

POTENCIAL PARA “SCREENING” DE DOENÇAS FOLIARES EM MILHO ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA

Frederico Ozanan Machado Durães¹, Carlos Roberto Casela²
Antônio Carlos de Oliveira¹

INTRODUÇÃO

A fluorescência da clorofila (FC) *in vivo* é um método potente, não-destrutivo e rápido para detectar mudanças na atividade fotossintética de folhas devido a variação ambiental e a fatores de estresse natural e antropogênico. Usando a técnica de FC é possível estimar os parâmetros de eficiência fotossintética atual da folha, sob alguma condição em algum tempo (Φ PSII) e também o potencial máximo da eficiência quântica (F_v/F_m). O Φ PSII indica a efetividade da utilização da luz pela folha e revela a extensão de outras limitações para fotossíntese e a presença da adaptação ou aclimatação. A razão F_v/F_m tem mostrado ser um indicador confiável de estresse.

A ferrugem polissora, causada pelo patógeno *Puccinia polysora* Underw., é uma das mais importantes doenças na cultura do milho no Brasil, e é favorecida pela ocorrência de temperaturas entre 23 e 28°C e alta umidade relativa (Melching, 1975). Os danos causados pela doença incluem a redução no vigor da planta suscetível, seca e morte prematura das folhas, redução no peso dos grãos e acamamento (Albuquerque, 1971; Leonard, 1974). Perdas na produção foram relatadas no Brasil por Von Pinho et al. (1998), variando de 18 a 56% em experimentos de campo.

O objetivo desse trabalho foi demonstrar que medidas de fluorescência de clorofila *in vivo* podem ser úteis para *screening* de milho visando tolerância a estresses ambientais (com ênfase em doenças foliares).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal e Tratamentos: 04 linhagens endogâmicas de milho (L₁-1199, L₂-527, L₃-5128412891, L₄-420) foram cultivadas em casa de vegetação, com 3 plantas por vaso de 5,0 kg de um LEm, fase “cerrado”, em 03 repetições, até os 35 dias após a semeadura. Aos 20 dias após a semeadura as plântulas foram inoculadas com 02 isolados (I₁-08.99, de Goiânia-GO e I₂-05.99, de Jardinópolis, SP) de *Puccinia polysora*, para avaliação de patogenicidade (metodologia descrita por Robert, 1962), e a técnica de fluorescência da clorofila (FC), segundo Durães et al. (2000). A avaliação foi realizada aos 15 dias após a inoculação, sendo consideradas duas classes de reações, conforme Robert (1962), modificado: resistente (R) – pontuações cloróticas ou necróticas, sem a formação de pústulas ou formação de pequenas pústulas com pouca esporulação e suscetível (S) – pústulas abertas com ou sem a formação de clorose, com moderada a abundante esporulação. Buscou-se definir parâmetros de FC e sua associação com o parâmetro fenotípico de classificação convencional da reação de patogenicidade da doença “*per se*”.

¹ Pesquisador (e-mail: fduraes@cnpms.embrapa.br), Embrapa Milho e Sorgo/NEA-Núcleo de Estresses Abióticos e Relação Solo-Água-Planta; ² (e-mail: casela@cnpms.embrapa.br), NBIO-Núcleo de Estresses

Bióticos e Sustentabilidade Agrícola, Embrapa Milho e Sorgo (<http://www.cnpms.embrapa.br/nucleos>).
Caixa Postal 151, CEP 35701-970 – Sete Lagoas – MG - Brasil

Medidas de fluorescência da clorofila: A fluorescência da clorofila *in vivo* foi medida, em cada experimento, após a imposição do tratamento específico, na superfície superior da última folha com lígula visível, usando um PEA II (Hansatech Instruments Co., UK). A *priori* de medidas dos parâmetros de fluorescência (Fo, inicial; Fm, máxima; Fv, variável; tm e relações), porção das folhas escolhidas para avaliação foram adaptadas no escuro (com *leafclip*) por um mínimo de 30 minutos em temperatura ambiente, em 03 plantas intactas de para cada uma das 03 repetições. A folha intacta foi então acoplada, no escuro, na sonda do fluorímetro. Para o cálculo e definição de parâmetros da fluorescência da clorofila (procedimento experimental e importância de parâmetros em análise de *quenching* da fluorescência da clorofila, vide Scholes & Horton, 1993 e Durães et al. 2000):

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos parâmetros de fluorescência da clorofila e patogenicidade por *Puccinia polysora* são apresentados nas **Tabelas 1, 2 e 3**.

Em condições fisiológicas normais, Fo é constante e não responsivo para mudanças no metabolismo fotossintético (Goedheer, 1972). Entretanto, em condições de pressão de inóculo de *P. polysora*, o Fo foi aumentado em apenas 3/8 dos (genótipos \times inóculo), indicando nestes danos na funcionalidade do aparato fotossintético (**Tabela 1**). Esse fenômeno deve ocorrer se os centros de reação PSII são danificados, ou se a transferência de energia de excitação da antena para os centros de reação é impedida, conforme relatado por Bolhar-Nordenkampf et al. 1989. Isto sugere que Fo não se apresentou como um bom parâmetro para avaliar os genótipos submetidos aos isolados de *P. polysora*.

No genótipo sensível à *P. polysora*, a fluorescência variável (Fv) decresceu cerca de 5 e 9 vezes para o genótipo L₃-5128412891 \times Isolado I₁.08.99 e Isolado I₂.05.99, respectivamente (**Tabela 1**), indicando um site inibitório no lado foto-oxidante do PS II, de acordo com Govindjee et al. (1981) e Havaux and Lannoye (1983).

O decréscimo nas razões Fv/Fo e Fv/Fm sugerem que a exposição da linhagens L₃-5128412891, principalmente (**Tabela 1**), para os dois isolados de *P. polysora* causou injúria na estrutura do tilacóide e afetou o transporte eletrônico fotossintético, como tem também sido sugerido por Havaux and Lannoye (1983) e Durães et al. (2000) para tolerância à seca em milho.

Os quatro genótipos utilizados no teste de *screening* diferiram em tolerância para resistência à *Puccinia polysora*, baseando-se nos parâmetros fenotípicos (escala visual) e através da fluorescência da clorofila. A **Tabela 2** mostra o ranking para resistência a *P. polysora* entre os tratamentos (linhagens \times isolados), usando algum dos parâmetros do método de *screening* de fluorescência da clorofila.

É de interesse que todas as taxas de fluorescência da clorofila estejam no mesmo *ranking* como nas técnicas convencionais de *screening*. Com base nos dois isolados e quatro genótipos testados, a L₄-420 foi a mais resistente e a L₃-5128412891 a mais susceptível à *Puccinia polysora*. Os demais tratamentos (genótipos \times isolados), ou seja, L₁-1199 Isolado I₂-05.99 e L₂-527 Isolado I₁.08.99, embora classificados pela técnica de fluorescência como de resistência intermediária, foram classificados pela técnica visual de patogenicidade como resistentes, com a justificativa de que a reação avaliada representa a resposta a apenas um ciclo do patógeno na planta. Os dados sugerem que os

critérios definidos na **Tabela 3** poderão ser de grande valia para avaliar patogenicidade de *P. polysora* em condições de campo, durante o ciclo da cultura do milho.

Pelas combinações genótipos x isolados observa-se que os genótipos L₄-420 e L₁-1199 parecem ter um potencial de crescimento em condições de ataque do *P. polysora*, desde que seu aparato fotossintético tem mostrado marcadas características de resistência à ferrugem, como pode ser visto pelas razões Fv/Fo e Fv/Fm, que foram mais altas em folhas inoculadas com *P. polysora* do que em controles (**Tabelas 1 e 2**). Isto sugere que esses genótipos exibiram uma melhor conversão do *quantum* fotossintético sob influência de inoculação dirigida de *P. polysora* do que sem inoculação, em relação a genótipos sensíveis, como por exemplo o L₃-5128412891. O rendimento quântico (atividade fotoquímica) do PSII pode ser medido pela razão Fv/Fm. A eficiência pela qual a energia de excitação colhida pela antena PSII é transferida e utilizada pelo centro de reação PSII para fotoquímica pode ser estimada também por Fv/Fm (Durães et al. 2000). A porcentagem que decresce em Fv/Fm do genótipo sensível (L₃-5128412891) após inoculação com *P. polysora* (**Tabela 2**) indica um decréscimo na eficiência da fotoquímica primária do PSII. A porcentagem de flutuações na razão Fv/Fm mostrou-se correlacionar muito fortemente com a taxa de injúria avaliada pelo índice visual de patogenicidade.

Como no caso de outras injúrias, provocadas por estresses ambientais (Havaux and Lannoye 1983), medidas de fluorescência de clorofila *in vivo* pode ser usado para *screening* para tolerância a estresses abióticos (Al, N, temperaturas extremas, seca) como também a estresses bióticos, como na infecção por *Puccinia polysora*.

CONCLUSÕES

Os resultados de classificação de resistência a *Puccinia polysora* através de parâmetros de fluorescência da clorofila (L₄ I₂.05.99, L₁ I₁.08.99, L₄ I₁.08.99, L₂ I₂.05.99) > (L₁ I₂.05.99, L₂ I₁.08.99) > (L₃ I₂.05.99, L₃ I₁.08.99), apontam as linhagens L₄-420, L₁-1199 e L₂-527 (resistentes) e linhagem L₃-5128412891 (sensível), de acordo com os critérios visuais de patogenicidade.

A técnica de fluorescência da clorofila se presta para *screening* de linhagens de milho visando resistência a doenças foliares por *Puccinia polysora*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, F.C. Relação das espécies de uredinales coletadas na Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.6, p. 147-150, 1971.
- Bolhar-Nordenkamp, H.R.; Long, S.P.; Baker, N.R.; Oquist, G.; Schreiber, U.; Lechner, E.G. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. **Funct. Ecol.** 3:497-514. 1989.
- Durães, F.O.M.; Oliveira, A.C.; Magalhães, P.C.; Martinez, C.A. Detection of stress conditions in plants and potential for *screening* in maize by using chlorophyll fluorescence. 510-516 pp. **In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO, 45., e REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO SORGO, 28., Anais...**, Embrapa Clima Temperado. Pelotas, RS, 1-3/agosto/2000.
- Goedheer, J.C. Fluorescence in relation to photosynthesis. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 23:87-112. 1972.
- Govindjee, W.; Downton, J.S.; Fork, D.C.; Armond, P.A. Chlorophyll a fluorescence transient as an indicator of the water potential of leaves. **Plant Sci. Lett.** 20:191-194. 1981.

- Havaux, M. and Lannoye, R. Chlorophyll fluorescence induction: a sensitive indicator of water stress in maize plants. **Irrig. Sci.** **4**: 147-151. 1983.
- Havaux, M. and Lannoye, R. In vivo Chlorophyll Fluorescence and Delayed Light Emission as Rapid Screening Techniques for Stress Tolerance in Crop Plants. **Z. Pflanzenzüchtg** **95**:1-13. 1985.
- Leonard, K.J. Foliar pathogens of corn in North Carolina. **Plant Disease Reporter**. Washington, v.58, p. 532-534, 1974.
- Melching, J.S. Corn rusts: types, races and destructive potential. **In: ANNUAL CORN & SORGHUM RESEARCH CONFERENCE**, 30, Washington; 1975. Proceedings ... Washington: American Seed Trade Association, 1975. p. 90-155.
- Robert, A.L. Host ranges and races of the corn rusts. *Phytopathology*. St. Paul, v.52, p. 1010-1012, 1962.
- Scholes, J.D. & Horton, P. Photosynthesis and chlorophyll fluorescence: simultaneous measurements. pp. 130-135. **In: METHODS IN COMPARATIVE PLANT ECOLOGY**. A laboratory manual. Ed. by G.A.F. Hendry and J.P. Grime. Chapman & Hall, London, 1993. 252 p.
- Von Pinho, R.G. **Metodologias de avaliação, quantificação de danos e controle genético da resistência a *Puccinia polysora* Underw., e *Physopella zae* (Mains) Cummins e Ramachar na cultura do milho**. Lavras: UFLA, 1998. 137 p. (Tese – Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

Tabela 1 - Parâmetros de Fluorescência da Clorofila, em quatro linhagens de milho, cultivadas em *LEm*, envasados (5,0 kg) em casa de vegetação, e inoculados com dois isolados de *Puccinia polysora*, avaliados aos 35 dias após semeadura. Média de 03 plantas por vaso. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas, MG. Junho/2001.

Tratamentos		Folha por Planta*	Parâmetros de Fluorescência da Clorofila						
Genótipo	Isolado		Fo	Fv	Fm	Tm	Fv/Fm	Fv/Fo	Área
L ₁ - 1199	I ₁ - 08.99	1. NI	404	1316	1720	301	0,765	3,261	24567
		2. I	431	1242	1673	275	0,741	2,891	19400
	I ₂ - 05.99	1. NI	440	1275	1715	414	0,743	2,898	22800
		2. I	557	854	1410	323	0,590	1,748	14405
L ₂ -527	I ₁ - 08.99	1. NI	498	1265	1763	336	0,716	2,565	27433
		2. I	357	674	1031	239	0,489	1,423	12675
	I ₂ - 05.99	1. NI	491	1339	1830	228	0,732	2,730	22875
		2. I	476	975	1381	208	0,657	1,940	9688
L ₃ - 5128412891	I ₁ - 08.99	1. NI	455	1234	1689	186	0,730	2,716	20367
		2. I	633	255	888	171	0,290	0,422	3493
	I ₂ - 05.99	1. NI	443	1213	1655	261	0,732	2,756	20567
		2. I	303	132	435	179	0,302	0,502	1673
L ₄ - 420	I ₁ - 08.99	1. NI	430	1354	1783	277	0,759	3,161	23050
		2. I	416	1028	1444	249	0,712	2,473	12550
	I ₂ - 05.99	1. NI	457	1246	1703	325	0,732	2,726	24600
		2. I	407	1054	1461	245	0,721	2,590	15500

* Planta por vaso: NI = *Folha não-inoculada (controle)*, 1^a folha superior com lígula visível; e, I = *Folha inoculada, inferior*.

Tabela 2 - Efeitos da resistência/susceptibilidade a *Puccinia polysora* em milho, nos parâmetros de fluorescência da clorofila. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas, MG. Junho/2001.

Tratamentos		Fv/Fo			Escala de Notas*	Fv/Fm			Escala de Notas*
Genótipo	Isolado	1. NI (Controle)	2. I	% do Controle	Escore de 1 a 5	1. NI (Controle)	2. I	% do Controle	Escore de 1 a 5
L ₁ -1199	I ₁ - 08.99	3,261	2,891	0,87	1	0,765	0,741	0,97	1
	I ₂ - 05.99	2,898	1,748	0,60	3	0,743	0,590	0,79	2
L ₂ -527	I ₁ - 08.99	2,565	1,423	0,55	4	0,716	0,489	0,68	3
	I ₂ - 05.99	2,730	1,940	0,71	2	0,732	0,657	0,90	1
L ₃ - 5128412891	I ₁ - 08.99	2,716	0,422	0,16	5	0,730	0,290	0,40	5
	I ₂ - 05.99	2,756	0,502	0,18	5	0,732	0,302	0,41	5
L ₄ -420	I ₁ - 08.99	3,161	2,473	0,78	2	0,759	0,712	0,94	1
	I ₂ - 05.99	2,726	2,590	0,95	1	0,732	0,721	0,98	1

* Planta por vaso: NI = *Folha não-inoculada (controle)*, 1^a folha superior com lígula visível; e, I = *Folha inoculada, inferior*.

Escala de doenças foliares em milho, para *Puccinia polysora*: 1- resistente, 2- parcialmente resistente, 3-intermediário, 4- parcialmente sensível, 5- totalmente sensível (Robert, 1962).

Tabela 3 - Classificação de resistência/susceptibilidade de linhagens de milho a *Puccinia polysora*, baseada em parâmetros de fluorescência (% do Controle = I/NI) e Escala visual de patogenicidade. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas, MG. Junho/2001.

Genótipo	Parâmetros de Fluorescência (% do Controle)		Escala visual de doenças em milho
	Fv/Fo	Fv/Fm	
Resistente	>0,80	>0,80	1
Intermediário	0,50-0,79	0,50-0,79	2 – 3 – 4
Sensível	<0,50	<0,50	5

Planta por vaso: *NI* = Folha não-inoculada (controle), *I* = folha superior com lígula visível; e, *I* = Folha inoculada, inferior.

Escala de doenças foliares em milho, para *Puccinia polysora*: 1- resistente, 2- parcialmente resistente, 3-intermediário, 4- parcialmente sensível, 5- totalmente sensível (Robert, 1962).