foram os que levaram a maior incremento (Figura 5A).

Na cultivar FB 200, as plantas apresentaram índices de clorofila semelhantes até cinco dias de tratamento (Figura 5B). Ao final do experimento, todos os tratamentos com pH baixo e com Al tenderam a diminuição dos índices de clorofila das plantas em relação ao tratamento 0 Al pH 6,0, sendo que as tratadas com 0,2 Al pH 4,0 apresentaram maior tendência a aumento.

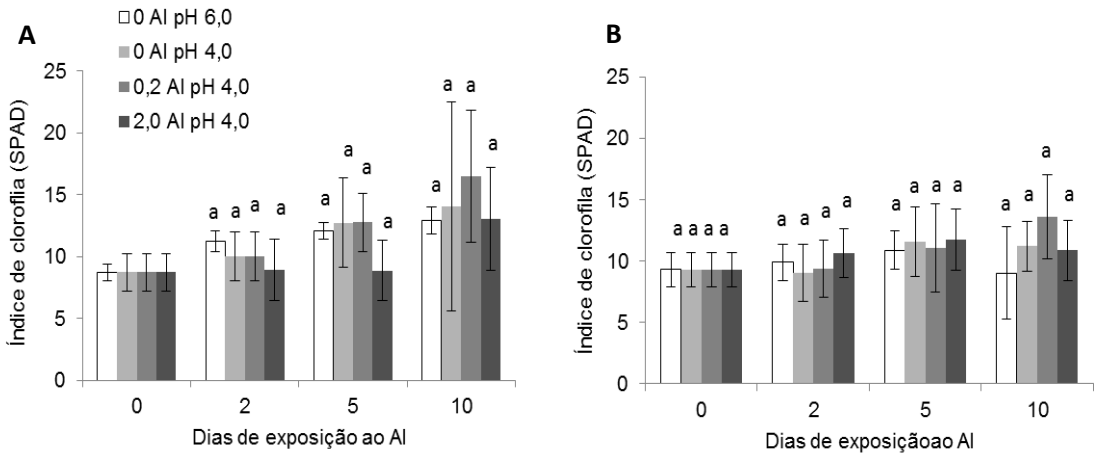

Figura 5: Índice de clorofila do maracujazeiro cv. FB 100 (A) e FB 200 (B) antes e após dois, cinco e 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva. Letras diferentes revelam diferenças estatísticas (p<0,05) (Tuckey). Barras = desvio padrão da média.

4.4 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*

As intensidades da fluorescência transiente da clorofila *a* de folhas adaptadas ao escuro, das cultivares FB 100 e FB 200 do maracujazeiro, ao longo dos dias de tratamento, podem ser observadas na Figura 6 (dados apresentados em escala logarítmica de tempo de 50 µs a 1 s). Pode-se

observar que FB 100 apresentou uma leve diminuição na fluorescência máxima (F_M), principalmente nas plantas submetidas ao tratamento com 2,0 Al pH 4,0 (Figura 6). Já a cultivar FB 200 apresentou maiores alterações na fase OJ e JI principalmente aos 10 dias de tratamento com 0,2 Al pH 4,0 (Figura 7).

Segundo Lichtenthaler et al (1998) situações de estresse não são tão claramente identificadas pelo transiente da fluorescência da clorofila *a* quando os dados são apresentados na forma linear, porém, quando os valores do transiente OJIP são apresentados na forma variável relativa, é possível verificar de forma mais nítida o efeito do estresse aplicado. Pode-se observar em FB 200 um incremento na fluorescência variável relativa quando as plantas foram submetidas a 0,2 Al pH 4,0 (Figuras 6B, D e F).

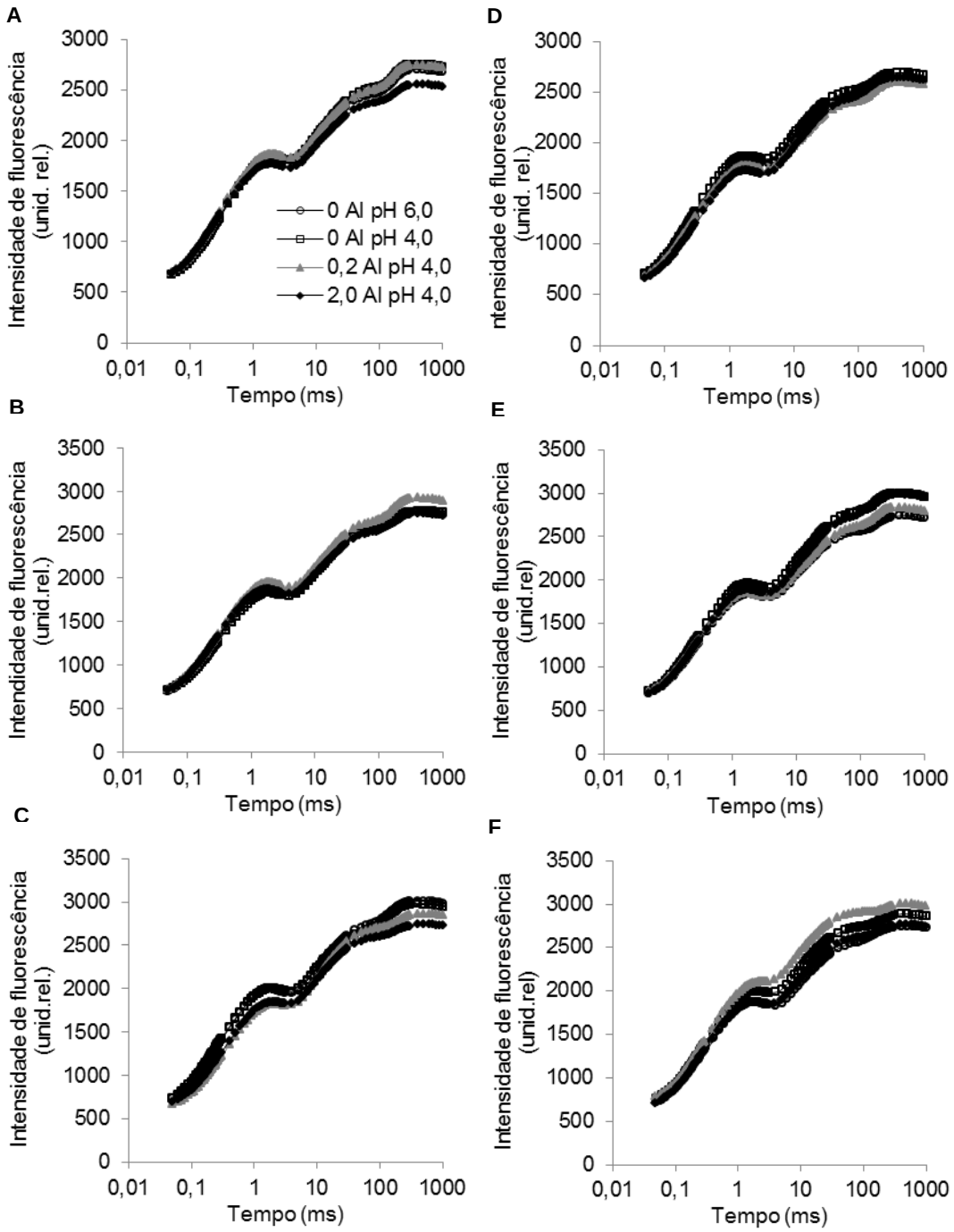

Figura 6: Intensidade da fluorescência transiente da clorofila a de plantas adaptadas ao escuro do maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) após dois (A e D), cinco (B e E) e 10 dias de exposição (C e F) a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva.

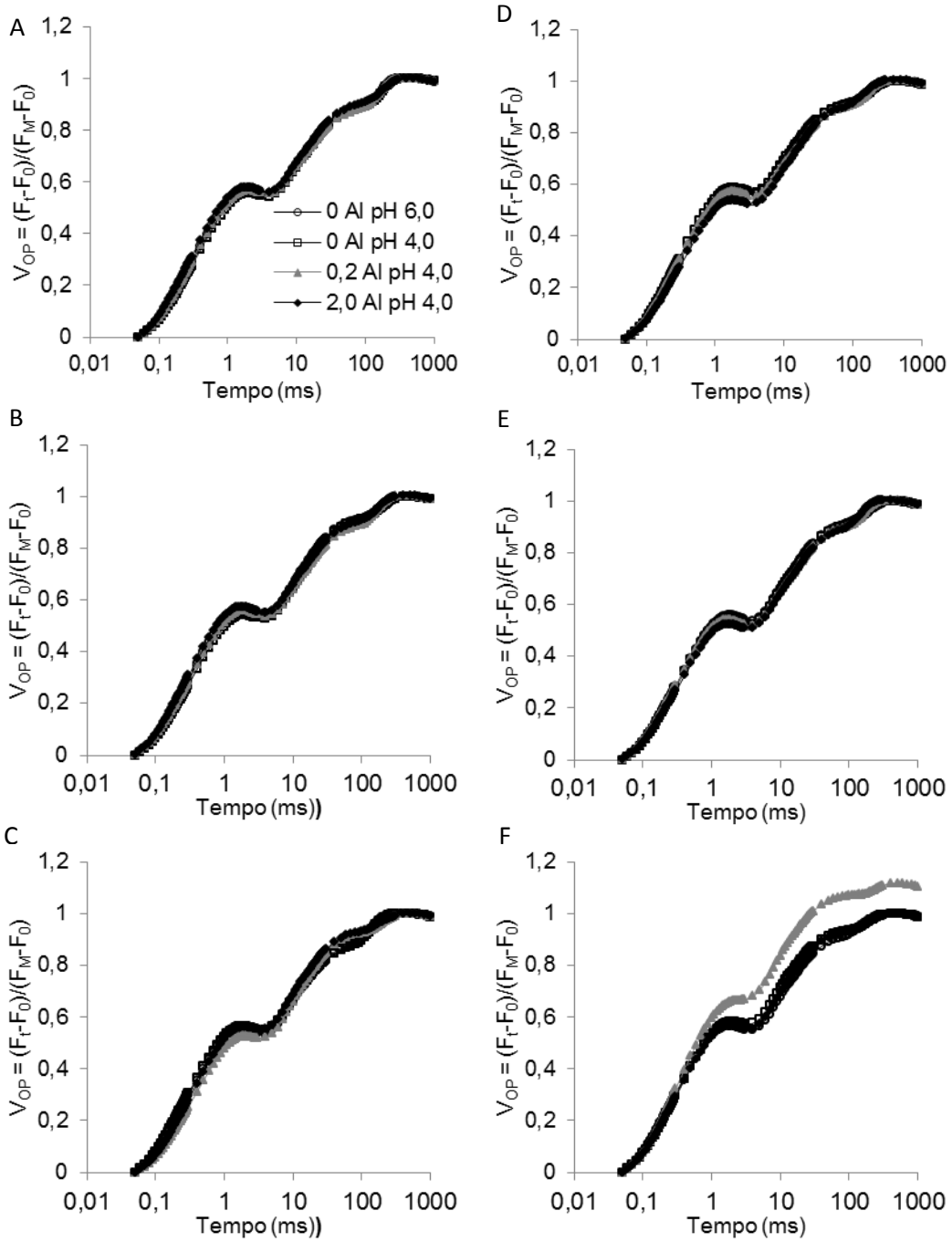

Figura 7: Fluorescência variável relativa ($V_{OP}=(F_t-F_0)/(F_M-F_0)$) de plantas adaptadas ao escuro do maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) após dois (A e D), cinco (B e E) e 10 dias de exposição (C e F) a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva.

As curvas das diferenças da cinética de fluorescência transiente dos tratamentos em relação ao tratamento 0 Al pH 4,0, ($\Delta V_{OP}=V_{OP(tratamentos)}-V_{OP\ (0\ Al\ pH\ 4,0)}$), na faixa de 50 µs a 1 s (Figura 8) mostram um efeito dos tratamentos com Al nas cultivares analisadas, principalmente da dose alta (2,0 Al pH 4,0)

em FB 100, pelo aparecimento de bandas positivas ao longo dos dias de exposição. A cultivar FB 200 apresentou banda positiva mais evidente apenas aos 10 dias de exposição ao tratamento 0,2 Al pH 4,0 (Figura 8C).

Já em FB 200 pode ser observado o aparecimento de bandas negativas ao longo de todos os dias de tratamento, principalmente na exposição à dose alta de Al (2,0 Al pH 4,0) (Figuras 8D, E e F).

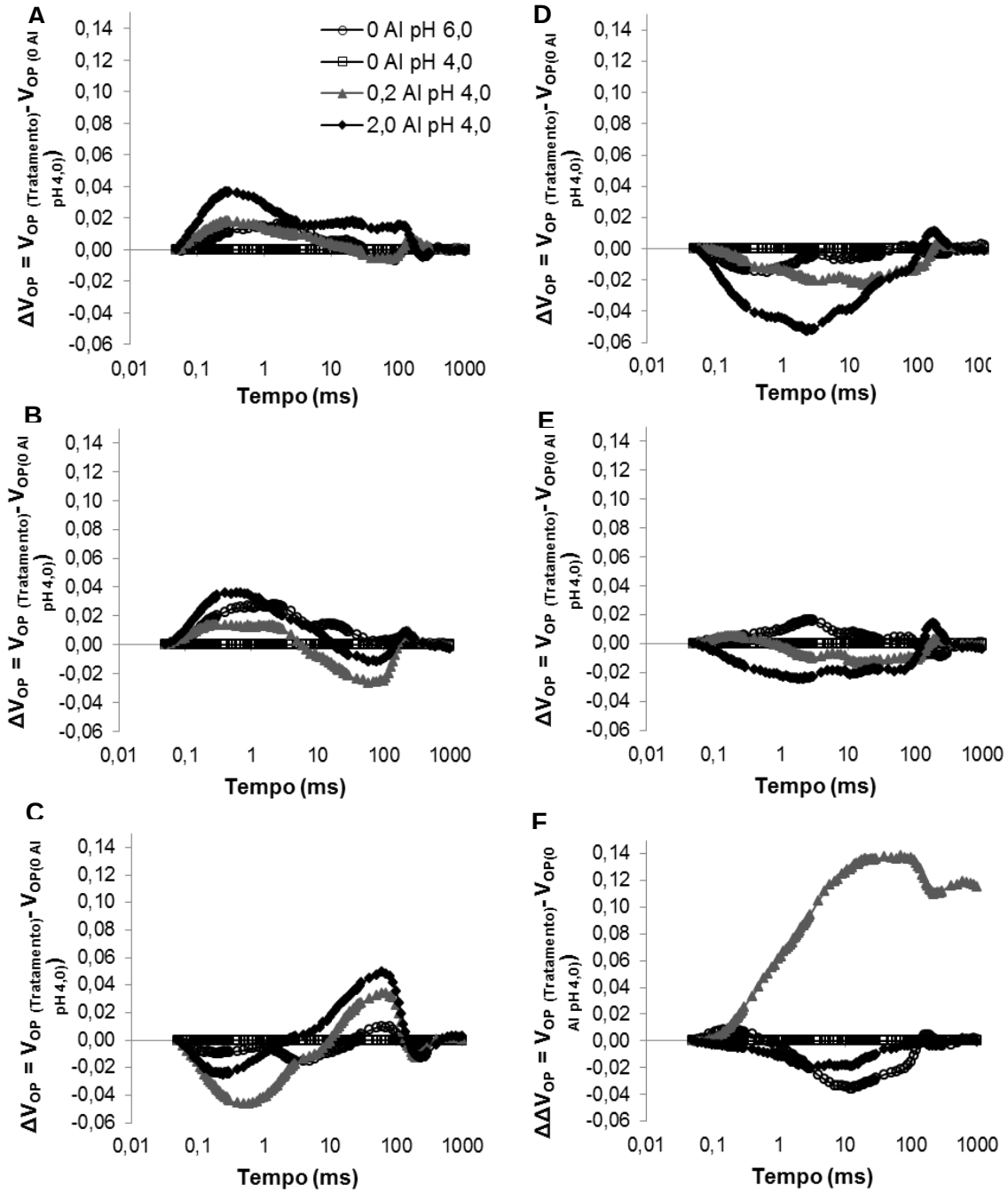

Figura 8: Diferença cinética entre os pontos O e P [V_{OP} = ($V_{OP(Tratamento)}$-$V_{OP(Controle)}$] em relação ao controle de folhas adaptadas ao escuro do maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) após dois (A e D), cinco (B e E) e 10 dias de exposição (C e F) a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva.

Na figura 9, os dados de fluorescência foram normalizados entre os pontos O (50 µs) e K (300 µs) [V_{OK} = (F_t-F_0)/(F_K -F_0)], e apresentados como diferença cinética (ΔV_{OK}=$V_{OK(tratamento)}$ - $V_{OK(0\ Al\ pH\ 4,0)}$). A diferença cinética ΔV_{OK} revelou a banda L por volta de 150µs, descrita por Strasser & Stirbet (1998) como sendo indicador da conectividade energética (agrupamento) das unidades do FSII, que é positiva quando há uma baixa conectividade energética das amostras em relação ao tratamento controle. Uma baixa conectividade energética tem como resultado um prejuízo na utilização de energia de excitação levando a uma menor estabilidade do FSII (YUSUF et al. 2010). Desse modo, as plantas da cultivar FB 100 apresentaram diminuição da conectividade energética quando expostas ao Al aos dois (Figura 9A) e cinco dias de tratamento (Figura 9B), sendo que amplitude mais pronunciada foi observada aos dois dias nas plantas submetidas a 2,0 Al pH 4,0 (Figura 9A). Já FB 200 apresentou menor conectividade energética aos 10 dias de tratamento quando exposta ao tratamento 0 Al pH 6,0 (Figura 9F)

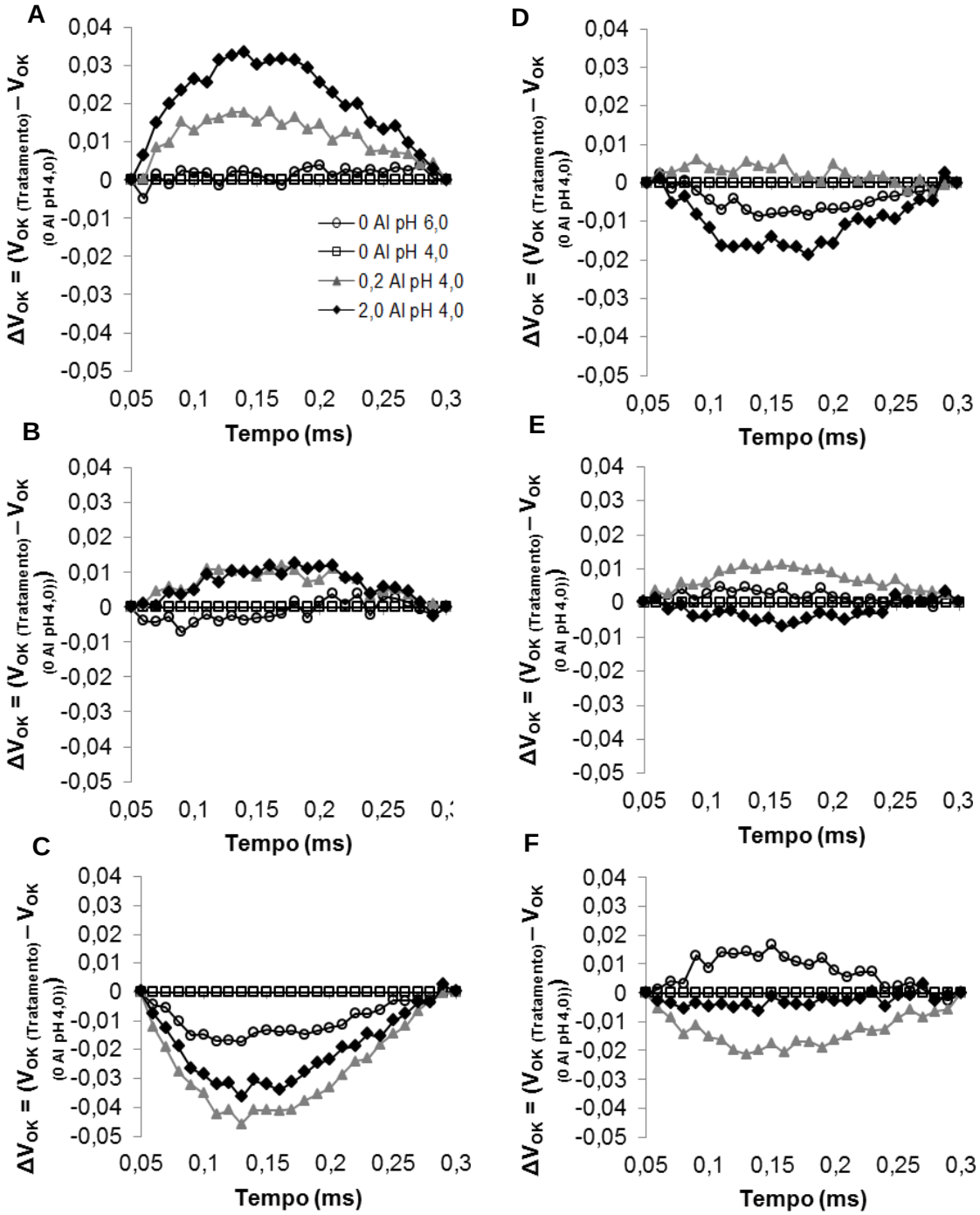

Figura 9: Fluorescência variável entre os passos O e K [$V_{OK} = (F_t - F_0) / (FK - F_0)$] e diferença cinética entre os pontos O e K evidenciando a Banda L [$\Delta V_{OK} = (V_{OK\ (Tratamento)} - V_{OK\ (Controle)}$].de folhas adaptadas ao escuro de maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) após dois (A e D), cinco (B e E) e 10 dias de exposição (C e F) a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva.

A fluorescência relativa entre os passos O (50µs) e J (2ms) ($V_{OJ}=[F_t-F_0]/[F_J-F_0]$) foi normalizada e representada como diferença cinética da fluorescência ($\Delta V_{OJ}=VOJ_{[treatmento]}- V_{OJ[0\ Al\ pH\ 4,0]}$) (Figura 10) pela qual pode ser identificada a banda K em torno de 300µs. A presença da banda K positiva pode ser considerada como sendo um reflexo da inativação do complexo de evolução do oxigênio (CEO) e/ou um aumento no tamanho da antena funcional do PSII (YUSUF et al 2010). Em FB 100 os tratamentos com Al levaram ao aparecimento da banda K positiva apenas aos dois e cinco dias de tratamento (Figuras 10A e B), sendo a concentração 2,0 Al pH 4,0 a que levou a maior amplitude das bandas. Já em FB 200, a alteração na fase OJ ocorreu apenas no quinto dia de exposição a 0,2 Al pH 4,0 (Figura 10D) e aos 10 dias e exposição a 0 Al pH 6,0 (Figura 10F).

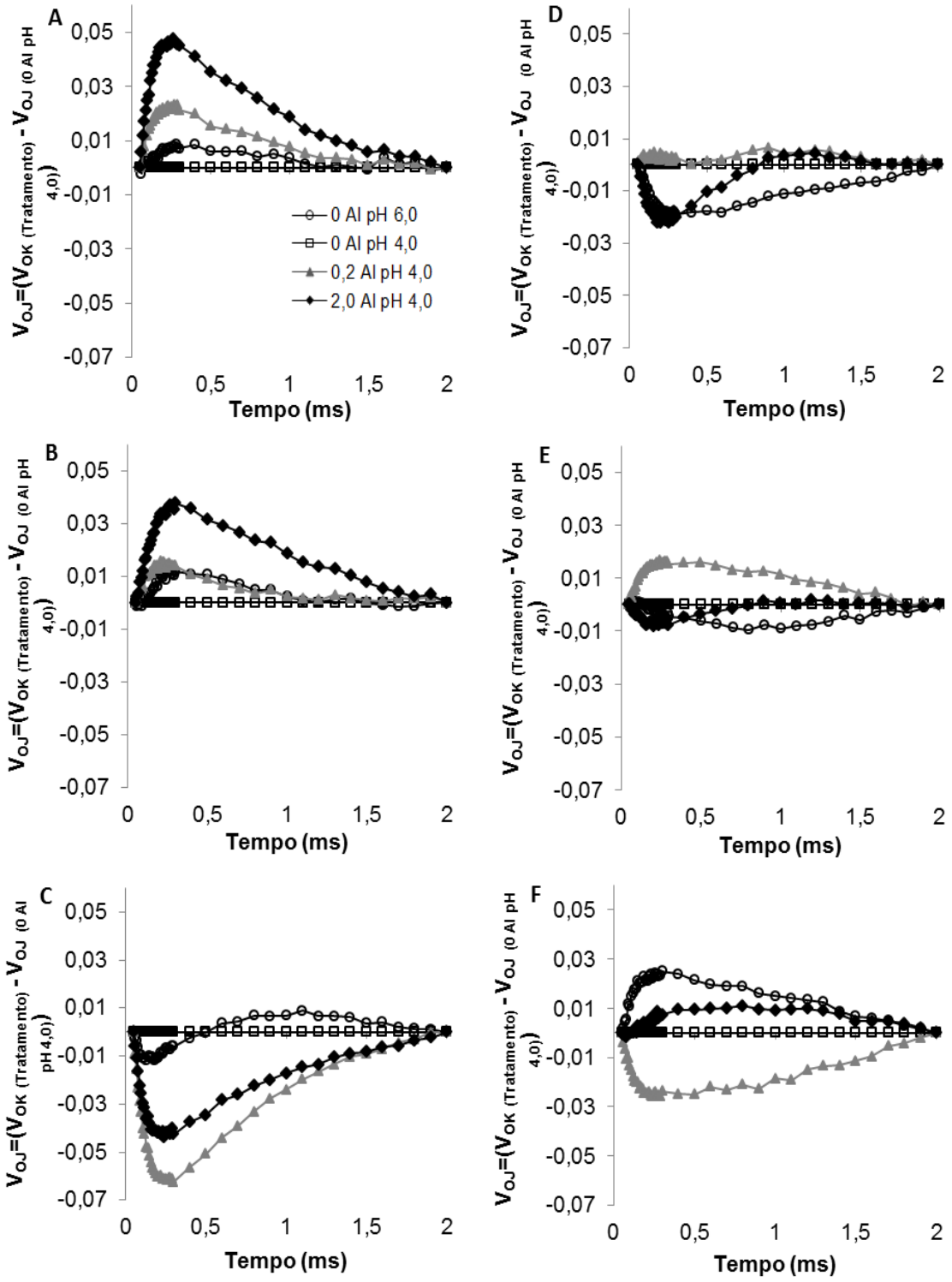

Figura 10: Diferença cinética entre os pontos O e J evidenciando a Banda K [$\Delta V_{OJ} = (V_{OK\ (Tratamento)} - V_{OJ\ (Controle)})$] de folhas de maracujazeiro cv. FB 100 e FB 200 adaptadas ao escuro e submetidas a diferentes concentrações de Al e pH em solução nutritiva após dois (A e D), cinco (B e E) e 10 dias de tratamento (C e F).

Os parâmetros biofísicos extraídos do Teste-JIP (STRASSER & STRASSER, 1995), que correspondem a um detalhamento dos dados obtidos nas curvas cinéticas da fluorescência transiente, foram normalizados de forma que o tratamento 0 Al pH 4,0 foi igualado a 100% e estão apresentados nas figuras 11 e 12 . Dentre os parâmetros obtidos através do Teste-Jip, as atividades específicas por centro de reação ativo das cultivares FB 100 e FB 200 estão demonstradas na Figura 11.

A absorbância (ABS) refere-se à absorção de fótons pela molécula de clorofila no complexo antena. Quando a energia é absorvida pela molécula de clorofila, parte é capturada (TR_0) pelo centro de reação (RC) do FSII (P680), enquanto outra parte é dissipada (DI_0) na forma de calor ou fluorescência. Da energia capturada, parte é dirigida para a redução de energia química pelo transporte de elétrons (ET_0) através das quinonas A e B (FORCE et al., 2003). O PI_{abs} é uma variável da fluorescência da clorofila que fornece informações quantitativas sobre o estado da planta e sua vitalidade, de acordo com o princípio da equação de Nernst (SRIVASTAVA et al., 1999). Já o PI_{total} mede ao desempenho do fluxo de elétrons até os aceptores finais do PSI (STRASSER, 2008).

Na cultivar FB 100 pode-se observar que, principalmente nas plantas expostas à concentração 2,0 Al pH 4,0, houve um incremento nos fluxos específicos de energia por centro de reação aos dois dias (Figura 11) seguido de tendência a queda nos mesmos fluxos até final de 10 dias de tratamento (Figuras 11 A, B, C e D). Os índices de desempenho dos fotossistemas e parâmetros derivados (Figura 12) seguiram o padrão contrário, já que aos dois dias os tratamentos apresentam decréscimo dos parâmetros em relação ao controle (0 Al pH 4,0) seguido de tendência a aumento até 10 dias de tratamento, com exceção da performance das reações de oxi-redução no FSI ($\delta Ro/(1-\delta Ro)$ que decresceu ao final de 10 dias de tratamento (Figura 12E) reduzindo o PI_{total} (Figura 12F).

A cultivar FB 200 apresentou padrão diferenciado de resposta aos tratamentos com Al. Aos dois dias de tratamento, o PI_{Total} das plantas expostas

a 2,0 Al pH 4,0 aumentou 50% em relação ao controle (0 Al pH 4,0), tendo, a partir daí tendência ao declínio (Figura 12L).

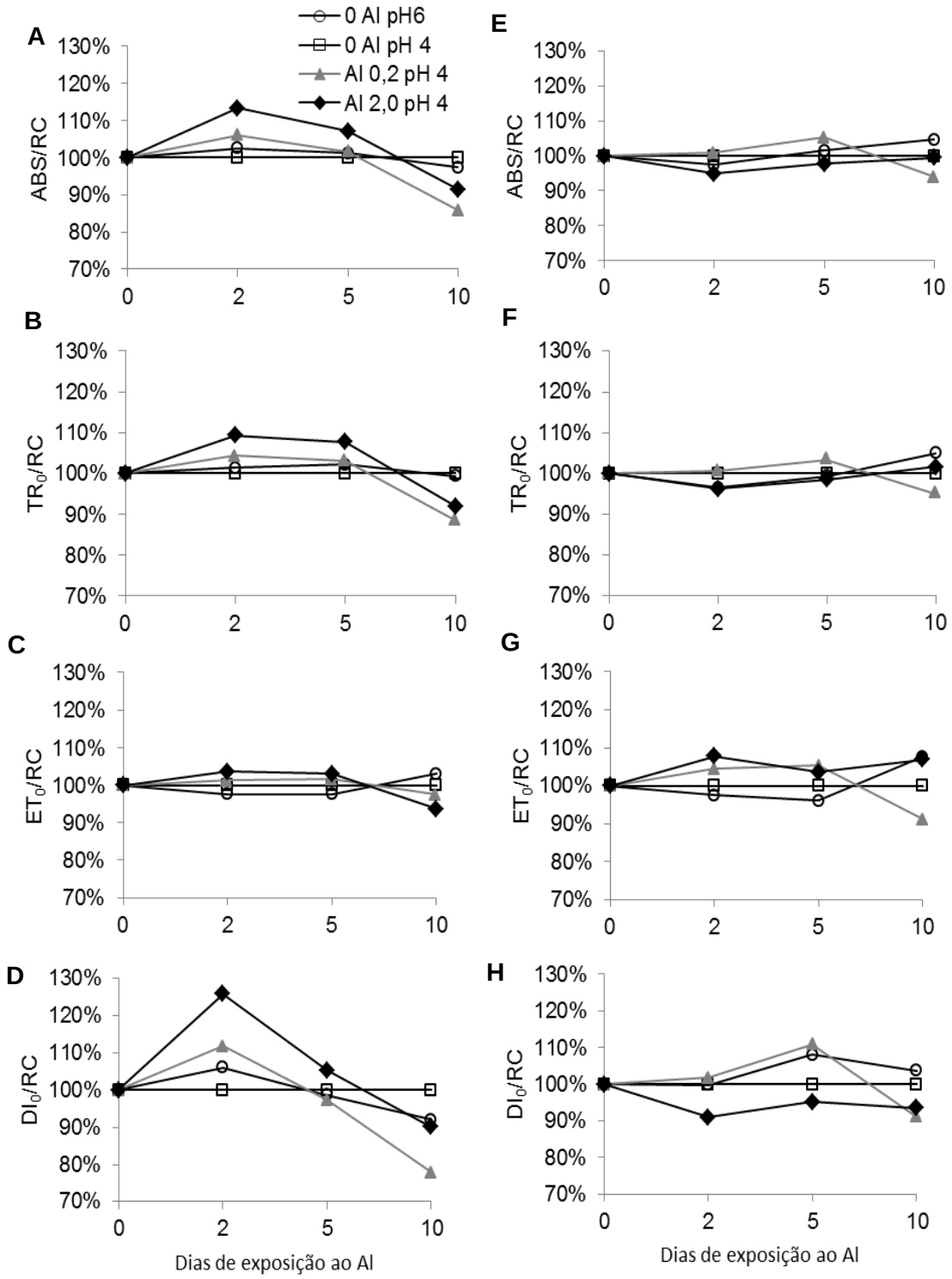

Figura 11: Parâmetros da fluorescência da clorofila a derivados do Teste-Jip de folhas de maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) cultivados em casa de vegetação sob diferentes concentrações de Al em solução. ABS/RC=Fluxo de absorção de energia luminosa por centro de reação ativo. TR_0/RC=Fluxo de captura de energia por centro de reação ativo. ET_0/RC=Fluxo de transporte de elétrons por centro de reação ativo. DI_0/RC=Fluxo de energia dissipada por centro de reação ativo.

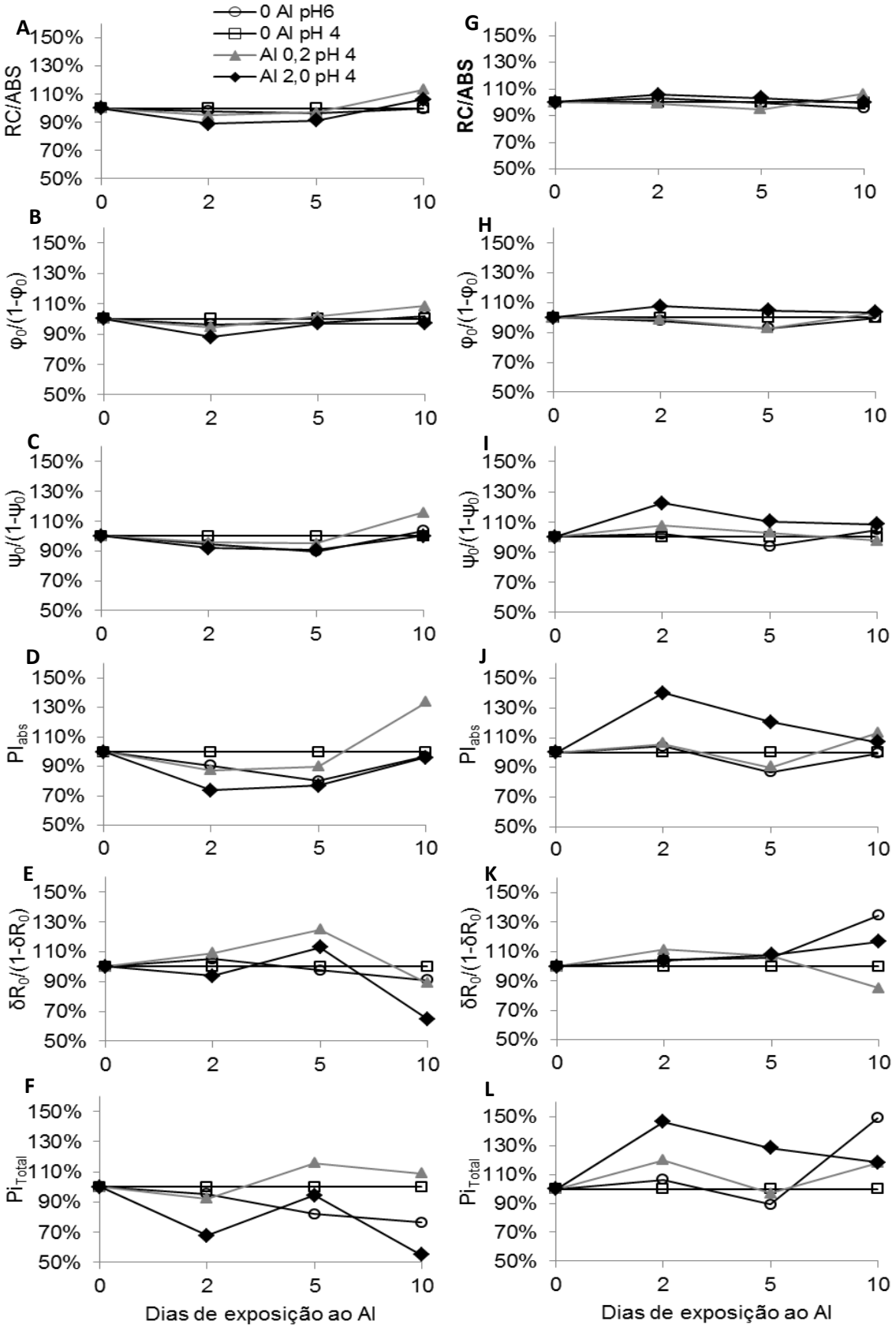

Figura 12: Índice de desempenho (PI) e parâmetros derivados em plantas jovens de maracujazeiro cv FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) em casa de vegetação após dois, cinco e 10 dias de tratamento com diferentes concentrações de Al.

4.5 ATIVIDADE ESPECÍFICA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

De maneira geral, a atividade específica da catalase, peroxidase do ascorbato e superóxido dismutase (SOD) de ambas as cultivares (Figura 13) não mostrou diferença estatística entre os tratamentos ao longo do experimento ($p>0,05$). Contudo, a cultivar FB 100 aos 10 dias de tratamento, apresentou atividade da SOD aumentada nas plantas expostas ao Al, principalmente nas tratadas com 0,2 Al pH 4,0 ($p<0,05$) (Figura 13C).

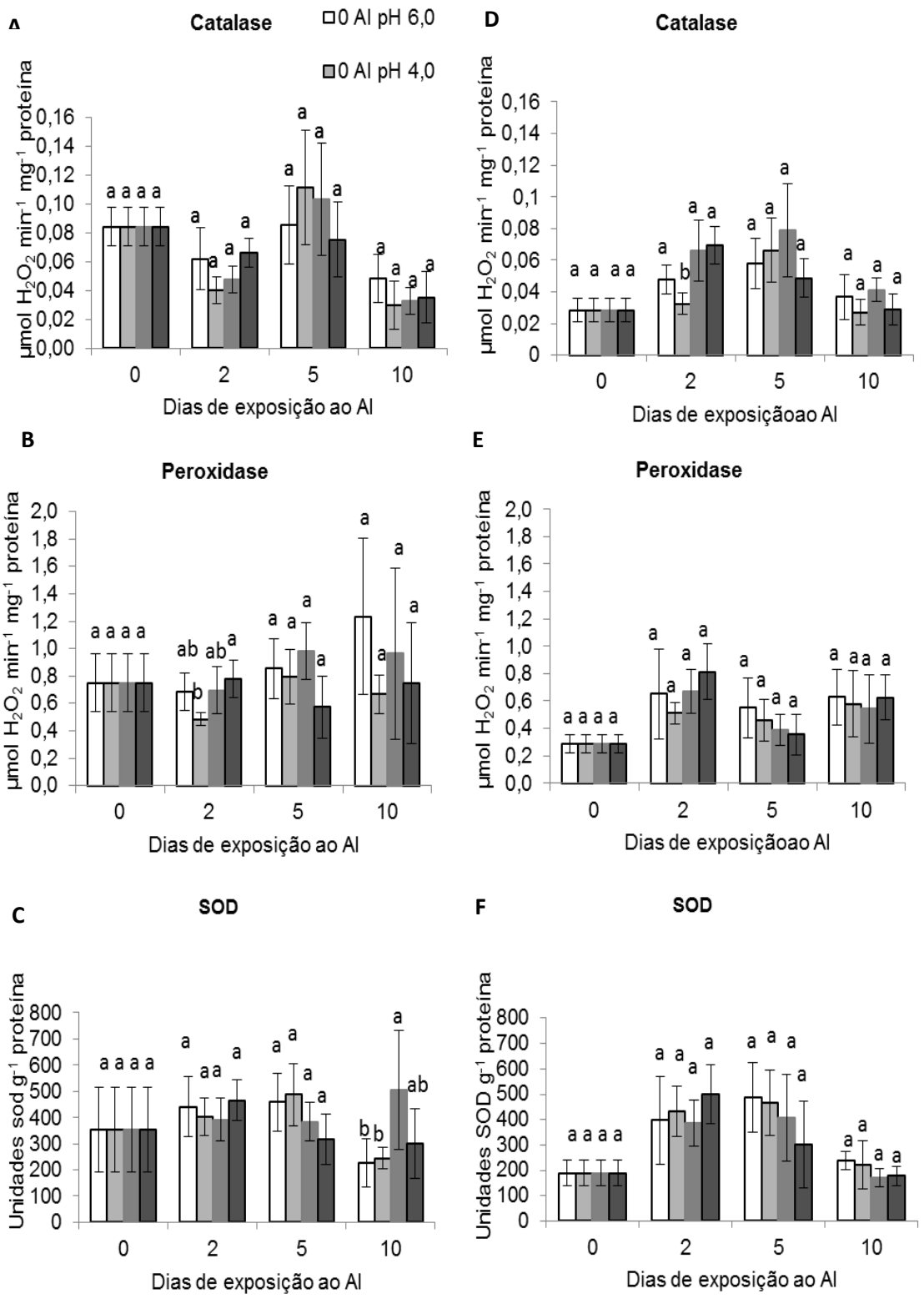

Figura 13: Atividades específicas das enzimas catalase (A e D), peroxidase (B e E) e superóxido dismutase (SOD) (C e F) do maracujazeiro cv. FB 100 (A, B e C) e FB 200 (D, E e F) submetido a diferentes condições de Al e pH em solução. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as méidas (Tuckey 5%). Barras = desvio padrão da média.

5 DISCUSSÃO

Uma resposta comum das plantas quando submetidas a estresses ambientais é o ajustamento osmótico, que contribui para a tolerância ao estresse (MARIN et al 2008). O mecanismo de ajustamento osmótico é fundamental para evitar a diminuição do potencial hídrico celular em consequência da biossíntese de solutos compatíveis intracelulares. Estes se acumulam em altas concentrações no vacúolo ou no citosol, mantendo a turgidez e o volume celular e preservando a integridade de compostos e estruturas celulares fundamentais para o adequado metabolismo vegetal (ABDUL JALEEL et al., 2007).

Toda mudança que ocorre no ambiente e que provoque um estresse sobre as plantas, pode ter como resultado prejuízos no processo fotossintético, como o comprometimento dos movimentos estomáticos, da captação de luz e da etapa bioquímica de fixação do CO_2 (PELL et al, 1994). Alterações na atividade fotossintética induzida por metais pesados, incluindo o Al, têm sido observadas em diversas culturas, incluindo em café (KONRAD et al. 2005), dendezeiro (CRISTANCHO et al 2010), tangerina (CHEN et al 2005; JIANG et al 2008) e batata doce (ADAMSKY et al 2010). Segundo He et al (2011) e JIANG et al (2009), a queda da taxa fotossintética em plantas expostas ao Al é em parte devido à precipitação do fósforo em pH baixo.

Ambas as cultivares mostraram habilidade em lidar com os baixo pH e Al, já que a exposição a estes tratamentos durante 10 dias não afetaram significativamente a assimilação líquida de CO_2. Porém, as tendências à queda observadas podem indicar que o tempo de tratamento não foi suficiente para modificar esta características. Contudo, de maneira geral, o estresse causado pelo baixo pH parece ser potencializado com o aumento da concentração de Al na solução nutritiva.

Segundo Larcher (2006), quando expostos a algum tipo de estresse, os organismos passam por uma sucessão de fases características. A primeira é a fase de alarme, na qual ocorrem distúrbios funcionais como forma de reação ao estresse. A partir daí ocorre o que o autor chama de restituição, quando estes

distúrbios são superados. A fase de restituição pode ser seguida da fase de rustificação, que está presente quando ocorre uma compensação mais intensa do que o estresse inicial. A partir daí, pode ser observada a fase de ajustamento, quando os distúrbios são estabilizados, ou a fase de exaustão, que ocorre quando a injúria é crônica e os danos podem chegar a ser irreversíveis.

Ao longo dos 10 dias de tratamento, a assimilação líquida do CO_2 de ambas as cultivares, apresentou fases características do estresse em resposta ao Al. Em FB 100 a fase de alarme, parece ter ocorrido antes dos dois dias de exposição. Já a fase de rustificação pode ser observada principalmente aos dois dias, quando a assimilação líquida do CO_2, tendeu ao aumento, principalmente nas plantas expostas a maior concentração de Al (2,0 Al pH 4,0).

A partir de cinco dias de exposição parece ter ocorrido a fase de exaustão, quando é observada tendência a um decréscimo das taxas de assimilação líquida de CO_2, sendo mais pronunciada nas plantas expostas a 2,0 Al pH 4,0. Esta tendência ao declínio ocorreu mesmo com uma tendência ao aumento do índice de clorofila. Esta resposta sugere que a exposição da cultivar FB 100 do maracujazeiro a alta dose de Al (2,0 Al pH 4,0) leva a um estresse mais acentuado quando comparado aos outros tratamentos, portanto, de resposta mais rápida, do que a exposição a concentração 0,2 Al pH 4,0. A cultivar FB 200 se comportou de maneira semelhante, porém, a dose alta de Al (2,0 Al pH 4,0) parece não ter desencadeado respostas mais intensas na assimilação líquida do CO_2, quando comparado com a dose baixa (0,2 Al pH 4,0).

Em ambas as cultivares foi observado tendência ao aumento nos níveis de clorofila nas plantas tratadas com pH 4,0, principalmente naquelas expostas a 2,0 Al pH 4,0. Contudo, o declínio dos teores de pigmentos fotossintéticos tem sido observado em diversos tipos de estresse, inclusive sob efeito de metais pesados como cromo (ZENG et al 2011) e manganês (LINDON et al 2004). Maior tempo de exposição ao Al também promoveu a redução dos

teores de pigmentos fotossintéticos em milho, (LINDON et al 1999), soja (MILIVOJEVIC et al 2000) tangerina, ZHANG et al 2007), tangerina (JIANG et al 2008; CHEN et al 2005a,b) e cultivares sensíveis de sorgo (OHKI, 1986 e PEIXOTO et al 1994). Desta forma, esta tendência ao aumento pode não ser mantida.

As plantas submetidas a todos os tratamentos com Al e pH mostraram aumento típico da fluorescência transiente, revelando as fases OJIP. (STRASSER & STRASSER, 1995). Isto indica que todas as amostras estavam fotossinteticamente ativas (YUSUF et al., 2010). A fluorescência variável relativa das amostras não mostrou respostas claras, porém, as curvas de cinética de fluorescência transiente revelam o aparecimento das bandas L e K positivas apenas na cultivar FB 100 e apenas nos primeiros dias de exposição ao Al. A banda L está relacionada à transferência de energia entre as unidades que compõem o FSII, sendo frequentemente atribuída como conectividade e agrupamento (STRASSER; STIRBET, 1998). Isto sugere que a exposição ao Al levou a um prejuízo na transferência de energia do FSII e que a dissipação de energia (DI_0/RC) foi aumentada como alternativa para melhorar a utilização da energia de excitação e evitar a formação de EROs, que levaria ao estresse oxidativo.

O aparecimento da banda K (por volta de 300 μs) têm sido observado sobre determinados estresses, como a exposição ao ozônio (BUSSOTTI et al 2011), deficiência de nitrogênio (REDILLAS et al 2011), alta temperatura e seca (SRIVASTAVA et al. 1997). Aos dois e cinco dias de tratamento, a presença da banda K positiva foi observada apenas na cultivar FB 100, com maior amplitude no tratamento 2,0 Al pH 4,0. Provavelmente isto foi consequência de um desbalanço entre os lados doadores e aceptores de elétrons do FSII (STRASSER, 1997) nos primeiros dias de exposição ao Al. Segundo Yusuf et al (2010) a presença da banda K acentuada pode ser um reflexo da inativação do complexo de evolução de oxigênio e/ou aumento do tamanho da antena funcional do FSII (YUSUF et al, 2010). Gomes (2011) sugere que o aparecimento das bandas L e K pode ser indicador de distúrbios fisiológicos nas cultivares FB 100 e FB 200 do maracujazeiro, causados por restrição

hídrica, e que o desaparecimento das bandas pode ser indicador de recuperação. Jiang et al (2008) observou a presença da banda K positiva em tangerina exposta a 1,6 Al pH 4,0 por 150 dias.

No caso da cultivar FB 100, a banda K parece estar relacionada ao aumento da antena funcional justificado pelo aumento n na absorção de energia por centro de reação (ABS/RC) nos tratamentos com Al, principalmente 2,0 Al pH 4,0. Desta forma, a interpretação do aparecimento das bandas L e K, mais pronunciadas nas plantas tratadas com Al na cultivar FB 100, sugere que esta cultivar tem a funcionalidade do FSII mais sensível ao Al. Contudo, a cultivar FB 200 parece ter a funcionalidade do FSII afetada pelo Al apenas a partir de 10 dias de exposição.

O incremento da fotossíntese líquida, observado aos dois dias de tratamento em ambas as cultivares, quando tratadas com Al, foi acompanhado de aumento na concentração intracelular de CO_2, sendo, portanto, resultado de fatores não estomáticos. Na cultivar FB 200, este incremento pode ser atribuído ao maior índice de desempenho ($PI_{abs\ e}$ PI_{Total}) aos dois dias de exposição ao Al. Contudo, esta correlação não foi observada na cultivar FB 100. Isto pode ser um indício de que a fase fotoquímica da cultivar FB 100 respondeu de maneira mais lenta ao estresse, de forma que, possivelmente, se o tempo de exposição ao Al fosse maior, o PI diminuiria assim como a assimilação líquida de CO_2. Porém, estudos com maior tempo de exposição do maracujazeiro ao alumínio são necessários para confirmar esta hipótese. Contudo, os prejuízos na fase fotoquímica da cultivar FB 100 parecem não ter afetado de maneira negativa a fase bioquímica aos dois dias de exposição, já que houve uma tendência a maior taxa de assimilação líquida de CO_2.

Outro indício de que, na cultivar FB 100, as fases típicas do estresse podem ter ocorrido de maneira mais lenta na fase fotoquímica do que a fase bioquímica pode ser observada quando comparamos a flutuação nos fluxos de energia por centro de reação ativo com a flutuação dos dados de fotossíntese. A fase de alarme parece ter ocorrido aos dois dias e a fase de restituição a

partir dos cinco dias, não sendo possível observar a fase de resistência ou exaustão

Reduções nas taxas de fotossíntese líquida podem ocorrer mesmo com o aumento do PI (CASCIO et al 2010) se o estresse imposto afetar a Rubisco ou se houver incremento das taxas respiratórias. Contudo, um comprometimento na atividade da Rubisco não tem sido observado em outras espécies expostas a diferentes estresses, inclusive ao Al (CHEN et al. 2005b; JIANG et al 2008), sugerindo que, com o maior tempo de tratamento, a exposição ao Al pode aumentar o metabolismo da cultivar FB 100 aos dois dias de exposição como tentativa de minimizar o estresse causado pelo Al.

A partir de cinco dias de exposição há tendência ao declínio da assimilação líquida de CO_2 nas plantas de ambas as cultivares expostas ao Al que parece ter ocorrido, em parte, devido a uma limitação estomática, já que esta queda foi acompanhada de decréscimo na concentração intracelular de CO_2. De maneira contrária, estudos em longo prazo com tangerina (CHEN et al. 2005b), e sorgo (PEIXOTO et al. 2002) demonstraram que as taxas assimilatórias de CO_2 tendem a diminuir em resposta ao Al primariamente por fatores não estomáticos, sugerindo que, com a exposição das plantas ao Al por um período maior, as respostas podem mudar.

Além da limitação estomática, a queda da fotossíntese em resposta ao Al ao final do experimento, em ambas as cultivares, pode ter sido também consequência de um comprometimento da fase fotoquímica. A cultivar FB 100 aos 10 dias apresentou diminuição do desempenho do aparato fotoquímico (PI_{Total}) nas plantas tratadas com Al, principalmente pelo menor desempenho nas reações de oxi-redução no escuro ($\delta R_0/(1-\delta R_0)$). Isto pode ter levado, inclusive, à ativação do aparato de defesa enzimático, já que os níveis da SOD, enzima primária na defesa contra EROs, aumentou de maneira significativa na cultivar FB 100 ao fim do experimento. Este aumento da atividade da SOD indica que a exposição, principalmente a 0,2 Al pH 4,0, induz, ao final de 10 dias de exposição, a formação de radicais superóxido em uma quantidade maior do que nas plantas não tratadas com Al. Na cultivar FB 200, o

desempenho total do aparato fotoquímico (PI_{total}) tendeu a queda devido a uma redução no desempenho do fotossistema II (PI_{abs}), evidenciado também pelo aparecimento da banda K positiva.

O comprometimento da fase fotoquímica, observado na cultivar FB 100 aos dois dias de exposição ao Al e na cultivar FB 200 aos 10 dias, pode ter como resultado a baixa formação de poder redutor ($NADPH_2$ e ATP) e/ou com o decréscimo da eficiência de algumas reações de carboxilação. Como consequência, pode haver acúmulo de energia de fótons, já que apenas pequena parcela da energia que chega ao fotosistemas é utilizada no transporte de elétrons, parte da energia no centro de reação do FSII pode levar a formação de espécies reativas de oxigênio, comprometendo ainda mais o aparato fotossintético (DEMMIG-ADAMS & ADAMS, 1992, CHEN, et al 2004, CHEN et al 2005). O aumento da dissipação de energia luminosa pode ter ocorrido, em ambos os casos, como alternativa para evitar a formação de EROs. Quando a capacidade de dissipação do excesso de energia é saturada, é fundamental a atuação eficiente do sistema enzimático anti-oxidativo para a manutenção da integridade celular. Neste trabalho, porém, a atividade das enzimas antioxidativas diferiu pouco entre os tratamentos, indicando que a exposição ao Al não leva a um estresse pronunciado no maracujazeiro na situação analisada. Contudo, o aparato antioxidante parece ter apresentado, apesar de maneira menos evidente do que os outros parâmetros analisados, oscilações ao longo dos tratamentos que também indicam as fases típicas do estresse. Porém, para resultados mais conclusivos, seriam necessários estudos com menores intervalos de tempo entre as coletas.

6 CONCLUSÕES

As avaliações de características fisiológicas das cultivares FB 100 e FB 200 mostram queA exposição das cultivares FB 100 e FB 200 do maracujazeiro ao Al por 10 dias dão foi suficiente prejudicar a assimilação líquida do CO_2

pelas plantas. Contudo, é possível observar que o Al prejudicou o metabolismo fotoquímico de ambas as cultivares.

Os resultados também mostraram que as cultivares analisadas mostram respostas sutilmente diferentes à exposição ao Al. A cultivar FB 100 mostrou maior plasticidade fisiológica, confirmada pelo menor declínio das taxas de assimilação líquida de CO_2, mesmo com maior comprometimento na fase fotoquímica da fotossíntese.

As plantas tratadas com 0 Al pH 4,0 tiveram sua fisiologia afetada em praticamente todos os parâmetros, porém, foi possível observar que a presença do Al potencializa este efeito, sendo mais severo quando as plantas foram expostas a altas concentrações de Al em solução (2,0 Al pH 4,0).

CAPÍTULO II

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AL NO SOLO SOBRE ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LAVOURA DE MARACUJAZEIRO CV. FB 200

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi analisar aspectos fisiológicos de plantas adultas e frutos de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims. f. Flavicarpa Deg) cv. Yellow Master (FB 200) submetido a diferentes concentrações de alumínio (Al) em campo. As medidas foram realizadas em três lavouras de um ano de idade contendo 0 (pH 6); 0,33 (pH 5,6) e 2,6 mM de Al (pH 4,7). Foram avaliadas as trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, índice de clorofila, atividades específicas da SOD, catalase e peroxidase do ascorbato, além de características químicas e físicas dos frutos. Os resultados indicam que a concentração mais baixa de Al foi capaz de levar a maior estresse no aparato fotoquímico, evidenciado pela presença das bandas L e K além do menor índice de desempenho total do aparato fotoquímico. Porém, a presença de maior atividade da SOD e peroxidase do ascorbato nas plantas expostas à maior concentração de Al, indicam maior resposta do aparato antioxidante nestas plantas. O Al parece não causar grandes prejuízos ao aparato fotossintético do maracujazeiro, já que não foram observadas diferenças na assimilação líquida de CO_2 que resultaram em similaridades nas características físicas e químicas nos frutos das três lavouras.

Palavras-chave: Fluorescência da clorofila *a*, Al, estresse, fotossíntese, maracujá, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the chlorophyll fluorescence in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. F. Flavicarpa Deg) cv. Yellow Master (FB 200) subjected to different concentrations of aluminum (Al) in the field. The measurements were performed in three crops of one year old containing 0 (pH 6), 0.33 (pH 5.6) and Al 2.6 mM Al (pH 4.7). We evaluated gas exchange, chlorophyll fluorescence, chlorophyll content, specific activities of SOD, catalase and ascorbate peroxidase, as well as chemical and physical characteristics of the fruits. The results indicate that the lowest concentration of Al was able to lead to greater stress on the photochemical apparatus as evidenced by the presence of bands L and K as well as lower total performance index of the photochemical apparatus. However, the presence of higher activity of SOX and ascorbate peroxidase in plants exposed to the higher concentration of Al, showed greater response apparatus antioxidant in these plants. Al does not seem to cause major damage to the photosynthetic apparatus of passion fruit, since there were no differences in net assimilation of CO_2 resulted in similarities in physical and chemical characteristics in the fruits of the three crops.

Keywords: Field, Al, stress, photosynthesis, passion fruit.

1 INTRODUÇÃO

A fruticultura é um setor da economia capixaba que apresenta grande potencial de crescimento. O mercado está em franca expansão, em razão da elevada demanda da agroindústria de sucos prontos para o consumo, aumentando a perspectiva de crescimento no setor, tanto para a produção, quanto para o processamento de frutas (COSTA & COSTA, 2005).

A implantação e o desenvolvimento dos pólos de fruticultura têm passado por ações de planejamento focadas na adequação da base tecnológica, visando ampliação de produção, produtividade e melhoria na qualidade do fruto. Para isso é necessário o desenvolvimento de técnicas agrícolas que propiciem sistemas de cultivo adaptados às condições edafoclimáticas do Estado, garantindo, assim, uma melhor remuneração líquida aos fruticultores familiares (COSTA & COSTA, 2005).

No Espírito Santo é comum a presença de Latossolos, que, segundo Curi et al (2010), podem apresentar alto teor de Al trocável. Contudo, pouco se sabe sobre o comportamento fisiológico do maracujazeiro em resposta a diferentes concentrações de Al no solo, principalmente em relação às respostas do aparato fotossintético à exposição ao Al.

A maioria das espécies cultivadas apresenta grande sensibilidade ao estresse causado pelo alumínio (MENDONÇA et al. 1999). O metal acumula-se preferencialmente nas raízes das plantas, sendo uma pequena porção transportada para a parte aérea. As injúrias que ocorrem nas raízes em função do estresse de Al^{3+} são caracterizadas por efeitos sobre a estrutura morfológica, causando engrossamento e diminuindo seu crescimento (FOY et al., 1978). O Al também causa modificações com relação ao metabolismo de minerais, redução da absorção de alguns nutrientes e nos mecanismos de transporte para a parte aérea e na sua funcionalidade (LINDON et al., 1999; AKAYA e TAKENAKA, 2001), danos estes que podem levar a sérias perdas de produtividade na cultura.

Para a maioria das culturas, o sintoma inicial e mais dramático da toxidez do alumínio é a inibição da expansão celular das raízes (TAYLOR, 1988), o que ocasiona redução e engrossamento do sistema radicular, diminuindo a absorção de água e de nutrientes. Altas concentrações de alumínio no solo podem causar redução no acúmulo de matéria seca em trigo (MOUSTAKA, et al.; 1997), café (BRACCINI, et al., 1998) e citros (PEIXOTO, et al. 2006). Resultados semelhantes foram encontrados em maracujá-amarelo (MENDONÇA, 1999).

Segundo Konrad et al. (2005), os efeitos do Al sobre o crescimento da parte aérea podem ocorrer como consequência da diminuição da atividade fotossintética. Reduções nas taxas fotossintéticas estão intimamente relacionadas a possíveis danos fotoquímicos (fotoinibição e/ou fotoxidação) ou a danos na maquinaria de fixação bioquímica do carbono, podendo ser relacionados às condições ambientais estressantes (LAWLOR, 1995). Em algumas espécies, a toxidez por Al leva a reduções na condutância estomática e nas reações bioquímicas de fixação de CO_2, como foi observao em milho (LINDON et al., 1999) e café (KONRAD, et al. 2005). O Al também causa injúrias na formação e na função do cloroplasto, afetando as membranas do tilacóide e o transporte de elétrons (MOUSTAKA et al., 1997), interferindo de forma direta na taxa de assimilação de CO_2.

Contudo, a fotossíntese, em espécies ou cultivares mais tolerantes, é menos afetada, podendo apresentar estratégias de adaptação do aparelho fotossintético em função do tempo de duração do estresse (KONRAD et al., 2005). Investigações prévias propõem que o Al causa declínio na assimilação líquida de CO_2 como resultado de inativação dos centros de reação do PSII. Em plantas tolerantes, a atividade do FSI se apresenta aumentada em resposta a exposição a metais pesados (DHIR et al 2011). O aumento da atividade do FSI mediada pelo transporte de elétrons pode ser uma alternativa ao fluxo adicional de elétrons que ocorre durante o estresse. Em geral, a baixa regulação do ciclo linear elétrons e a ativação do transporte cíclico de elétrons têm sido reportadas como resposta à exposição a diferentes estresses abióticos (GOLDING et al, 2004; SCHEIBE et al., 2005).

O aumento na atividade das enzimas antioxidantes também tem sido relatado à tolerância ao Al em muitas variedades de milho (BOSCOLO et al 2003), arroz (DARKÓ et al 2003) e trigo (MA at al 2007) como forma de manutenção da viabilidade celular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como objetivo avaliar as respostas fisiológicas da cultivar FB 200 (Yellow Master) do maracujazeiro (*Passiflora edulis Sims* f. *flavicarpa* Deg) na presença de diferentes concentrações de Al em campo.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar se diferentes concentrações de Al podem afetar características de trocas gasosas na cultivar FB 200 de maracujazeiro;

- Analisar se há diferença no acumulo de clorofilas *a, b*, razão a/b e clorofila total em maracujazeiros da cultivar FB 200 expostos a diferentes concentrações de Al no solo.

- Discutir como diferentes concentrações de Al no solo afetam a fluorescência transiente e modulada na clorofila *a* no maracujazeiro da cultivar FB 200.

- Investigar se há diferenças na atividade das enzimas antioxidantes das folhas de maracujazeiros de plantas submetidas a diferentes concentrações de Al no solo;

- Verificar se a exposição ao Al é capaz de afetar aspectos referentes à qualidade dos frutos do maracujazeiro da cultivar FB 200.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O experimento foi realizado em plantas de três lavouras de, em média, um ano de idade, localizadas no município de Jaguaré no ES, onde foram constatadas, através de análise de solo (ANEXO I), diferentes concentrações de Al disponível, sendo elas 0 Al (pH 6), 0,33 mM de Al (pH 5,6) 2,6 mM de Al (pH 4,7). A concentração de nutrientes de folhas de cada lavoura (ANEXO II) também foi determinada. De acordo com o sistema UTM (WGS84) de coordenadas, as fazendas se localizam a X: 0390038 Y: 7903486 e a 52 m do nível do mar (lavouras 0 Al pH 6 e 0,33 Al pH 5,6) e a X: 0387968 Y: 7901355 a 2m do nível do mar (lavoura 2,6 mM pH 4,6).

3.2 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS AVALIADAS

As coletas de dados em campo para as avaliações fisiológicas foram realizadas nos dias 1 e 2 de julho de 2011.

3.2.1 Conteúdo de água no solo

O teor de umidade do solo foi monitorado com o auxílio de um sensor de umidade (Decagon Devices, modelo PC-1), instalado no solo, próximo às raízes na profundidade de 10 cm. Foram realizadas três medidas em cada lavoura.

3.2.2 Trocas gasosas e Assimilação líquida do CO_2

A taxa de assimilação líquida do CO_2 (*A*), os parâmetros de trocas gasosas (g_s, C_i, C_i/C_a) e a taxa de transpiração (*E*) foram determinados em folhas jovens completamente desenvolvidas de 12 plantas por lavoura, utilizando-se um analisador de gás no infravermelho IRGA (LCI System, ADC). Todas as medições ocorreram sempre entre 7:30h e 9:00h, utilizando-se radiação fotossinteticamente ativa de 1500 µmols m^{-2} s^{-2}, temperatura e umidade ambiente.

3.2.3 Índice de clorofila A, B e Total

Os índices de clorofila A, B e total foram estimados em folhas jovens completamente expandidas de 25 plantas de cada tratamento. Para isto foi utilizado um clorofilômetro (Minolta Camera Co. Ltd.).

3.2.4 Fluorescência transiente da clorofila *a*

A fluorescência transiente da clorofila *a* foi determinada com o auxílio de um fluorômetro portátil (Handy PEA, Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK). Todas as leituras foram realizadas no período da manhã (entre 7:30h e 9h) em folhas jovens completamente expandidas de 15 plantas por lavoura, após a aclimatização das amostras em escuro por 30 minutos. A emissão de fluorescência foi induzida em uma área de quatro mm de diâmetro da folha pela exposição da amostra a um pico de luz vermelha de 3.000 µmol $m^{-2}s^{-1}$ (CASCIO et *al.* 2010). Os dados foram processados através do software Biolyzer (R. Maldonado, Rodriguez, Laboratório de Bioenergética. Genebra, CH) para a obtenção dos parâmetros do Teste-Jip.

3.2.5 Fluorescência da clorofila *a* com pulso modulado

Os parâmetros da fluorescência modulada da clorofila *a* foram medidos com o auxílio de um fluorômetro portátil FMS-2 (Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, Northfolk, UK). Foram realizadas medidas da fluorescência atual: Produtividade quantica efetiva do FSII, (FV`FM`); Taxa de transporte de elétrons, (ETR); Coeficiente de extinção fotoquímico [qP = (FM'- Fs)/(FM'- F0')]; Eficiência fotoquímica atual do FS II [φ PSII = (FM'- FS)/ FM']. Esses parâmetros foram utilizados para avaliar o comportamento efetivo dos fotossistemas.

3.2.6 Determinação do conteúdo de proteína total e da atividade de enzimas antioxidantes

Para as análises da atividade de enzimas antioxidantes foram retiradas a primeira folha jovem completamente expandida de seis plantas de cada tratamento. Imediatamente após a coleta, cada folha foi rapidamente embalada em papel alumínio, armazenada em gelo e levada ao laboratório onde as amostras foram armazenadas em ultra freezer a -85°C.

a) <u>Obtenção do extrato enzimático</u>

Para obtenção do extrato enzimático, foram macerados 0,2 g de cada amostra coletada de massa fresca foliar com uma pitada de polivinilpolipirolidona (PVPP) 1% (p/v). Em seguida, foi acrescentado 750µL de solução de extração contendo tampão fosfato de potássio 100mM (pH 6,8), 30µL de EDTA 10 mM, 150µL de ácido ascórbico 100mM e 585µL de água ultra pura. O macerado foi centrifugado por 15 minutos em centrífuga (Hermle Labortechnik GmbH) a 15000g a 4ºC. O sobrenadante de cada amostra foi então separado, armazenado em um eppendorf e congelado em ultra freezer a -85°C para posterior leitura do teor de proteína total e das atividades da catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APx) e superóxido dismutase (SOD).

b) Teor de Proteína Total

Para a determinação do teor de proteína total foi utilizada metodologia proposta por Bradford (1976).

Para o preparo de cada 100 mL de reagente de cor, 10mg de Comassie Brilliant Blue G250 foram dissolvidos em 4,7mM de etanol absoluto. Após misturar, foi adicionado 10mL de ácido fosfórico (H_3PO_4 85% p/v). Após homogeinizar-se a solução obtida, completou-se o volume para 100mL com água deionizada. A solução obtida foi filtrada antes de cada dia de leitura em papel de filtro de filtragem média. Reservou-se o filtrado em frasco escuro.

Para a obtenção da curva padrão, foram preparados seis tubos de ensaio contendo 5 mL de reagente de cor e, nos tubos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram acrescentados respectivamente 100µL, 80 µL, 60 µL, 40 µL, 20µL e 0 µL de água deionizada e 0µL, 20µL, 40µL, 60µL, 80µL, 100µL de solução de Bovine Serum Albumine (BSA) na concentração de 1mg/L. As amostras foram lidas em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis) a 595 nm utilizando-se o tubo 1 como branco.

O resultado das leituras de cada amostra foram plotados em um gráfico de regressão linear para a obtenção de uma fórmula.

c) Atividade da enzima Catalase (E.C. 1.11.1.6)

Para a determinação da atividade bruta da catalase foi adicionado 25µL do extrato bruto e 200 µL de H_2O_2 250 mM a um tubo de ensaio incubado em banho maria a 28°C contendo 1,775 mL água ultra pura e 2mL de tampão fosfato 100mM (pH 6,8) a 28°C (HAVIR & MCHALE, 1989). As amostras foram então levadas para leitura de 15 em 15 minutos em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis), por um período de 1 minuto e 30 segundos a 240 nm. Para a determinação da atividade da enzima foi utilizada a fórmula de acordo com a lei de Lambert-Beer:

$$A = E \times C \times L$$

Onde:

A=Absorbância a 240nm,

E= Atividade bruta,

C=Coeficiente de extinção molar (0,036 cm^2 $umol^{-1}$)

L=Largura da cubeta (1cm).

A atividade específica de cada amostra foi determinada dividindo-se o valor da atividade bruta da catalase pelo teor de proteína total obtido em cada amostra.

d) Atividade da enzima Peroxidase do Ascorbato (E.C. 1.11.1.11)

Para a determinação da atividade bruta da peroxidase do ascorbato foi adicionado 50µL do extrato bruto e 200 µL de H_2O_2 2mM a um tubo de ensaio incubado em banho maria a 28°C contendo 1,775 mL água ultra pura e 2mL de tampão fosfato 100mM (pH 6,8) a 28°C (HAVIR e MCHALE, 1989). As amostras foram então levadas para leitura de 15 em 15 minutos em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis), por um período de 1 minuto e 30 segundos a 20 nm. Para a determinação da atividade da enzima foi utilizada a fórmula de acordo com a lei de Lambert-Beer:

A=E x C x L

Onde:

A=Absorbância a 240nm,

E= Atividade bruta,

C=Coeficiente de extinção molar (240 nm de 0,0028 cm^2 $umol^{-1}$)

L =Largura da cubeta (1cm).

A atividade específica de cada amostra foi determinada dividindo-se o valor da atividade bruta da peroxidase pelo teor de proteína total obtido em cada amostra.

e) Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Para a determinação da atividade bruta da SOD foi preparado um coquetel, como meio de reação da enzima, contendo 1,5mL de tampão fosfato de potássio 100mM pH 6,8; 780µL de metionina 13mM; 60 µL de riboflavina 2mM; 60 µL de EDTA 0,1mM; 320 µL de água deionizada e 225 µL de NBT 75 µM para cada tubo de ensaio (DEL LONGO et al 1993). A metionina, a riboflavina e o NBT foram preparadas no escuro e mantidas em recipientes envolvidos em papel alumínio, a fim de evitar a ocorrência de fotoxidação. O NBT foi preparado apenas na hora da reação. Um tubo de ensaio foi identificado como branco do claro, no qual foi adicionados 50 µl de água no lugar d amostra. Outros três tubos foram envolvidos em papel alumínio e identificados como branco do escuro, nos quais foram adicionados 50 µl da amostra em cada. Nos demais tubos, foram adicionados 50 µl da amostra. Os tubos do branco claro e os demais tubos contendo a amostra foram levados à uma câmara de fotorredução (uma caixa fechada, contendo uma lâmpada) e foram mantidos por 30 minutos, até que a reação fosse identificada com a mudança da coloração do branco claro, de transparente para roxo, indicando a máxima redução do NBT para formar formazana azul). Os tubos foram, então, levados para leitura espectrofotométrica (Genesys 10S UV-Vis) a 560 nm (GIANNOPOLITIS & REIS, 1977).

A atividade da SOD foi definida em unidade SOD, sendo uma unidade SOD a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT. (BAILEY et al, 1996; GOEL & SHEORAN, 2003) segundo a fórmula:

$$SOD = (A/(a-b))-1$$

Onde:

A = absorbâncias dos tubos sem amostra (branco claro)

a = médias das absorbâncias dos tubos contendo as amostras

b = média das absorbâncias dos tubos contendo amostras, mantidos no escuro (branco do escuro)

A atividade específica de cada amostra foi determinada dividindo-se o valor da atividade bruta da SOD pelo teor de proteína total obtido em cada amostra.

3.2.7 Características físicas e químicas dos frutos

Para as análises das características físicas e químicas dos frutos, cinco frutos maduros de cada lavoura foram coletados e levados ao laboratório, onde, após a lavagem dos frutos, foram determinadas:

a) Espessura da casca: Determinada com o auxílio de um paquímetro.

b) Peso da casca e do fruto: Determinado com o auxílio de balança de precisão de duas casas decimais.

c) Comprimento e largura do fruto: Determinado com o auxílio de uma régua.

Para a avaliação das características químicas, bateu-se a polpa em um "Mix", sem danificar as sementes, passando, em seguida, a polpa por uma peneira de nylon (ARAÚJO et al., 2007) obtendo-se, assim, o suco, do qual foram determinados:

a) Teor de sólidos solúveis (SS): Obtido pela leitura direta de duas gotas do suco em refratômetro digital (Instrutherm, RTD-45), com compensação automática de temperatura (AOAC, 1992). Os resultados foram expressos em °Brix.

b) pH: Determinado diretamente em peagâmetro digital (GEHAKA)

c) Acidez titulável (AT): foi obtida pela titulação de alíquotas de 10 mL de uma solução contendo 5 mL da amostra, diluídos em 50 mL de água destilada. Em seguida, três gotas de fenolftaleína a 2% foram adicionadas e a titulação padrão em NaOH 0,1 N foi realizada. Os

resultados foram expressos em % de ácido cítrico, usando a equação seguinte equação (ABREU 2006):

% ácido cítrico: Vg x N x F x Eq.ác. / 10 x g

Sendo:

Vg = volume de NaOH gasto (mL)

N = normalidade do NaOH = 0,1 N

F = fator de correção obtido para a padronização do NaOH = 1,00

Eq.ác.= equivalente ácido do maracujá = 64

g = massa da amostra = 1g

d) SS/AT: Determinada por meio da relação entre os teores de sólidos solúveis e a acidez titulável da polpa.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com quatro (tratamentos) x duas (cultivares) x três, seis, 12 ou 15 (repetições). Os dados paramétricos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o programa Origin 8.0. Os dados não paramétricos (fluorescência da clorofila a foram normalizados subtraíndo-se o valor obtido por cada tratamento pelo tratamento 0 Al pH 4,0, de forma que o tratamento 0 Al pH 4,0 igualou-se a zero (curvas OJIP e suas derivadas). ou dividindo-se o valor obtido por cada tratamento pelo valor obtido pelo tratamento 0 Al pH 4,0, de forma que o controle igualou-se a 1 (parâmetros derivados da curva OJIP).

4 RESULTADOS

4.1 CONTEÚDO DE ÁGUA NO SOLO

O teor de umidade do solo não apresentou variação entre as três lavouras analisadas ($p>0,05$) (Figura 14), indicando que no momento das

análises não havia diferenças quanto à disponibilidade de água para as plantas.

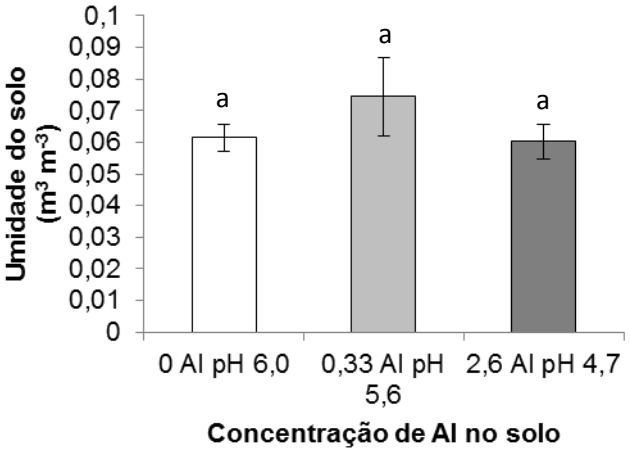

Figura 14: Umidade do solo de lavouras de maracujazeiro com diferentes concentrações de Al no solo. Barras = desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatística (Tukey a 5% de probabilidade)

4.2 TROCAS GASOSAS E ASSIMILAÇÃO LÍQUIDA DE CO_2

De maneira geral as trocas gasosas não diferiram entre as plantas das três lavouras analisadas ($p>0,05$) (Figura 14). As exceções foram a menor condutância estomática e menor transpiração apresentada pelas plantas expostas à maior concentração de Al (2,6 Al pH 4,7) ($P<0,05$) (Figura 15A e D). Porém, este decréscimo não foi suficiente para afetar a assimilação líquida de CO_2 ou a eficiência no uso da água (Figura 15B e C).

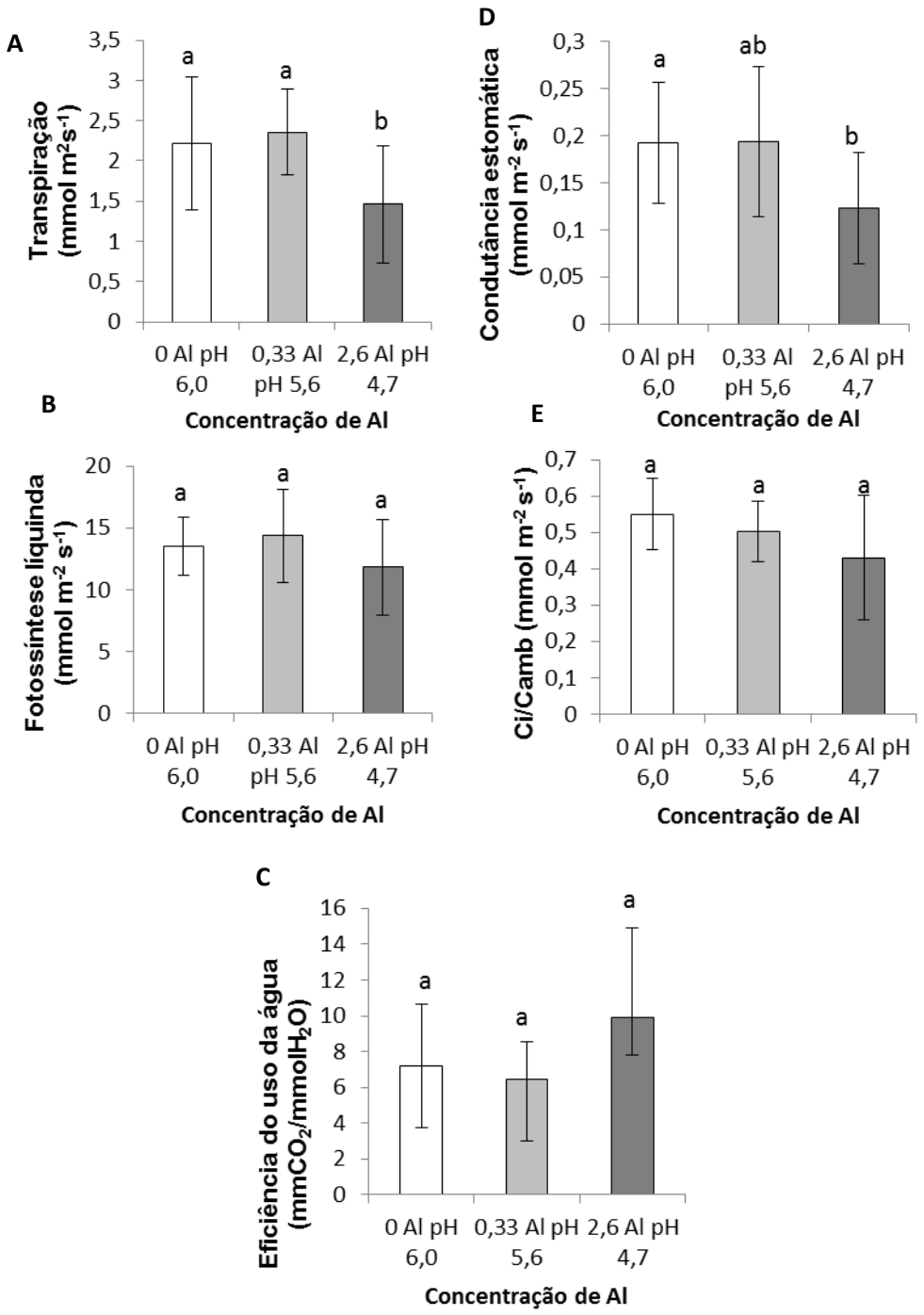

Figura 15: Fotossíntese, transpiração, relação entre o carbono interno e o carbono ambiente (C_i/C_{amb}) e eficiência do uso da água em folhas de maracujazeiro (FB 200) cultivadas em campo sob diferentes concentrações de Al. Barras=desvio padrão da média. Letras diferentes se referem à diferença estatística (Tukey a 5% de probabilidade).

4.3 ÍNDICE DE CLOROFILA FOLIAR

De maneira geral, os índices de clorofila só diferiram entre os tratamentos quanto à clorofila *b* que apresentou maiores valores nas plantas controle (0 Al pH 6,0) ($p<0,05$) e menores nas plantas expostas à menor concentração de Al (0,33 Al pH 4,7) ($p<0,05$). Contudo, estas diferenças não afetaram o índice de clorofila total ou a razão clorofila *a*/clorofila *b* (Figura 16).

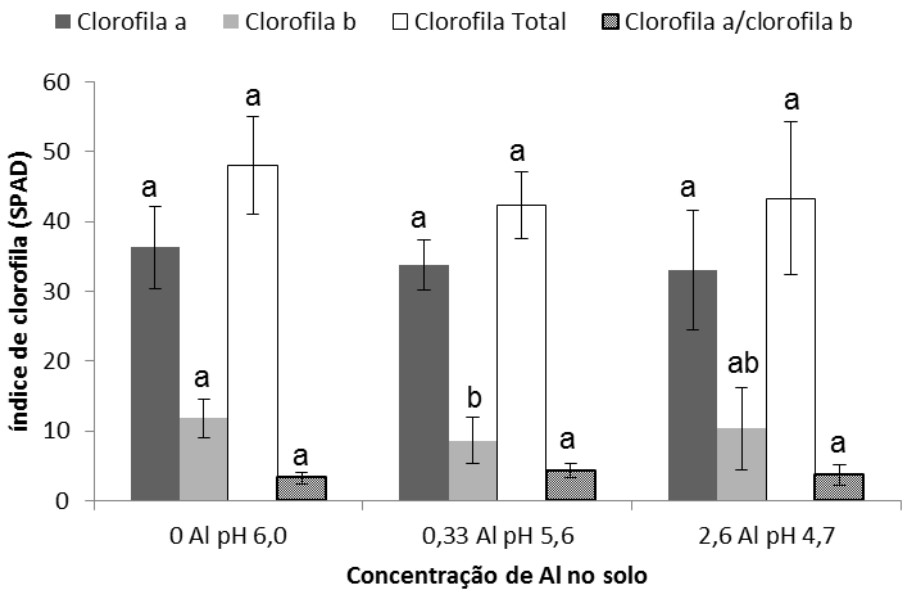

Figura 16: Índice de clorofila a, b, total e razão clorofila a/clorofila b de folhas de maracujazeiro FB 200 cultivadas em lavouras com diferentes concentrações de Al no solo. Barras = desvio padrão da média. Letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas (Tukey a 5% de probabilidade).

4.4 FLUORESCÊNCIA TRANSIENTE DA CLOROFILA A

As intensidades da fluorescência transiente da clorofila *a* de folhas de maracujazeiro adaptadas ao escuro das lavouras analisadas estão demonstradas na Figura 17**Erro! Fonte de referência não encontrada.**A, em escala logarítmica, de 50us a 1s. Todas as curvas mostraram padrão típico OJIP, já que estão nítidos os platôs referentes aos pontos O, J, I e P (STRASSER & STRASSER, 1995) indicando que todas as amostras se encontravam fotossinteticamente ativas (YUSUF et al, 2010). A fase O-J corresponde à redução fotoquímica do aceptor primário de elétrons, Quinona A (Q_A), dos centros de reação do FSII (STRASSER et al., 1995; LAZAR, 2004). A

fase J-I é caracterizada pela à excitação do FSII até a redução da plastoquinona. A fase I-P reflete a transferência dos elétrons até o lado aceptor do FSI (OUKARROUM et al., 2009; YUSUF et al., 2010).

Não foi possível verificar variação dos valores de F_0 entre plantas submetidas às diferentes concentrações de Al, porém, os valores de F_M foram menores na medida em que foi aumentada a concentração de Al no solo.

A fim de compreender melhor o comportamento polifásico das curvas OJIP nos diferentes tratamentos, os valores da fluorescência entre F_0 e F_m foram expressos como fluorescência variável relativa ($V_{OP} = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$) (TSIMILLI-MICHAEL, 2008). A fluorescência relativa está representada na Figura 17**Erro! Fonte de referência não encontrada.**C, na qual é possível identificar que diferentes concentrações de Al no solo foram capazes de afetar o aparato fotoquímico do maracujazeiro.

As curvas referentes às diferenças cinéticas da fluorescência transiente entre as lavouras analisadas em relação à lavoura controle (0 Al pH 6,0) ($\Delta V_{OP}=V_{OP(Tratamentos)}-V_{OP(0Al\ pH\ 6,0)}$, entre 50µs a 1s (Figura 17C) evidenciam a presença de bandas positivas na lavoura com menor concentração de Al (0,33 Al pH 5,6).

Para melhor avaliar as diferenças entre as lavouras, foram realizadas normalizações adicionais e suas respectivas diferenças cinéticas em relação à lavoura controle (0 Al pH 6,0). A diferença cinética da fluorescência relativa entre os passos O (50us) e K (300us) (ΔV_{OK}) evidenciou a presença da banda L positiva (por volta de 150µs) nas folhas da lavoura exposta à maior concentração de Al (0,33 e 2,6 mM) (Figura 18B). Segundo Yusuf (2010), a presença da banda L positiva é um indicador que demonstra baixa conectividade do PSII, sendo resultado de prejuízos na estabilidade do sistema, já que há prejuízos na transferência de energia.

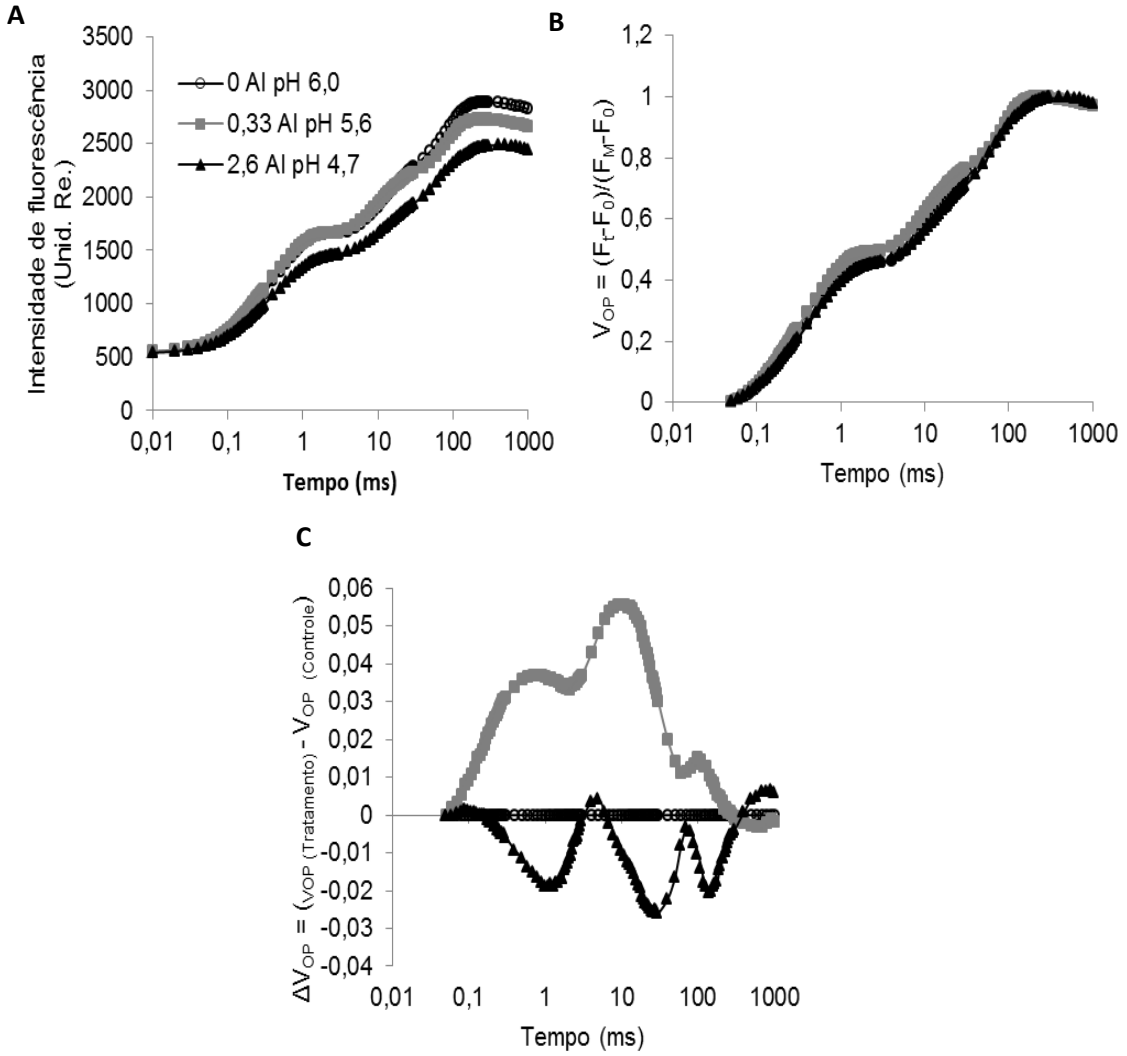

Figura 17: Fluorescência transiente da clorofila *a* do ponto O ao ponto P após dupla normalização entre os passos F_0 e F_P de folhas de maracujazeiro (FB 200), adaptadas ao escuro, cultivadas em campo sob diferentes concentrações de Al. (A) Intensidade de fluorescência (F_t); (B) Fluorescência variável relativa [$V_{OP} = (F_t-F_0)/(F_M-F_0)$; (C) diferença cinética de V_{OP} [$\Delta V_{OP} = (V_{OP(Tratamento)} - V_{OP(Controle)}$].

Já a diferença cinética da fluorescência relativa entre os passos O (50us) e J (2ms), normalizada pela fórmula (Banda K= [F_t - F_0]/ [F_J - F_0]), evidencia a Banda K (Figura 18A). As plantas expostas à concentração mais baixa de Al (0,33 Al pH 5,6) evidenciam banda K positiva. A presença da banda K positiva pode ser um reflexo da inativação do complexo de evolução do Oxigênio (CEO) e/ou um aumento no tamanho da antena funcional do FSII (YUSUF et al 2010).

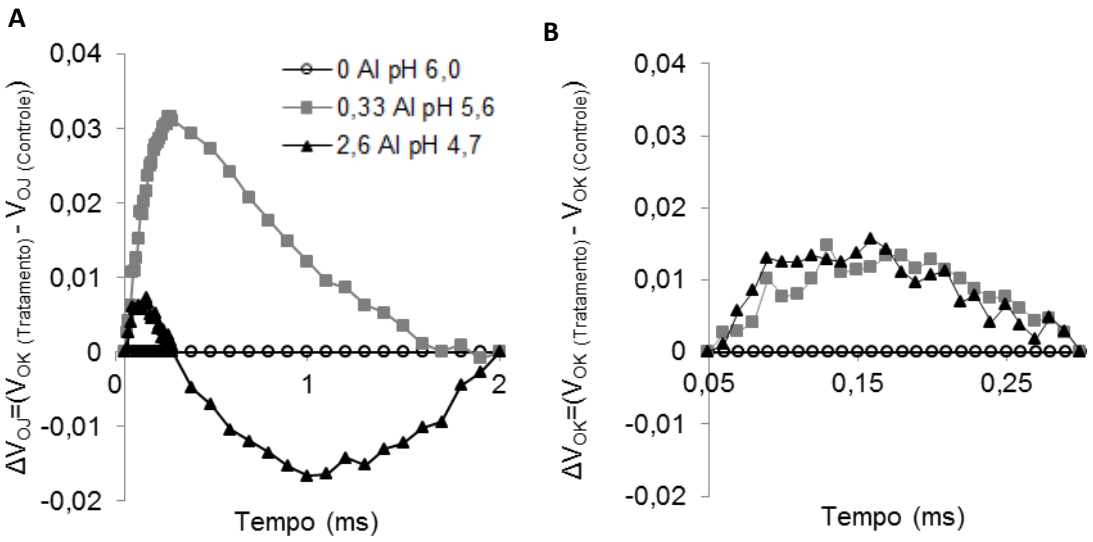

Figura 18: Fluorescência transiente da clorofila *a* do ponto O ao ponto J e do ponto O ao ponto K após dupla normalização entre os passos F_0 e F_K de folhas de maracujazeiro (FB 200) adaptadas ao escuro cultivadas em campo sob diferentes concentrações de Al. (A) Fluorescência variável entre os passos O e J [$V_{OJ} = (F_t - F_0) / (F_J - F_0)$] e diferença cinética entre os pontos O e J evidenciando a Banda K [$\Delta V_{OJ} = (V_{OK\ (Tratamento)} - V_{OJ\ (Controle)}$]. (B) Fluorescência variável entre os passos O e K [$V_{OK} = (F_t - F_0) / (FK - F_0)$] e diferença cinética entre os pontos O e K evidenciando a Banda L [$\Delta V_{OK} = (V_{OK\ (Tratamento)} - V_{OK\ (Controle)}$].

A fluorescência transiente descrita pela Figura 17A pode ser analisada através do Teste-JIP através de parâmetros funcionais e estruturais a fim de quantificar o comportamento das amostras de cada tratamento (STRASSER & STRASSER 1995). A figura 19 mostra os parâmetros biofísicos extraídos do Teste-JIP normalizados em relação aos valores apresentados pelas amostras da lavoura controle (0 Al pH 6,0).

Os parâmetros ilustrados na figura 19 referem-se aos fluxos de energia por centro de reação ativo (RC), sendo eles a absorção de luz pelos pigmentos antena do PSII (ABS), a captura desta energia pela clorofila *a* até a redução da quinona a (Q_A) (TR0), e o transporte de elétrons além Q_A até a redução dos aceptores do intersistema (ET_0) (YUSUF et al 2010). O fluxo de energia entre cada passo é conservado e usado no passo seguinte ou dissipado (DI_0) (YUSUF et al 2010). Na figura 19 também estão demonstrados os índices de desempenho parcial (PI_{abs}) e total (PI_{total}) do fotossistema. Já os índices de desempenho (PI) estão representados na Figura 20. Segundo Yusuf et al 2010, o PI_{total} é o parâmetro mais sensível do Teste-JIP já que incorpora muitos

parâmetros, sendo eles, os parâmetros que compões o PI_{abs} - densidade de centros de reação ativos (RC/ABS), a máxima eficiência quântica primária do fotossistema (φo/(1-φo)), a probabilidade do elétron se mover além da Q_A (ψo/(1-ψo)) - e a probabilidade de ocorrer redução do aceptor final de elétrons do PSI (δRo/(1-δRo)).

As plantas da lavoura com concentração mais baixa de Al (0,33 Al pH 5,7) mostraram menor densidade de centros de reação ativos, resultando em maior absorção e captura de elétrons por centro de reação ativo. Estas plantas também mostraram alta dissipação de energia quando comparadas às plantas controle (0 Al pH 6,0). Os índices de desempenho fotoquímico parcial (PI_{abs}) e total (PI_{Total}) destas plantas também foram inferiores em relação aos índices das plantas das duas outras lavouras, de forma que o desempenho parcial foi afetado pala baixa probabilidade do elétron se mover além da Q_A e o desempenho total pela baixa probabilidade de ocorrer a redução do aceptor final de elétrons do PSI ((δRo/(1-δRo)).

Já as plantas da lavoura com a maior concentração de Al (2,6 Al pH 4,7) não apresentaram valores tão discrepantes em relação à lavoura controle (0 Al pH 6,0) quanto às plantas da lavoura com concentração baixa de Al (0,33 Al pH 5,6). Nela, o Índice de desempenho total foi igual ao apresentado pelas plantas da lavoura controle, principalmente pela alta probabilidade de redução do aceptor final de elétrons do PSI (δRo/(1-δRo)).

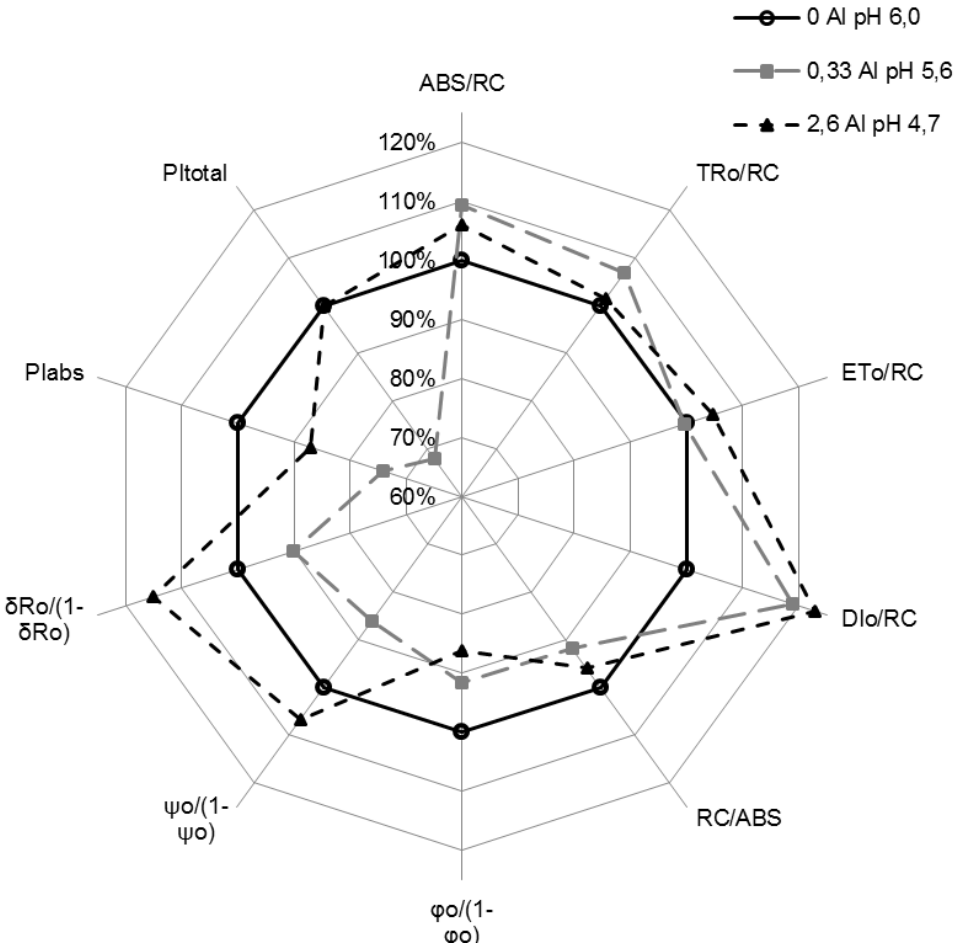

Figura 19: Valores relativos de parâmetros do JIP-Teste de folhas de maracujazeiro (FB 200) cultivadas em lavouras sob diferentes concentrações de Al no solo. Fluxos de energia por centro de reação: ABS/RC = Fluxo de absorção de energia luminosa por centro de reação. TR_0/RC = Fluxos de captura de energia por centro de reação. ET_0/RC = Fluxos de transporte de energia por centro de reação. DI_0/RC = Fluxos de dissipação de energia por centro de reação. Índices de performance e os parâmetros envolvidos: RC/ABS = Densidade de centros de reação ativos no PSII. $\varphi P_0/(1-\varphi P_0)$ = Performance das reações luminosas do PSII. $\Psi_0/(1-\Psi_0)$ = Performance das reações de oxi-redução do PSII. $\delta R_0/(1-\delta R_0)$ = Performance das reações de oxi-redução do PSI PI_{abs} = Índice de performance das reações luminosas do PSII (PI_{abs} = [RC/ABS] x $[\varphi P_0/(1-\varphi P_0)]$ x $[\Psi_0/(1-\Psi_0)]$. P_{ITotal} = Índice de performance total das reações luminosas (PI_{Total} = [RC/ABS] x $[\varphi P_0/(1-\varphi P_0)]$ x $[\Psi_0/(1-\Psi_0)]$ x $[\delta R_0/(1-\delta R_0)]$).

A presença de Al trocável no solo afetou o PI_{abs}, sendo que o menor índice foi observado nas plantas submetidas a 0,33 Al pH 5,6 no solo. O PI total também foi menor nessas plantas e altas concentrações de Al não afetaram o desempenho total do PSII, já que o alto fluxo de energia no PSI (δRo/(1-δRo)) compensou os baixos índices de desempenho do PSII (PI_{abs}).

4.5 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A COM PULSO MODULADO

A eficiência quântica da captura de energia no FSII adaptado a luz (FV'/FM') sofreu redução de pelo menos 15%, à medida que o teor de Al aumentou no solo (Figura 20). Da mesma forma, a eficiência fotoquímica efetiva do FSII (φPSII) apresentou aumento nas plantas expostas ao Al (Figura 20). A taxa de transporte de elétrons das plantas expostas à maior concentração de Al (2,6 Al pH 4,6) apresentou eficiência cerca de 40% menor em relação às plantas expostas às outras concentrações de Al. O coeficiente fotoquímico (qP) não apresentou grandes variações entre as plantas das diferentes lavouras analisadas, apesar de as plantas expostas à maior concentração de Al (2,6 Al pH 4,6) terem apresentado os maiores valores.

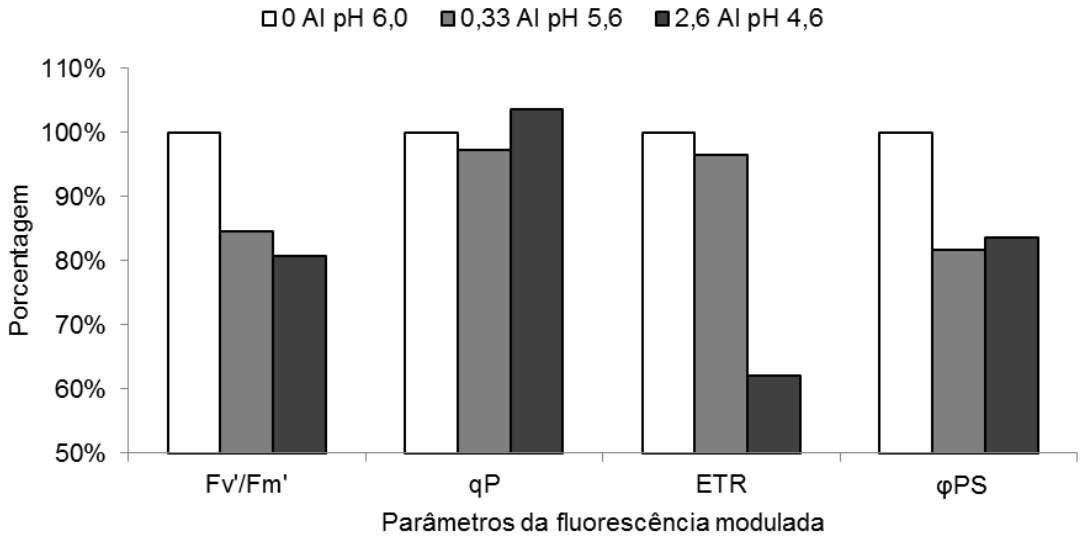

Figura 20: Valores relativos de parâmetros da fluorescência do estado adaptado à luz. Produtividade quântica efetiva do fotossistema II, (FV`/FM`); Taxa de transporte de elétrons, (ETR); Coeficiente de extinção fotoquímico [qP = (FM'- Fs)/(F_M'- F_0')]; Eficiência fotoquímica atual do FS II [φPSII = (F_M'- F_S)/ FM'] do maracujazeiro *Passiflora edulis* Sims cv. FB 200 submetidas a diferentes concentrações de Al no solo.

4.6 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

As plantas expostas à maior concentração de Al (2,6 Al pH 4,7) mostraram atividade da SOD aumentada cerca de quatro vezes ($p<0,05$) e atividade da Peroxidase aumentada cerca de duas vezes em relação às plantas expostas ás outras concentrações de Al ($p<0,05$).

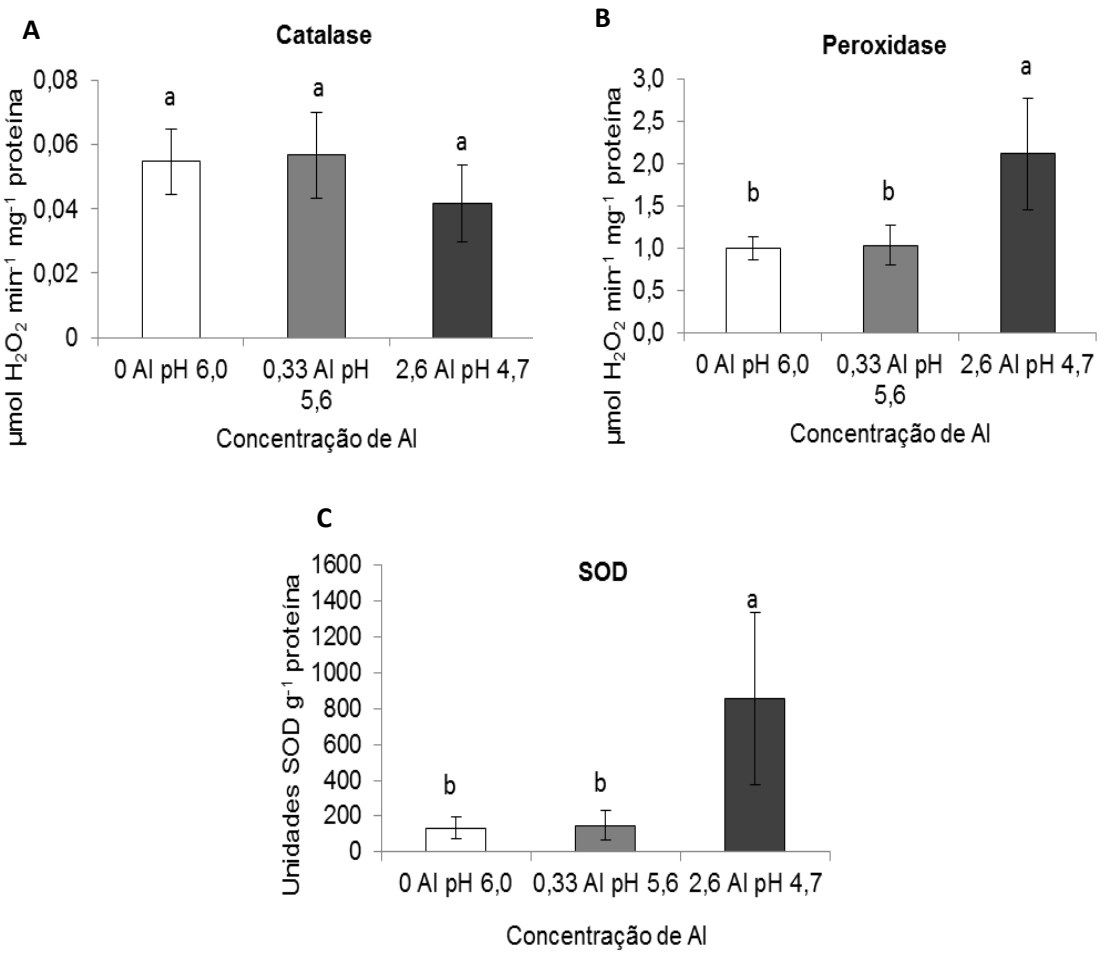

Figura 21: Atividades específicas da catalase, peroxidase do ascorbato e superóxido dismutase (SOD) de folhas de maracujazeiro crescidos em lavouras com diferentes concentrações de Al e pH no solo. Barras = desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatística (tuckey 5%).

4.7 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS FRUTOS

Não foram observadas diferenças estatísticas nas avaliações físicas (Figura 21) ou químicas (Figura 22) entre os frutos das três lavouras analisadas ($p>0,05$).

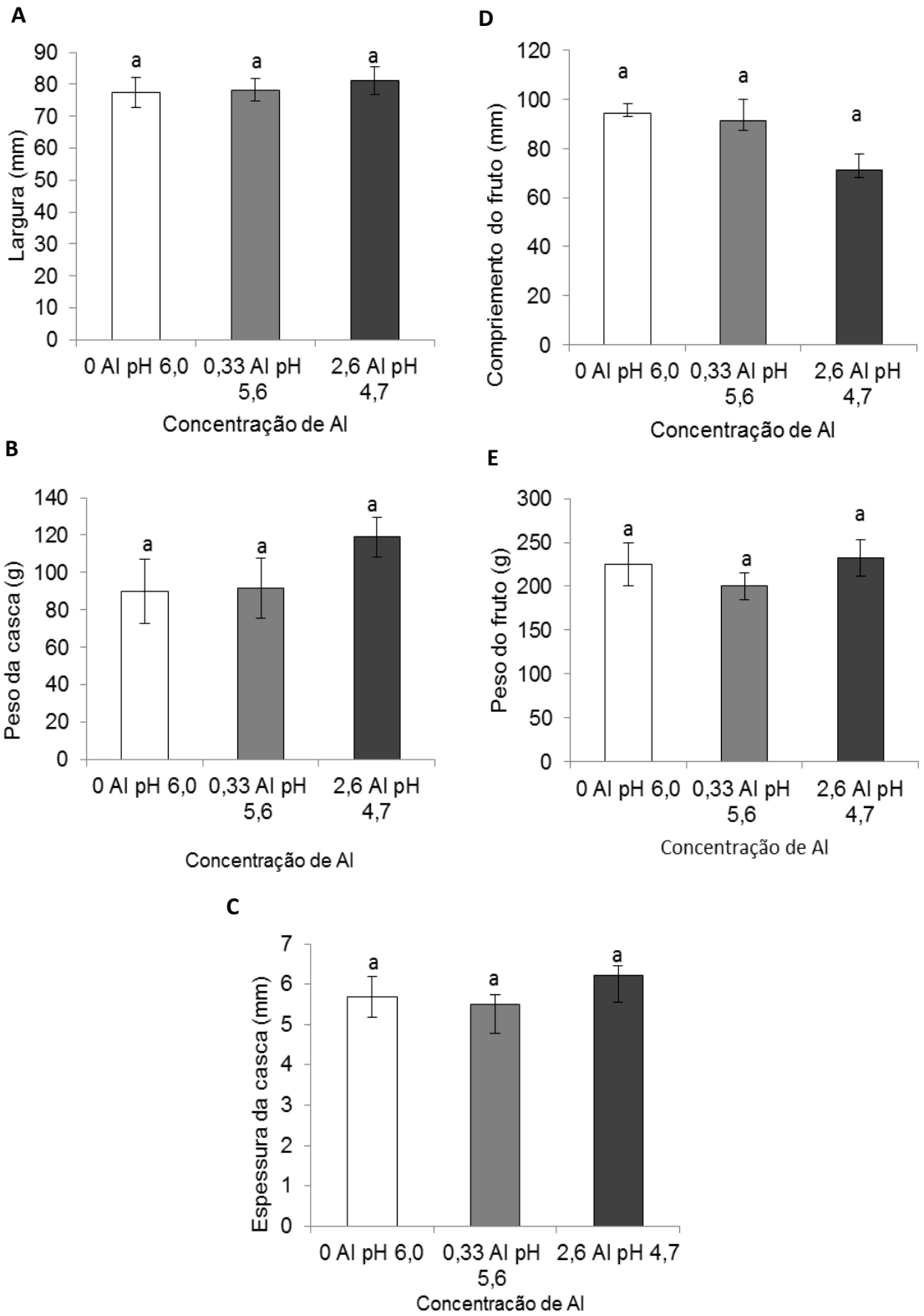

Figura 22: Características físicas dos frutos de maracujazeiro sob diferentes concentrações de Al no solo. Barras = desvio padrão da média. Letras iguais indicam similaridade estatística (Tuckey 5% de probabilidade)

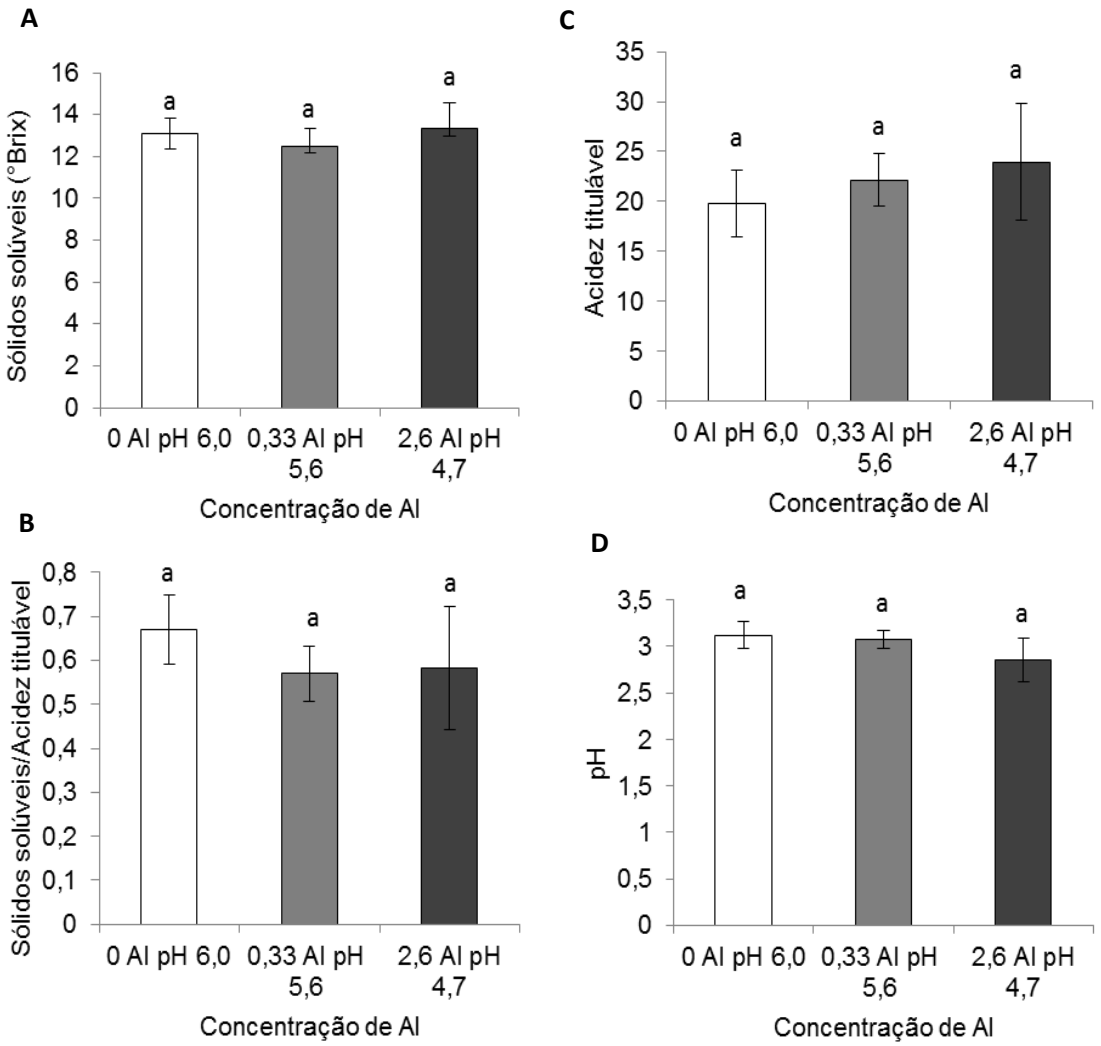

Figura 23: Características químicas dos frutos de maracujazeiro sob diferentes concentrações de Al no solo. Barras = desvio padrão da média. Letras iguais indicam similaridade estatística (Tuckey 5% de probabilidade)

5 DISCUSSÃO

A cultivar FB 200 do maracujazeiro demonstrou habilidade em lidar com diferentes concentrações de Al no solo, já que não foram observados prejuízos na assimilação líquida de CO_2, nem nas características físicas e químicas dos frutos. Contudo, foram observadas diferenças fisiológicas no aparato fotoquímico e antioxidante entre as lavouras analisadas, que podem ser um mecanismo de tolerância que o maracujazeiro utiliza a fim de evitar os efeitos tóxicos do Al.

As plantas submetidas a todas as concentrações de Al apresentaram um aumento polifásico característico, aumentando desde um nível O (F_0) até um nível máximo (F_M), com níveis intermediários J e I bem definidos, demonstrando que todas as amostras estavam fotossinteticamente ativas (STRASSER & STRASSER, 1995). Porém, a análise das curvas de cinética de fluorescência transiente permitiu a identificação do aparecimento da banda L positiva nas plantas expostas às duas doses de Al indicando que a presença do metal leva a prejuízos na conectividade do FSII, resultando em baixa eficiência na transferência de energia entre as unidades que compõe o FSII (STRASSER & STIBERT 2010). Contudo, as plantas expostas a menor concentração de Al parecem estar passando por um estresse maior, já que apresentam banda K positiva como reflexo de uma antena funcional maior e/ou uma inativação do CEO (YUSUF et al 2010). O aparecimento da banda K positiva tem sido relatado em plantas submetidos a diferentes estresses (BUSSOTTI et al 2011; REDILLAS et al 2011; SRIDASTAVA et al 2011) inclusive na presença de Al (JIANG et al 2008).

Provavelmente, a presença da banda K positiva nas plantas submetidas à menor concentração de Al tenha ocorrido como consequência de um aumento da antena funcional, aumentando, portanto, a velocidade de redução e oxidação da clorofila *a*, fazendo com que o CEO não conseguisse realizar a fotólise da água de forma rápida o suficiente para manter o fluxo de elétrons no PSII, levando a um desequilíbrio entre o lado doador (CEO) e o lado aceptor (clorofila P680) de elétrons (STRASSER, 1997). Isto pode ser corroborado pelos resultados do teste-JIP, que evidenciaram um maior fluxo de absorção de energia luminosa (ABS/RC) na presença de Al, principalmente quando as plantas estão expostas a menor concentração de Al (0,33 Al pH 5,6).

Além disso, as plantas expostas a menor concentração de Al apresentaram menores índices de desempenho parcial e total, comparadas às plantas expostas aos outros tratamentos. Contudo, a concentração alta de Al não afetou o PI total, pois, apesar de ter causado prejuízos à probabilidade de captura de energia por centro de reação ativo (TR_0/RC), levou a um aumento na probabilidade de transporte além da Q_A até o FSI (δRo/(1-δRo)). Isso

significa que, apesar da alta concentração de Al ter causado prejuízos no FSII, houve melhora nas reações de oxi-redução do FSI, compensando os danos causados no FSII. Em face destes resultados, pode-se supor que a melhor eficiência da fase fotoquímica das plantas expostas a maior dose de Al, pode ser consequência da maior produção de SOD e peroxidase do ascorbato, que atuam protegendo o fotossistema contra danos causado pelas EROs. Segundo Miller et al (2004), a cadeira de transporte de elétrons nos cloroplastos é uma grande fonte de espécies reativas de oxigênio. O aumento da atividade de enzimas antioxidantes também tem sido relacionado como sendo um mecanismo à tolerância ao Al em algumas variedades de milho, arroz e trigo (BOSCOLO et al. 2003, o DARK et al. 2003, MA et al. 2007).

As plantas da lavoura com maior concentração de Al mostraram o aparato fotoquímico mais eficiente do que as plantas tratadas com menor concentração de Al. Isto pode ter ocorrido devido ao tempo de exposição das plantas a este metal. A lavoura com menor concentração de Al, devido às características do solo, pode estar ainda iniciando o processo de perda do efeito da calagem, enquanto na lavoura com maior concentração de Al, a necessidade de nova correção já ocorre há mais tempo, justificando assim a maior quantidade de Al disponível. Desta forma, as plantas expostas à maior concentração de Al teriam seu aparato enzimático já aclimatado a esta condição. Além disso, ambas as concentrações de Al levaram a uma grande dissipação de energia, contudo, na maior concentração, não houve danos no desempenho fotoquímico (PI), o que pode ser indício de fotoproteção das plantas expostas a alta concentração de Al.

Quando analisamos a fluorescência das plantas adaptadas à luz, observamos que a eficiência quântica efetiva (F_V'/F_M') e a eficiência fotoquímica atual (φ_{PS}) das plantas expostas às duas concentrações de Al foram menores do que o controle e que principalmente o transporte de elétrons (ETR), além da Q_A, foi afetado por altas concentrações de Al. Porém, como não houve diminuição da fotossíntese líquida, sugere-se que nas plantas controle estaria ocorrendo maiores taxas de fotorrespiração e nas plantas com mais Al a dissipação (DI_0/RC) estaria protegendo o aparato fotoquímico. Diferente do que

foi constatado neste estudo, outros plantas sensíveis ao Al têm demonstrado redução nas taxas de assimilação líquida de CO_2 em resposta ao Al (CHEN et al 2005; PEIXOTO et al 2002), demonstrando que o maracujazeiro pode ser considerado tolerante a diferentes concentrações de Al no solo.

Segundo Stefanov & Terashima (2008), os prejuízos na fase fotoquímica observados nas plantas expostas ao Al podem ser relacionados ao aumento da perda de energia por processos não fotoquímicos, como pode ser evidenciado no presente estudo pelos maiores valores de DI_0/RC, apresentados pelas plantas expostas ao Al. Altos valores de DI_0/RC podem ser resultado de um mecanismo de fotoproteção que, ao manter o aceptor primário de elétrons do FSII (Q_A) em seu estado oxidado, diminui a possibilidade da ocorrência de fotodanos (SOUZA et al 2005). Os menores valores de F_V'/F_M' e φ_{PS} podem estar associados diretamente à diminuição do número de centros de reação inativos, já que isto leva a um acúmulo de Q_A reduzida.

6 CONCLUSÃO

A presença do Al no solo não foi capaz de prejudicar de maneira significativa a cultivar FB 200 de maracujazeiro. Contudo, a fim de suportar diferentes concentrações de Al no solo, as plantas parecem ajustar seu aparato fotoquímico e antioxidante de maneira a minimizar os prejuízos causados pela exposição ao Al no solo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em condições controladas, as cultivares FB 100 e FB 200 do maracujazeiro tenderam a apresentar prejuízos no aparato fotossintético ao longo do tempo de exposição, sugerindo que plantas jovens destas cultivares são sensíveis ao Al em solução nutritiva. Contudo, ao analisar o estresse do aparato fotossintético causado pelo Al em plantas adultas em campo, a cultivar

FB 200 se mostrou tolerante a diferentes concentrações de Al no solo. Levando-se em consideração que as plantas expostas em campo a menores concentrações de Al demonstraram maiores prejuízos no aparato fotoquímico, provavelmente devido ao pequeno tempo de exposição ao Al. Acredita-se que o Al seja capaz de causar prejuízos ao maracujazeiro apenas em tempos de exposição relativamente curtos, sendo, portanto, capaz de se aclimatar à presença de Al no solo Al, quando exposto por períodos prolongados. Além disso, a idade das plantas também pode justificar os resultados conflitantes obtidos nos dois experimentos, sugerindo que plantas jovens podem ser mais suscetíveis ao Al. Porém, é importante ressaltar que, em estudos em campo, há interferência de muitas variáveis, que podem mascarar o efeito do Al sobre as plantas. Desta forma, estudos mais longos são necessários, a fim de comprovar a tolerância do maracujazeiro ao Al no solo.

ANEXO I – ANÁLISE DE SOLO

Tabela 2: Resultado da análise de solo de lavouras de maracujazeiro FB 200.

	Valores de Referência	0 Al pH 6,0	0,33 Al pH 5,6	2,6 Al pH 4,7
Fósforo (mg dm^{-3})	10 - 20	11	35	10
Potássio (cmol)	60 - 150	30	68	37
Cálcio (cmol)	1,5 - 4,0	2,3	1,4	1
Magnésio (cmol)	0,6 - 1,0	0,5	0,3	0,2
Matéria Orgânica (dag $Kg-^{1}$)	1,6 - 3,0	1,6	1,5	2,1
Sódio mg dm^{-3}	40 - 80	15	29	17
Relação Ca/Mg	-	4,6	4,7	5
Relação Ca/K	-	29,9	8	10,5
Relação Mg/K	-	6,5	1,7	2,1
Sat. Ca na CTC (%)	25	56,4	36,1	18,9
Sat. Mg na CTC (%)	6	12,3	7,7	3,8
Sat. K na CTC (%)	20	1,9	4,5	1,8
Índice saturação Na (%)	>20	1,6	3,2	1,2
Soma de Bases (cmol)	2,1 - 5,0	2,9	1,9	1,3
CTC efetiva (cmol)	2,6- 6,0	2,9	2	2,1
CTC a pH 7,0 (cmol)	4,6 - 10	4,1	3,9	5,3
Sat. Alumínio (%)	21-40	0	5	38
Saturação de bases (%)	51-70	70,6	48,4	24,5

ANEXO II – ANÁLISE DE NUTRIENTES FOLIAR

Tabela 3: Resultados da análise de nutrição mineral de folhas de maracujazeiro FB 200 cultivadas em lavouras com diferentes concentrações de Al no solo.

	Valor de referência	Controle	0,33 Al pH 5,6	2,6 Al pH 4,7
Nitrogênio	43 - 55	62,3	61,67	54,81
Fósforo	2,3 - 2,7	4,11	6,26	2,49
Potássio	20 - 30	16,88	25,00	20,63
Cálcio	19 - 25	22,63	22,00	27,23
Magnésio	1,9 - 2,4	3,62	3,56	4,50
Enxofre	3,2 - 4,0	6,24	4,96	5,11
Ferro	120 - 200	172	150	150
Zinco	25 - 60	44	52	38
Cobre	20 - 35	14	48	30
Manganês	40 - 250	223	326	94
Boro	40 - 100	36	31	45
Relação N/P	18,5 - 20,5	15,2	9,9	22,0
Relação N/K	1,8 - 2,1	3,7	2,5	2,7
Relação N/S	13,4 - 13,8	10,0	12,4	10,7
Relação N/Mg	22,5 - 23	17,3	17,1	12,2
Relação N/Cu	1,8 - 2,8	4,6	1,3	1,8
Relação N/B	0,55 - 1,10	1,7	2,0	1,2
Relação P/Mg	1,1 - 1,2	1,1	1,7	0,6
Relação P/Zn	0,05 - 0,10	0,09	0,12	0,07
Relação P/Cu	0,07 - 0,10	0,30	0,13	0,08
Relação K/Ca	1,0 1,2	0,7	1,1	0,8
Relação K/Mg	10,5 - 12,5	4,7	6,9	4,6
Relação K/Mn	0,2 - 0,5	0,08	0,08	0,22
Relação Ca/Mg	10 - 10,5	6,3	6,1	6,0
Relação Ca/Mn	0,1 - 0,5	0,10	0,07	0,29
Relação Fe/Mn	1,0 - 3,0	0,77	0,46	1,59

REFERÊNCIAS

ABREU, S.P.M. **Desempenho agronômico, características físico-químicas e reação a doenças em genótipos de maracujazeiro-azedo cultivadas no Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária/UNB, 2006. 144p. Dissertação de Mestrado.

AFBAT, T.; KHAN, M.A.; IDREES, M. NAEEM,. **Effects of aluminium exposures on growth, photosynthetic efficiency, lipid peroxidation, antioxidant enzymes and artemisinin content of** *Artemisia annua* **L.** Journal of Phytology 2(8): 23–37. 2010.

AKAYA, M.; TAKENAKA, C. **Effects of aluminum stress on photosynthesis of** *Quercus glauca* **Thrumb.** Plant and Soil, London, v.237, p.137-146, 2001.
ALI, S; ZENG, F.; QIU, L; ZHANG, G. **The effect of chromium and aluminum on growth, root morphology, photosynthetic parameters and transpiration of the two barley cultivars.** Biologia Plantarum 55 (2): 291-296, 2011.

ANUARIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2011 – Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 128p. 2011.

AOAC - Association Of Oficial Analytical Chemistral. **Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry.** 11. ed. Washington: AOAC,. 1115 p. 1992.

ARAÚJO, E.C.; SILVA, R.F.; VIANA, A.P.; SILVA; M.V. **Estádio de maturação e qualidade de sementes após repouso de frutos de maracujá amarelo.** Revista Brasileira de Sementes, v.29, n.3, p.67-76, 2007.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. **Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance**. Environmental and Experimental Botany, v.59, p.206-216, 2007. 101

BEAUCHAMP C., FRIDOVICH I. **Superoxide dismutase im proved as says and as say ap pli ca ble to acrylamide gels**. Anal. Biochemistry. v. 44, p. 276-287, 1971.

BORKERT, C.M.; COX, F.R. **Effects of acidity at high soil zinc, copper and manganese on peanut, rice and soybean**. Communications in Soil Science and Plant Analysis, v.30, p.1371-1384, 1999.

BOSCOLO, P.R.S., MENOSSI, M., JORGE, A.R., **Aluminium-induced oxidative stress in maize.** Photochemistry., v.62, p.181-189. 2003.

BRACCINI, M.C.L., MARTINEZ, H.E.P., PEREIRA, P.R.G. SAMPAIO, N.F. e SILVA, E.A.M. **Tolerância de genótipos de cafeeiro ao Al em solução nutritiva. I. Crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular.** Revista Brasileira de Ciências do Solo, Campinas, v.22, p.435-442, 1998.

CALBO, A.G.; CAMBRAIA, J. **Efeito do alumínio sobre a composição mineral de dois cultivares de sorgo** (*Sorghum bicolor* L. Moench). Revista Ceres, 27:369-378. 1980.

CAMBRI, M.A.; ALLEONI, L.R.F. **Complexação do aluminio pela matéria orgânica em solos sob sistema de plantio direto**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., Ribeirão Preto, 2003. Solo: Alicerce dos sistemas de produção. Ribeirão Preto: UNESP, 2003.

CASCIO,C., SCHAUB, M., NOVAK, K., DESOTGIU, R., BUSSOTTI, F., STRASSER, R. J. **Foliar responses to ozone of fagus sylvatica L. seedlings grown in shaded and full sunlight conditions**. Environmental and Experimental Botany v.68 p. 88–197. 2010.

CASSOL, D., SILVA F.S.P., FALQUETO, A.R., BACARIN, M.A. **An evaluation of non-destructive methods to estimate total chlorophyll content.** Photosynthetica , v.46, n.4, p.634-636, 2008. 102.

CAVICHIOLI, J. C.; RUGGIERO, C.; VOLPE, C. A. **Caracterização físico-química de frutos de maracujazeiro-amarelo submetidos à iluminação artificial, irrigação e sombreamento.** Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal, v. 30, n. 3, set. 2008.

Chen, H.X., Li ,W.J., Gao S.-Z.. **Characterization of PSII photochemistry and thermostability in salt-treated Rumex leaves**. Journal of Plant Physiology. v. 161 p. 257–264. 2004.

CHEN, L.S., QI ,Y.P., LIU, X.H. a. **Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves**. Ann. Bot. 96:35–41. 2005.

CHEN, L.-S., QI ,Y.P., SMITH, LIU, X.H, B.R. b. **Aluminum-induced decrease in CO_2 assimilation in citrus seedlings is unaccom panied by decreased activities of key enzymes involved in CO_2 assimilation**. Tree Physiol. v. 25. p.317–324. 2005.

COSTA, A. F. S. da; COSTA, A. N.. **Tecnologias para produção de maracujá.** Vitória-ES: INCAPER, 2005. p.179-196.

CRISTANCHO R. J. A., HANAFI M. M., SYED OMAR S. R. RAFI. **Variations in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) progeny response to high aluminium concentrations in solution culture.** Plant Biology v. 13, p. 333–342. 2011.

CURI, N., FERREIRA, M.M.; FERNANDES, B., **Influência da mineralogia da fração argila nas propriedades físicas de latossolos da região sudeste do Brasil.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 23, p. 515-524, 1999.

DARKÓ E, AMBRUS H, STEFANOVITS-BÁNYAI E, FODOR J, BAKOS F, BARNABÁS B. **Aluminum toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant line developed by in vitro microspore selection.** Plant Science 166: 583–591. 2003.

CAVICHIOLI, J. C.; RUGGIERO, C.; VOLPE, C. A. **Caracterização físico-química de frutos de maracujazeiro-amarelo submetidos à iluminação artificial, irrigação e sombreamento.** Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal, v. 30, n. 3, set. 2008.

CHEN, H.X., Li ,W.J., GAO S.-Z.. **Characterization of PSII photochemistry and thermostability in salt-treated Rumex leaves**. Journal of Plant Physiology. v. 161 p. 257–264. 2004.

CHEN, L.S., QI ,Y.P., LIU, X.H. a. **Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves**. Ann. Bot. 96:35–41. 2005.

CHEN, L.-S., QI ,Y.P., SMITH, LIU, X.H, B.R. b. **Aluminum-induced decrease in CO_2 assimilation in citrus seedlings is unaccom panied by decreased activities of key enzymes involved in CO_2 assimilation**. Tree Physiol. v. 25. p.317–324. 2005.

COSTA, A. F. S. da; COSTA, A. N.. **Tecnologias para produção de maracujá.** Vitória-ES: INCAPER, 2005. p.179-196.

CRISTANCHO R. J. A., HANAFI M. M., SYED OMAR S. R. RAFI. **Variations in oil palm (***Elaeis guineensis* **Jacq.) progeny response to high aluminium concentrations in solution culture.** Plant Biology v. 13, p. 333–342. 2011.

CURI, N., FERREIRA, M.M.; FERNANDES, B., **Influência da mineralogia da fração argila nas propriedades físicas de latossolos da região sudeste do Brasil.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 23, p. 515-524, 1999.

DARKÓ E, AMBRUS H, STEFANOVITS-BÁNYAI E, FODOR J, BAKOS F, BARNABÁS B. **Aluminum toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant line developed by in vitro microspore selection.** Plant Science 166: 583–591. 2003.

DEL RIO, LA; PASTORI, GM; PALMA, JM; SANDALIO, LM; SEVILLA, F; CORPAS, FJ; JIMÉNEZ, A; LÓPEZ-HUERTAS, E; HERNÁNDEZ, JA. **The activated oxygen role of peroxisomes in senescence.** Plant Physiol. v.116, p.1195-1200, 1998.

DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, C. D.; BENNET R. J.; JAGADISH, V.C.; RANDALL, P.J. **Aluminium tolerance in wheat (Triticum aestivum) I. Uptake and distribution of aluminum in root apices**. Plant Physiology, 103:685-693. 1993.

DEMMIG-ADAMS, B. AND W.W. ADAMS.. **Photoprotection and other responses of plants to high light stress**. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 43:599–626. 1992

DHIR, B.; SHARMILA, P.; SARADHI P. P.; SHARMA, S.; KUMAR, R. MEHTA, D. **Heavy metal induced physiological alterations in** *Salvinia natans*. Ecotoxicology and Environmental Safety v. 74. p. 1678–1684. 2011.

EMBRAPA. Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil 2000/01 / Embrapa Soja. - Londrina: Embrapa Soja/Fundação
FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C.; WRIGHT, R.J. **The effects on growth and uptake of Al and P by rice.** Pesquisa Agropecuária Brasielira. v.24 p.677-682. 1999.

FOY, C.D., CHANEY, R.L., WHITE, M.C., **The physiology of metal toxicity in plants**. Annual Review of Plant Physiology, v. 29. p. 511-56. 1978
FURLANI ,P. R. & HANNA, L. G. **Avaliação da tolerância de plantas de arroz e milho ao alumínio em solução nutritiva**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 8, p. 205-208, 1984.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M; MYLONA, P.; PAPADAKIS, I.; YUPSANIS, T. **Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and al accumulation.** Jornal of Plant Physiology, v.165, n.4, p.385-396, 2008.

GIANNOPOLITIS, C.N.; REIS, S.K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 59, p.309-314, 1977

GOLDING, A.J..; FINAZZI, G.; JOHNSON, G.N. **Reduction of the thylakoid electron transport chain by stromal reductants - evidence for activation of cyclic electron transport upon dark adaptation or under drought**. Planta v.220, p. 356–363. 2004.

GOMES, GTM. **Respostas ecofisiológicas e bioquímicas do maracujazeiro (***Passiflora edulis* **SIMS) ao déficit hídrico**. Programa de Pós-graduação em Biologia VEGETAL –UFES. Dissertação de Mestrado.

GONZALEZ-SANTANA, I.H.; MARQUEZ-GUZMAN, j. ORTEGA, S.C.R.C. *Conostegia xalapensis* **(Melastomataceae): an aluminum accumulator plant.** Physiologia Plantarum V.144, p. 134–145. 2012

GUO, T.R., ZHANG, G.P., ZHOU, M. X., WU, F.B., CHEN, J.X**. Influence of aluminum and cadmium stresses on mineral nutrition and root exedates in two barley cultvars.** Pedosphere, v.17, n.4, p.505-512, 2007.

HAVIR, E.; MCHALE, N. A. A **Regulation of Catalase Activity in Leaves of Nicotiana sylvestris by High CO_2.** Plant Physiology, v.89, n.3, p.952-957, 1989.

HE, G.; ZHANG, J.; HU, X. WU, J. **Effect of aluminum toxicity and phosphorus deficiency on the growth and photosynthesis of oil tea (**Camellia oleifera **Abel.) seedlings in acidic red soils.** Acta Physiology Plant v. 33, p.1285–1292. 2011.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. **The water cu lture method for growing plants without soil.** California Agricultural Experimental Station (Circular 347), 32p. 1950.

JIANG, H.; CHEN, L.; ZHENG, J.; HAN, S.; TANG, N. SMITH, B. **Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in Citrus leaves assessed**

by the chlorophyll a fluorescence transient. Tree Physiology v.28. p. 1863–187. 2008.

KOCHIAN, L.V. **Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistence in plant.** Plant Physiology Plant Molecular Biology, v. 46, p. 237-260, 1995.;

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M.A. **How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency.** Annual Review of Plant Biology, v.55, p.459-493, 2004.

KONRAD, M.L.; SILVA. J.A.B.;FURLANI, P.R; MACHADO, E.C. **Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio.** Bragantia, 64:339-347, 2005.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. **Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics**. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v.42, p.313-349, 1991.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. Editora RiMa, São Carlos. 2006.

LAWLOR, D.W. **Photosynthetic, productivity and enviromental.** 1995. Journal of Experimental Botany, 46: 1449-1461.

LI, C.; XU, H.; XU, J.; CHUN, X. NI, D. **Effects of aluminium on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of tea plant**. Acta Physiology Plant v.33, p.973–978. 2011.

LICHTENTHALER, H.K.; WENZEL, O.; BUSCHMANN, C.; GITELSON, A. **Plant stress detection by reflectance and fluorescence**, p. 271-285. In: Annals New York Academy of Science. 1998.

LINDON, F.C.; BARREIRO, M.G.; RAMALHO, J.C.; **Manganese accumulation for photosynthetic functioning. Journal of plant physiology**. v.161, p 1235-1244.

LINDON, F.C.; RAMALHO, J.C.; BARREIRO, M.G.; LAURIANO, J.A. **Modulation of photosystem 2 reactions mediated by aluminium toxicity in Zea mays.** Photosynthetica, Prague, v.34, p.151-156, 1999.

LITLLE, R. **Plant soil interactions at the low pH problem solving – the genetic approach.** Communications in Soil Science and Plant Analysis, v. 19, n. 7/12, p. 1239-1257, 1988.

LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. **Monitoring of aluminium-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance of aluminum and proton toxicity.** Physiologia Plantarum. v.93, p 268-271. 1995.

LUCAS, R. E.; DAVIS, J. F.; **Relationships Between Ph Values of Organic Soils and Availabilities of 12 Plant Nutrients Soil Science**: v. 92 - Issue 3 – p. 177-182. 1961.

MA, J. F.; SHEN, R.; ZHAO, Z.; WISSUWA, M.; TAKEUCHI, Y. **Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance**. Plant Cell Physiology, v.43, p. 652-659, 2002.

MA B, WAN J, SHEN Z. **H_2O_2 production and antioxidant responses in seeds and early seedlings of two different rice varieties exposed to aluminum**. Plant Growth Regulation 52: 91–100. 2007

MACHADO, E.C.; PEREIRA, A.R. **Eficiência de conversão e coeficiente de manutenção da planta inteira, das raízes e da parte aérea em milho e arroz submetidos ao estresse de Al.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.25, p.845-855, 1990.

MAGNAGO, L.F.S.; MARTINS, S.V.; SHEFLER, C.E.G.R.; NERI, A.V. **Gradiente fitofisionômico-edáfico em formações florestais de Restinga no Sudeste do Brasil**. Acta botanica brasilica 24(3): 734-746. 2010

MARIN, A.; SANTOS, D.M.M. dos. **Interação da deficiência hídrica e da toxicidade do alumínio em guandu cultivado em hidroponia**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.43, p.1267-1275, 2008.

MELETTI, L.M.M. **Tendências e pespectivas da pesquisa em melhoramento genético do maracujazeiro**. In REUNIÃO TÉCNICA DO MARACUJAZEIRO (Anais), Viçosa, p.81-87. 2002.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. VOGEL: **Análise química quantitativa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., p.212, 2002.

MENDONÇA, R.M.N.; COELHO, A.F.S; MARTINEZ, H.E.P., FONTER, P.C.R.; PEREIRA, PP.R.G., **Resposta de mudas de maracujá amarelo (Passiflora edulis Sims f. Flavicarpa DEG.) cultivadas em solução nutritiva , a diferentes níveis de alumínio.** Revista Ceres, 46 (266), p 357-370, 1999.

MENDONÇA, R.J.; CAMBRAIA, J.; OLIVEIRA, J.A.; OLIVA, M.A. **Efeito do Aluminio na absorção e na utilização de macronutrientes em duas cultivares de arroz.** Pesquisa agropecuária Brasileira. v.38, p. 843-848, 2003.

MERIGA, B.; REDDY, K.; REDDY, L.A.; KISHOR, P.B.K. **Aluminum-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (***Oeyza sativa***).** Journal of Plant Physiology, v.161, p.63-68, 2004.

MITLER, R. **Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance**. Trends in Plant Science, v.7, p. 405-410. 2004.

MITTOVA, V.; THEODOULOU, F.L.; KIDDLE, G.; VOLOKITA, M.; TAL, M.; FOYER, C.H.; GUY, M. **Comparision of mitochondrial ascorbato peroxidase in the cultivated tomate,** *Lycopersicon esculentun***, and its wild, salt-tolerant relative,** *L. penelli* **– a tole for matrix isoforms in protection against oxidative damage.** Plant Cell and Environment, v.27, p 237-250, 2004.

MOHAMMADIRAD, A.; ABDOLLAHI, M. **A systematic review on oxidant/antioxidant imbalance in aluminium toxicity**. Internavional Journal of Pharmacology. 7(1) p 12-21, 2011.

MORAES, M.F.; NUTTI, M.R.; WATABABE, W.; CARVALHO, J.L.V. **Práticas agronômicas par aumentar o fornecimento de nutrientes e vitaminas nos produtos agrícolas alimentares.** I Simpósio Brasileiro de Agropecuária Sustentável. Viçosa, p. 299-312. 2009.

MOUSTAKA, M; OUZOUNIDOU, G.; LANNOYER, R. **Aluminum effects on photosynthesis and elemental uptake in an aluminum-tolerant and non-tolerant wheat cultivar.** Journal of Plant Nutrition, New York, v.18, p.669-683, 1995.

MOUSTAKAS, M.; ELEFTHERIOU, E.P.; OUZOUNIDOU, G. **Short-term effects of aluminum at alkaline pH on the structure and function of the photosynthetic apparatus.** Photosynthetica, Prague, v.34, p.169-177, 1997.
MT, 245p. 2000. Disponível em:
http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/449645/1/doc146.pdf. Acesso em 03 Jan. 2012.

OHKI, K. **Photosynthesis, chlorophyll, and transpiration responses in aluminum stressed wheat and sorghum**. Crop Science, v.26, p.572-575. 1986.
OTEIZA, P.L**. A mechanism for the stimulatory effect of aluminium on iron-induced lipid peroxidation**. Archives Biochemistry and Biophysics, v.308, p.374-379, 1994.

OUKARROUM, A.; SCHANSKER, G.; STRASSER R.J. **Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance.** Physiologia Plantarum v.137, p.188–199, 2009.

PANDA, S.K.; MATSUMOTO, H. **Changes in antioxidant gene expression and induction of oxidative stress in pea (***Pisum sativumL***.) under Al stress**. Biometals, v. 23, p.753–762. 2010.

PEIXOTO, P.H., DA MATTA ,F.M.; CAMBRAIA, J. **Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars**. Journal of Plant Nutrition, v. 25 p.821–832. 2002.

PELL, E.J.; ECKART, N.; GLICK, R. E. **Biochemical and molecular basis for impairment of photosyn thesis potentia**l. Photosynthesis Research, v.39, p.453-462, 1994.

PEREIRA, W.E.; SIQUEIRA, D.L.; MARTINEZ, C.A.; PUIATTI, M. **Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus rootstocks under aluminium stress.** Journal of Plant Physiology, v.157, p.513-520, 2000.

PIZA Jr, C.T.A., **A cultura do Maracujá.** Campinas, SAA/CATI, 71p. 1991.
REDILLAS, M.C.F.R.; JEONG, J.S.; STRASSER, R.J.; KIM, Y.S.; KIM, J. **JIP Analysis on Rice (Oryza sativa cv Nipponbare) Grown under Limited Nitrogen**

Conditions. Journal of Korean Society Appl. Biol. Chemistry. 54 (5), 827-832, 2011.

Revista esta Terra. **Federação de Agricultura e Pecuária do Estado do Espírito Santo (FAES) e do Serviço Nacional de Aprendizagem Rural** – Administração Regional do Estado do Espírito Santo (SENAR-AR/ES). ano XIV - nº 232 - julho/2011. Disponível em: http://www.faes.org.br/doc/jornal/1312575272_Jornal_%20Senar_Julho%202011_site.pdf. Acesso 4 Jan 2012.

RIZZI, L.C.; RABELLO, L.R.; MOROZINI FILHO, W. et al. **Cultura do maracujá-azedo.** Campinas: CATI, 54p (Boletim técnico, 235). 1998.
ROHÁCEK, K. **Chlorophyll fluorescence param eters: the definitio ns, photosynthetic meaning, and mutual relationships**. Photosynthetica , v.40, p.13-29. 2002.

ROSSIELLO, R.O.P.; JACOB NETO, J. **Toxidez de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema.** In: FERNANDES, M.S. (Ed.) **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. P. 375-418. 2006.

SALVADOR, J. O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA E.; CABRAL, C. P. **Influência do alumínio no crescimento e na acumulação de nutrientes em mudas de goiabeira.** Revista Brasileira de Ciências do Solo, v. 24, p. 787-796, 2000.

SCHEIBE, R.; BACKHAUSEN, J.E.; EMMERLICH, V.; HOLTGREFE, S. **Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions**. Journal of Experimental Botany, v. 56, n. 416, p. 1481–1489, 2005.

SCHOLANDER, P.F.; HAMMEL, H.T.; BRADSTREET, E.D.; HEMMINGSEN, E.A. **Sap pressure on vacuolar plants**. Science 148, 339–346, 1965.

SCHUCH, M.W.; CELLINI, A.; MASIA, A.; MARINO, GRAZIA. **Aluminium-induced effects on growth, morphogenesis and oxidative stress reactions in in vitro cultures of quince.** Scientia Horticulturae 125 (2010) 151–158.

SEMIR, J.; BROWN JR.; K. S. Maracujá: a flor da paixão. **Revista Geográfica Universal**, Rio de Janeiro, v.2, n.5, p.40-47, 1975.

SHARMA, P.; DUBEY, R.S. **Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidante enzymes in growing rice seedlings.** Plant Growth Regulation, v.46, p.209-221, 2005.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. **Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes**. Journal of Experimental Botany, v.53, p.1305-19, 2002.

Silva D. M & Sodek, L. **Effect of aluminum on soybean nodulation and nodule activity in a vertical split-root system**. Jounal of Plant Nutrition, v. 20, p. 963-974. 1997.

SILVA, A.D., **Avaliação da tolerância ao Aluminio em plântulas de maracujazeiro e mamoeiro. Curso de pós-graduação em agronomia**. Universidade federal Rural do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. 2009.

SILVA, J.R. da; OLIVEIRA, H.J. de. **Nutrição e adubação do maracujazeiro.** Informe Agropecuário. Belo Horizonte,v.21,n.256,p.52-58,2000.

SIQUEIRA, Kátia Maria Medeiros de et al **. Ecologia da polinização do maracujá-amarelo, na região do vale do submédio São Francisco**. Rev. Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 31, n. 1, 2009.

SOUZA, D.M.G. DE, LOBATO, E. **Correção da acidez do solo**. In SOUZA, D.M.G. DE LOBATO. (Ed.) **Cerrado: correção do solo e adubação**. Brasilia, DF: Embrapa Informação Tecnológica. p.81-96, 2004.

SOUZA, R.T.; RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F.; SILVEIRA, J.A.G. **Photosynthetic responses of young cashew plants to varying environmental conditions**. Pesquisa. Agropecuária Brasileira, v.40, p.735 – 744. 2005.

SRIVASTAVA, A.; GUISSÉ, B.; GREPPIN, H.; STRASSER, R.J. **Regulation of antenna structure and electron transport in photosystem II of Pisum sativum under elevated temperature probe by fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP**. Biochimica et Biophysica Acta, v.1320, p.95-106, 1997.

SRIVASTAVA, A.; STRASSER, R.J.; GOVINDJEE. **Greening of peas: parallel measurements of 77 K emission spectra, OJIP chlorophyll a fluorescence transient, period four oscillation of the initial fluorescence level, delayed light emission, and P700.** Photosynthetica, v.37, p.365-392, 1999.

STEFANOV, D.; TERASHIMA, I. **Non-photochemical loss in PSII in high-and low-light-grown leaves of Vicia faba quantified by several fluorescence parameters including LNP, F0/Fm, a novel parameter**. Physiology Plantarum. v. 133, p. 327 – 338. 2008.

STRASSER, B. J.; STRASSER , R. J. **Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. In: Mathis P (ed) Photosynthesis: From Light to Biosphere**, Vol V, pKluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 977–980, 1995.

STRASSER, B.J. **Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients**. Photosynth. Res., v.52, p.147-155, 1997.

STRASSER, R.J; STIRBET, A.D., **Heterogeneity of Photosystem II probed by the numerically simulated chlorophyll a fluorescence rise (O-J-I-P).** Mathematics and Computers in Simulation, v.48, p.3-9; 1998

TEDESCO, M.J.; BISSANI, C.A. **Acidez dos solos e seus efeitos nas plantas.** In: BISSANI, C.A. et al. **Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas.** Porto Alegre: Gênesis, p.75-92, 2004.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. **In vivo assessment of stress impact on plants' vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of Mycorrhization on host plants.** In: VARMA, A (Ed). **Mycorrhiza: State of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics**. 3. ed., p. 679–703, 2008.

VALE, F.R.do; GUILHERME, L.R.; GUEDES, G.A.; FURTINI NETO, A.E. **Fertilidade do solo: dinâmica e disponibilidade dos nutrientes de plantas.** Lavras: UFLA/FAEPE,171p. 1997.

VELOSO, C.A.C. MURAOKA, T.; MALAVOLTA, E. **Sintomas de deficiência de micronutrientes em plantas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*).** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25., 1995. Viçosa. Resumos Expandidos... v. 2, p. 581-583, 1995

VITORELLO, VA.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. **Recent advances in aluminum toxicity and resistence in higher plants**. Brazilias Journal of Plant Physiology., v. 17, p.129-143, 2005.

WAGATSUMA, T.; JUJU, K.; ISHIKAWA, S.; NAKASHIMA, T. **Aluminum-tolerant protoplasts from roots can be collected with positively charged silica microbeads.** A method based on differences in surface negativity. Plant Cell Physiology, v.36, p.1493-1502, 1995.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. **Lipid peroxidation is na early symptom trggered by aluminium, but not the cause of elongation inhibition in pea roots**. Plant Physiology, v.125, p.199-208, 2001.

YOSHIMURA, K; YABUTA, Y; ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. **Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses**. Plant Physiology, v.123, p. 223-233, 2000.

YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N. B**. Overexpression of y-**114 **tocopherol methyl transferase gene in** *Brassica juncea* **plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1797, (8), p. 1428–143. 2010.