

# Avaliação dos níveis de clorofila em folhas de tomateiro da cultivar Santa Clara, do mutante 'firme' e do híbrido F<sub>1</sub>

Adilson Ricken Schuelter<sup>1\*</sup>, Fernando Luiz Finger<sup>2</sup>, Vicente Wagner Dias Casali<sup>2</sup>, Dany Silvio Souza Leite Amaral<sup>2</sup> e Aldo Shimoya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Paranaense, Av. Parigot de Souza 3636, Jardim Prada, 85903-170, Toledo, Paraná, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, s/n, 36571-000, Viçosa-Minas Gerais, Brasil. \*Autor para correspondência. e-mail: adilson@unipar.br

**RESUMO.** Recentemente, na região produtora de hortaliças de Viçosa, Estado de Minas Gerais, foram identificadas plantas de tomate da cultivar Santa Clara, *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae), que se mostraram potencialmente úteis em programas de melhoramento que visem aumentar a vida de prateleira de frutos. No entanto, essas plantas promissoras, denominadas de 'mutante firme', apresentam senescência foliar precoce e redução do tamanho médio dos frutos, quando o gene se encontra no estado homocigótico recessivo, sendo visualmente normal quando no estado heterocigótico. Assim o objetivo do presente trabalho foi avaliar os níveis de pigmentos foliares em diferentes posições da planta e em diferentes tempos de cultivo, pelos métodos descritos por Lichtenthaler (1987) e pelo índice SPAD (Soil Plant Analytical Division Value), para verificar a ocorrência ou não de comportamento diferencial de indivíduos heterocigotos em relação aos progenitores Santa Clara e ao mutante 'firme'. Para isso, foram realizados dois experimentos, empregando-se plantas cultivadas em vasos, submetidas a condições de casa-de-vegetação e arranjadas em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados das análises, pelo método de Lichtenthaler (1987) mostraram que a clorofila e os pigmentos carotenóides são degradados mais precocemente no mutante 'firme' em relação à cultivar Santa Clara. Além do que, pelo índice SPAD observou-se que os indivíduos, portando a mutação no estado heterocigótico, e os da cultivar Santa Clara apresentaram taxas similares de degradação de clorofila em relação ao tempo de cultivo. Com isso, pode-se concluir que a mutação no estado heterocigótico, em cruzamento com Santa Clara, tem seus efeitos restaurados para esses caracteres bioquímicos.

**Palavras-chave:** *Lycopersicon esculentum*, mutante 'firme', degradação de clorofila.

**ABSTRACT.** Chlorophyll level evaluation in tomatoes leaves of *Santa Clara* cultivar, of 'firme' mutant and hybrid F<sub>1</sub>. Recently, in Viçosa (MG), a region of vegetable crop producing, tomatoes of *Santa Clara* cultivar, *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae), that showed potential use for breeding programs, aiming to increase the shelf life of the fruit were identified. However, plants from the mutant 'firme' have precocious leaf senescence and reduction of the average fruit size when in homozygous background. The objective of the present study was the evaluation of the pigment levels in the leaves on different development positions and stage, utilizing the method described by Lichtenthaler (1987) and the SPAD (Soil Plant Analytical Division Value) in heterozygous mutant related to the progenitor *Santa Clara* cultivar and the homozygous mutant 'firme'. Thus, two experiments containing two plants per vase grown in greenhouse and arranged at complete randomized way were set up. The data obtained through the Lichtenthaler (1987) method showed that the chlorophyll and carotenoid pigments were degraded earlier in the homozygous mutant 'firme' in comparison to *Santa Clara* cultivar. While using the SPAD the heterozygous plants had similar rates of chlorophyll degradation to the *Santa Clara* cultivar. Based on data, it was possible to conclude that the mutation in heterozygous stage containing *Santa Clara* in its background had its effects on biochemical characteristics restored.

**Keywords:** *Lycopersicon esculentum*, 'firme' mutant, chlorophyll degradation.

## Introdução

A redução nos níveis de clorofila e o concomitante amarelecimento de folhas são indicativos da ocorrência de senescência foliar (Oh *et al.*, 1997).

Assim, o envelhecimento foliar é o estágio final do desenvolvimento desses órgãos, ocorrendo modificações na estrutura, no metabolismo e na expressão gênica. Estruturalmente, células de folhas

senescentes apresentam modificações subcelulares, como a perda da integridade dos cloroplastos, cuja organela contém mais de 70% da proteína foliar. Em termos metabólicos, os processos de síntese são suplantados pelos de catálise, como o da clorofila e o de macromoléculas como proteínas, lipídeos e RNA. Além disso, o programa de senescência foliar é acompanhado por modificações na expressão gênica, caracterizando-se pela ativação e inativação de distintos conjuntos gênicos (Gan e Amasino, 1997).

A senescência foliar não é simplesmente um processo degenerativo, mas também evolucionariamente adquirido, pois as plantas se utilizam desse caractere genético para o seu crescimento como um todo, como por exemplo, a remobilização de assimilados das estruturas vegetativas para as reprodutivas (Oh et al., 1997; Thomas e Stoddart, 1980). No entanto, em campos de cultivo, a senescência foliar precoce, resultante de efeitos promovidos por mutações gênicas (Moura, 1999) e por fatores ambientais, pode limitar a produção e a qualidade do produto em certas culturas (Gan e Amasino, 1997).

A metodologia padrão de extração e determinação da clorofila em laboratório (Arnon, 1949), ainda que fácil, apresenta desvantagens como coleta destrutiva do material vegetal, extração via maceração com acetona e leitura em espectrofotômetro (Guimarães, 1998). No entanto, recentes avanços no aperfeiçoamento dos medidores portáteis de clorofila permitem a determinação da concentração de clorofila das folhas de maneira expedita e de forma não-destrutiva, realizada diretamente no campo e com possibilidade de ser repetida (Yadava, 1986).

Recentemente, na região produtora de hortaliças de Viçosa, Estado de Minas Gerais, foram identificadas plantas de tomate da cv. Santa Clara, *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae), com frutos firmes e com maior vida de prateleira, além de apresentar modificações em caracteres morfológicos como estigma amarelado, frutos imaturos, de cor amarelo-creme e senescência foliar precoce (Schuelter et al., 1997a,b). Posteriormente, Schuelter (1999) verificou que os caracteres morfológicos eram governados por um gene recessivo, mapeado no cromossomo 10 na região do gene *lutescent-2* (*l-2*), além do que detectou a presença de fator genético que promove menor perda de firmeza.

Como o mutante identificado na cv. Santa Clara, denominado de mutante 'firme' (frm), é potencialmente útil em programas de melhoramento, que objetivem aumentar a vida de prateleira de frutos com a mutação no estado heterozigótico e devido aos efeitos deletérios da senescência foliar precoce

(Schuelter et al., 2001, 2002), torna-se necessário avaliar se os níveis de clorofila em diferentes tecidos foliares foram modificados. Assim, o presente trabalho teve como objetivo comparar os níveis de clorofila de folhas de diferentes partes e estádios de desenvolvimento de plantas heterozigotas para a mutação em relação aos progenitores Santa Clara e mutante 'firme'.

## Material e métodos

Foram conduzidos dois experimentos, em condições de casa-de-vegetação, envolvendo a cv. Santa Clara, o mutante 'firme', e o híbrido proveniente do cruzamento entre esses genótipos. Os tratamentos foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado, apresentando três repetições, sendo cada parcela constituída por duas plantas.

Os experimentos foram conduzidos sob estufa plástica, sendo as mudas produzidas em bandejas de isopor e transplantadas quando apresentavam quatro folhas definitivas para vasos de 10 L de capacidade. O espaçamento empregado foi de 45 cm entre plantas e 1,00 m entre linhas, sendo conduzida uma haste por planta e tutoradas com bambu em sistema vertical. As adubações seguiram os resultados obtidos por Guimarães (1998), que consistiu pelo emprego de 80 Kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, 180 Kg.ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 50 Kg.ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O, 200 Kg.ha<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> e 10 Kg.ha<sup>-1</sup> de bórax no solo para o plantio. Foram feitas seis adubações químicas complementares em cobertura, em intervalos de 15 dias entre uma aplicação e outra. A primeira adubação de cobertura continha 80 Kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, 180 Kg.ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 50 Kg.ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O. Já as demais adubações foram feitas com 80 Kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio e 50 Kg.ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O. A adubação de cobertura e as irrigações foram realizadas por gotejamento, sendo o controle fitossanitário realizado quando necessário.

As determinações dos níveis das clorofilas foram realizadas pelo método descrito por Lichtenthaler (1987) e pelo uso do medidor portátil de clorofila SPAD-502 [Soil-Plant Analysis Development (SPAD) Section. Minolta Camer Co., Ltd, Japão].

O experimento I constituiu da determinação dos níveis de clorofila e de carotenóides descritos por Lichtenthaler (1987), de segmentos foliares da primeira, segunda e terceira folha de plantas da cv. Santa Clara e do mutante 'Firme', aos 30 e 60 dias de cultivo. O limbo de cada folha foi separado do pecíolo, sendo, na seqüência, realizada a pesagem e os segmentos foliares macerados em acetona 80%, na presença de CaCO<sub>3</sub>. Os extratos obtidos foram filtrados por meio de papel de filtro rápido, em balões de 50 ml, completando-se o volume. A

densidade ótica dos filtrados foi lida em espectrofotômetro (Hitachi, modelo V.2000) a 663, 645 e 470 nm. Posteriormente, os valores dos teores de clorofila e de carotenóides foram transformados para  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de clorofila no limbo foliar.

No experimento II foram realizadas anotações dos níveis de clorofila na segunda, quarta, sexta e oitava folhas da cv. Santa Clara, do mutante 'firme' e do  $F_1$ , empregando-se o medidor SPAD. As anotações foram iniciadas 60 dias após a semeadura e realizadas em intervalos de 15 dias até serem completados 120 dias de cultivo. Em cada folha, foram feitas leituras nas porções proximal, distal e mediana, considerando-se a média das determinações.

Os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância, além do que, análises de regressão foram realizadas para as determinações com medidor SPAD. As análises estatísticas foram realizadas com o programa GENES (Cruz, 1997).

### Resultados e discussão

Pela análise dos pigmentos foliares, constatou-se que os níveis de clorofila A, B e total em folhas de plantas do mutante 'firme' (Tabela 1), aos 30 e 60 dias de cultivo, foram em média inferiores aos da cv. Santa Clara. Além disso, detectou-se que plantas do mutante 'firme' com 60 dias de cultivo apresentavam teores de clorofila em folhas bem inferiores àquelas com 30 dias, fornecendo os primeiros indícios de que o amarelecimento precoce das folhas possa estar relacionado à degradação desse pigmento.

Em termos visuais foi possível distinguir amarelecimento precoce das folhas baixas das plantas do mutante 'firme' em relação ao da cv. Santa Clara aos 30 dias de cultivo. No entanto, realizando a análise de variância para níveis de clorofila (Tabela 1), constata-se que, apesar das diferenças em valores absolutos entre mutante 'Firme' e cv. Santa Clara para dados de plantas cultivadas durante 30 dias, não foram significativos estatisticamente. Porém os níveis de clorofila de plantas do cv. Santa Clara aos 60 dias de cultivo foram superiores em relação ao do mutante 'Firme', exceto para níveis de clorofila B na segunda folha. Além do que, os níveis de carotenóides, mostrados na Tabela 1, indicam maior abundância desse grupo de pigmentos na primeira e segunda folhas de plantas da cv. Santa Clara, cultivadas durante 60 dias, e na terceira com 30 dias. Dessa forma, pode-se inferir que a mutação promove redução dos níveis de clorofila e de carotenóides.

Os mutantes de tomate *lutescent-1(l-1)* e *lutescent-2(l-2)*, identificados por Rick (1980), e que apresentam o mesmo padrão fenotípico do mutante 'firme' (Schuelter, 1999; Schuelter *et al.*, 2002), têm

sido pouco estudados, não sendo apresentados relatos quanto ao mecanismo bioquímico que promove a redução dos níveis de clorofila. No entanto, a senescência foliar precoce tem sido intensamente estudada em mutantes de *Arabidopsis*, o *lutescent-1(lut-1)* e o *lutescent-2(lut-2)*, estando associada à lesão em genes específicos da rota biossintética de carotenóides que levam à redução de luteína, que é um dentre os fatores responsáveis pela estabilização dos fotossistemas, resultando na degradação de clorofila (Plumley & Schmidt, 1987; Paulsen *et al.*, 1990). Entretanto, Pogson *et al.* (1996) sugerem que a luteína não seja o componente principal na manutenção da atividade fotossintética. Dessa forma, torna-se necessário verificar, em trabalhos futuros, se no mutante 'firme' os genes relacionados com a rota biossintética de carotenóides estão contribuindo para a ocorrência de senescência foliar precoce.

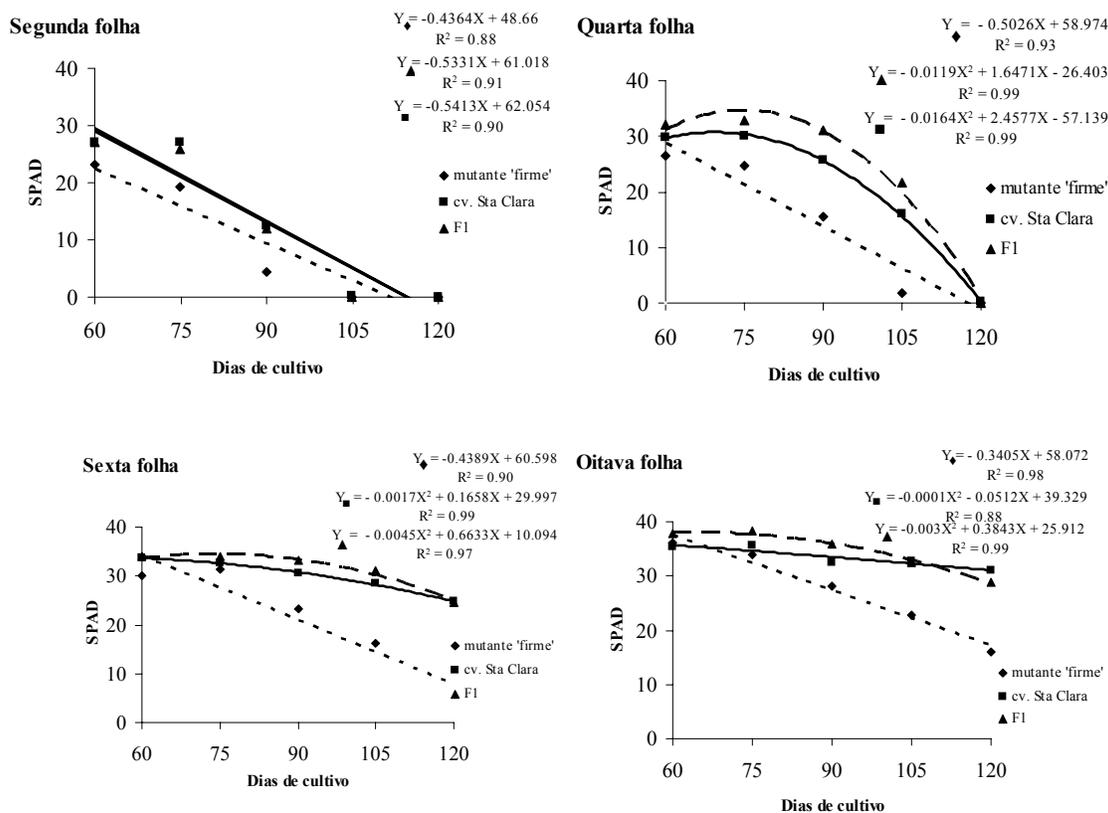
Na avaliação dos níveis de clorofila na segunda, quarta, sexta e oitava folhas da planta, pelo método de SPAD (Figura 1), verificou-se que a degradação de clorofila ocorre mais precocemente no mutante 'firme' do que nas folhas da cv. Santa Clara e do híbrido  $F_1$ , indicando que a mutação em indivíduos heterozigotos não promove efeitos deletérios sobre o processo de catálise, corroborando com os resultados obtidos para o método descrito por Lichtenthaler (1987). Como o conteúdo de clorofila determinado pelo método de SPAD é um indicador da atividade fotossintética, que se encontra intimamente correlacionada com a produção em diferentes espécies cultivadas como arroz (Ramesh *et al.*, 2002), sorgo (Xu *et al.*, 2000), tomate (Guimarães, 1998) e trigo (Rharrabi *et al.*, 2001), pode-se inferir que a mutação no estado heterozigótico, provavelmente, não promove efeitos para a produção final da cultura, nem aumento da vida de conservação pós-colheita e redução da perda de firmeza em relação ao cv. Santa Clara (Schuelter *et al.*, 2001). No entanto, em condição de baixa disponibilidade de nitrogênio, deverão ser realizados estudos para verificar a ocorrência de redução do conteúdo de clorofila, visto que Rick (1980) constatou que plantas do mutante *l-2* apresentavam senescência foliar ainda mais precoce. Em estado de homozigose, o mutante 'firme' produz frutos com menor tamanho e espessura do pericarpo comparado à cultivar Santa Clara, provavelmente pela redução da taxa fotossintética devido à queda precoce dos teores de clorofila das folhas (Moura, 1999).

Assim, conclui-se que a mutação no estado heterozigótico tem os níveis de clorofila restaurados, possibilitando sua utilização em programas de melhoramento que visem ao aumento da conservação pós-colheita de frutos de tomateiros.

**Tabela 1.** Teores médios de clorofila e carotenóides de folhas em três posições das plantas de tomate da cv. Santa Clara (SC) e do mutante 'firme' (frm) aos 30 e 60 dias de cultivo. Viçosa, UFV, 1999

Folha	Genótipos	Teor ( $\mu\text{g MF}^{-1}$ )							
		Clorofila A		Clorofila B		Clorofila total		Carotenóides	
		30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Primeira	SC <sup>1</sup>	481,32 a	365,49 a	431,02 a	158,14 a	912,34 a	523,63 a	83,32 a	216,42 a
	frm	355,04 a	135,57 b	320,52 a	69,19 a	675,55 a	204,76 a	75,79 a	72,67 b
Segunda	SC	644,47 a	496,33 a	591,53 a	177,52 a	1235,99 a	673,85 a	117,38 a	321,25 a
	frm	509,44 b	178,88 b	453,80 b	97,19 a	963,03 b	276,01 b	99,01 a	100,87 b
Terceira	SC	737,60 a	589,26 a	863,08 a	202,11 a	1600,68 a	791,38 a	195,43 a	328,01 a
	frm	638,60 a	256,38 b	573,69 a	83,96 b	1212,25 a	340,34 b	104,75 b	173,19 a

<sup>1</sup>As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.



**Figura 1.** Determinação indireta dos níveis de clorofila total de folhas, pelo índice SPAD, na segunda, quarta, sexta e oitava folha da cv. Santa Clara (SC), no mutante 'firme' (frm) e no híbrido (F1). Viçosa, UFV, 1999

### Agradecimentos

À Fapemig e ao CNPq pela concessão dos recursos financeiros que tornaram possível a realização deste trabalho.

### Referências

ARNON, D.I. Copper enzymes isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, Bethesda, v.24, p.1-15, 1949.

CRUZ, C.D. Programa GENES: Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora UFV, 1997.

GAN, S.; AMASINO, R.M. Make sense of senescence: molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiol.*, Bethesda, v.113, p. 313-319, 1997.

GUIMARÃES, T.G. Nitrogênio no solo e na planta, teor de clorofila e produção de tomateiro, no campo e na estufa, influenciados por doses de nitrogênio. 1998. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

- LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigment photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.*, San Diego, v.148, p. 362-385, 1987.
- MOURA, M.A. *Crescimento e pós-colheita de frutos de tomateiro cv. Santa Clara e do seu mutante firme*. 1999. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.
- PAULSEN, H. *et al.* Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta*, Berlin, v. 181, p. 204-211, 1990.
- POGSON, B. *et al.* Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *Plant Cell*, Rockville, v.8: p. 1627-1639, 1996.
- PLUMLEY, F.G.; SCHMIDT, G.W. Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: xanthophylls-dependent assembly and energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, DC, v.83, p.146-150, 1987.
- OH, S.A. *et al.* Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, Oxford, v.12, p.527-535, 1997.
- RAMESH, K. *et al.* Chlorophyll dynamics in rice (*Oryza sativa*) before and after flowering on SPAD (chlorophyll) meter monitoring and its relation with grain yield. *J. Agron. Crop Sci.*, Berlin, v.188, p.102-105, 2002.
- RHARRABTI, Y. *et al.* Environmental and genetic determination of protein content and grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Plant Breed.*, Berlin, v.120, p.381-388, 2001.
- RICK, C.M. Tomato linkage survey. *Tomato Genet. Coop. Rep.*, Ithaca, v.30, p.2-17, 1980.
- SCHUELTER, A.R. *Análise genética e da pós-colheita de um mutante de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)*. 1999. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.
- SCHUELTER, A.R. *et al.* Alterações na firmeza de frutos de mutante natural de tomate oriundo da variedade Santa Clara, na região de Viçosa (MG). *Rev. Bras. Genet. (Supplem.)*, Ribeirão Preto, v.20, p.153, 1997a.
- SCHUELTER, A.R.; *et al.* Comparação entre características químicas de frutos da variedade de tomate Santa Clara, de um mutante natural e do híbrido. *Rev. Bras. Genet. (Supplem.)*, Ribeirão Preto, v.20, p.153, 1997b.
- SCHUELTER, A.R.; *et al.* Biometrical analysis of a mutant that increases shelf-life of tomato fruits. *Crop Breeding. Applied. Biotechnology.*, Londrina, v.1, p.44-53, 2001.
- SCHUELTER, A.R.; *et al.* Inheritance and genetic linkage analysis of a firm-ripening tomato mutant. *Plant Breed.*, Berlin, v.121, p.338-342, 2002.
- THOMAS, H.; STODDART, J.L. Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, Palo Alto, v. 31, p.83-111, 1980.
- XU, W. *et al.* Stay green trait grain sorghum: relationship between visual rating and leaf chlorophyll concentration. *Plant Breed.*, Berlin, v.119, p.365-367, 2000.
- YADAVA, U.L. A rapid and nondestructive method to determine chlorophyll in intact leaves. *HortScience*, Alexandria, v.21, p.1449-1450, 1986.

Received on June 17, 2002.

Accepted on September 06, 2002.