



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

Campus São Gabriel

**EFEITO DO DÉFICIT HÍDRICO NA EXPRESSÃO DE
PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS EM *Physcomitrium
acutifolium* BROTH. (FUNARIACEAE)**

MARIELE CRISTINE TESCHE KÜSTER

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

**EFEITO DO DÉFICIT NA EXPRESSÃO DE PIGMENTOS
FOTOSSINTÉTICOS EM *Physcomitrium acutifolium* BROTH.
(FUNARIACEAE)**

MARIELE CRISTINE TESCHE KÜSTER

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Filipe de Carvalho Victoria

São Gabriel

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

K97e

KÜSTER, Mariele Cristine Tesche

Efeito do déficit hídrico na expressão de pigmentos fotossintéticos em *Physcomitrium acutifolium* Broth. (Funariaceae)

/Mariele Cristine Tesche Küster. – Rio Grande do Sul: UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel, 2018.

IX, 39 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Filipe de Carvalho Victoria

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – UNIPAMPA/ *Campus* São Gabriel/ Trabalho de Conclusão de Curso, 2018.

Referências: f. 25-27.

1. Introdução. 2. Objetivos. 3. Metodologia. 4. Resultados e discussão. 5. Considerações finais. – Monografia I. Victoria, Filipe de Carvalho. II. Universidade Federal do Pampa, *Campus* São Gabriel, Trabalho de Conclusão de Curso. III. Título.

MARIELE CRISTINE TESCHE KÜSTER

**EFEITO DO DÉFICIT HÍDRICO NA EXPRESSÃO DE PIGMENTOS
FOTOSSINTÉTICOS EM *Physcomitrium acutifolium* BROTH. (FUNARIACEAE)**

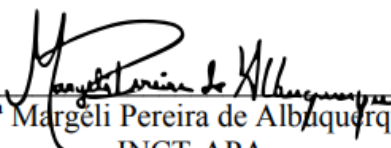
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 14/12/2018.

Banca examinadora:



Prof.^o Dr. Filipe de Carvalho Victoria
Orientador
UNIPAMPA



Dr.^a Margeli Pereira de Albuquerque
INCT-APA



Prof.^o Dr. Frederico Costa Beber Vieira
UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho aos meus pais, Enor (Papai Noel) e Sandra, que, principalmente me deram a oportunidade de cursar uma graduação longe de casa nunca medindo esforços para me ajudar e me dar confiança. A conquista desta graduação pertence mais a eles do que a mim!

Ao meu irmão Igor que me apoiou e me auxiliou em campos e transporte. Sempre foi mais curioso do que eu a respeito da Biologia. À minha cunhada Eliane por toda a ajuda a qualquer hora e pelas marmitas.

Aos meus amigos do NEVA, em especial Bruna Laindorf, Fabíola Lucini, Marina Falcão, Fernando Bertazzo e Lilian Maggio que propiciaram momentos hilários e aos quais estiveram ao meu lado a todo o momento e sempre me convencendo e me arrastando para sair de casa.

Ao Profº Drº Adriano L. Schünemann pela paciência e tempo dedicado para auxiliar a formação deste trabalho.

Ao orientador Profº Drº Filipe de Carvalho Victória que sempre fez o melhor para me ajudar e resolver meus problemas não importando a hora, pela sua orientação e paciência.

Aos demais professores que contribuíram com a minha formação.

Muito obrigada.

“Se você for atormentado por algo misterioso

Ou tiver um problema difícil de resolver

Há um lugar onde você sempre pode ir

Você só precisa procurá-lo.”

O reino dos gatos

RESUMO

EFEITO DO DÉFICIT HÍDRICO NA EXPRESSÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS EM *Physcomitrium acutifolium* BROTH. (FUNARIACEAE)

Devido à resiliência das briófitas e sua capacidade de colonização em diversos tipos de condições ambientais, os estudos biotecnológicos com musgos *in vitro* visam desvendar as respostas fisiológicas para o melhor entendimento da relação planta x ambiente. O déficit hídrico é um fator que causa mudanças nos processos fisiológicos, sendo um destes, alterações na expressão dos pigmentos fotossintetizantes. O objetivo do estudo foi avaliar a resposta dos pigmentos fotossintéticos de *Physcomitrium acutifolium* Broth. em diferentes condições de estresse hídrico. A indução ao estresse hídrico foi realizada com cinco concentrações de Polietilenoglicol (PEG) combinados com duas formas de tempo de duração do estresse, de 2 horas e de 24 horas em mesa agitadora com meio KNOP mantidos em BOD com fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro) a $20 \pm 1,4$ °C. Os pigmentos foram extraídos com DMSO e acetona 80% e a absorbância medida em espectrofotômetro UV-VIS SP 2000UV. As amostras com DMSO foram refrigeradas para as leituras após 3 e 7 dias. Os dados foram submetidos à ANOVA e realizado teste t-Student e as médias comparadas pelo teste de Tukey no software R Studio. Constatou-se que o método de acetona 80% apresentou os maiores valores de extração dos pigmentos, quando comparado ao método de DMSO expressando diferenças significativas no estresse hídrico de 2 horas e 24 horas, principalmente no tratamento P5 (-0.40 Mpa). O método de DMSO exibiu diferença estatística no tempo de estresse de 24 horas para a clorofila *a* (663), contudo proporcionou valores mais estáveis. O *P. acutifolium* demonstrou possuir resiliência na condição mais extrema, no caso o P5 (-0.40 Mpa) em 2 horas, porém revelou-se sensível ao estresse de 24 horas. No geral, os pigmentos obtiveram um comportamento semelhante, pois no tempo de estresse de duas horas no P5, ambas as expressões dos pigmentos foram mais expressivas; em contrapartida, esse valores diminuem no tempo de 24 horas sob estresse hídrico. As leituras do método com DMSO para avaliar a capacidade de armazenamento deste, não apresentaram diferença significativa entre os dias 1, 3 e 7, exceto o comprimento de onda 645 do dia 1, ou seja, os extratos mantiveram-se estáveis. Estudos adicionais serão necessários para entender os processos envolvidos com a resposta ao estresse hídrico do *P. acutifolium*.

Palavras-chave: Estresse hídrico, Briófitas, Espectrofotometria, DMSO, Acetona 80%.

ABSTRACT

EFFECT OF THE HYDRICAL DEFICIT ON EXPRESSION OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN *Physcomitrium acutifolium* BROTH. (FUNARIACEAE)

Due to the resilience of bryophytes and their ability to colonize in various types of environmental conditions, the biotechnological studies with in vitro moss aim to unravel the physiological responses to a better understanding of the relation between plant and environment. The water deficit is a factor that causes changes in the physiological processes, being one of them, changes in the expression of the photosynthetic pigments. The objective of this study was to evaluate the response of photosynthetic pigments of *Physcomitrium acutifolium* Broth. in different water stress conditions. Water stress induction was performed with five concentrations of polyethylene glycol (PEG) combined with two 2 hour and 24 hour stress duration forms on a shaker table with KNOP medium maintained in BOD with photoperiod of 16/8 h (light / dark) at 20 ± 1.4 ° C. The pigments were extracted with DMSO and 80% acetone and the absorbance measured in UV-VIS SP 2000UV spectrophotometer. DMSO samples were refrigerated for readings after 3 and 7 days. The data were submitted to ANOVA and performed t-Student test and the means compared by the Tukey test in the R Studio software. It was verified that the 80% acetone method had the highest pigment extraction values when compared to the DMSO method, expressing significant differences in water stress of 2 hours and 24 hours, mainly in the P5 treatment (-0.40 Mpa). The DMSO method showed a statistical difference in the 24 hour stress time for chlorophyll a (663), however, it provided more stable values. *P. acutifolium* showed resilience in the most extreme condition, in this case P5 (-0.40 MPa) in 2 hours, but it was sensitive to 24-hour stress. In general, the pigments obtained a similar behavior, because at the time of stress of two hours in P5, both pigment expressions were more expressive; in contrast, these values decrease in the time of 24 hours under water stress. The readings of the DMSO method to evaluate the storage capacity did not present significant difference between days 1, 3 and 7, except for the wavelength 645 of day 1, that is, the extracts remained stable. Additional studies will be needed to understand the processes involved in the response to water stress of *P. acutifolium*.

Key words: Water stress, Bryophyte, Spectrophotometry, DMSO, 80% acetone.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Briófitas.....	10
1.2 Estresse hídrico	11
1.3 Pigmentos fotossintetizantes	12
1.4 Solventes	15
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 METODOLOGIA	16
3.1 Material vegetal	16
3.2 Delineamento experimental	17
3.3 Extração dos pigmentos fotossintetizantes	18
3.4 Análises estatísticas	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
REFERÊNCIAS.....	26
ANEXOS.....	29

1. INTRODUÇÃO

1.1 Briófitas

Os musgos representam o segundo maior grupo de plantas terrestres e verdes e estão representadas por três divisões. A divisão Marchantiophyta (hepáticas) de gametófito achatado com rizoides que não possui estômatos, porém algumas espécies apresentam poros sem células-guarda; a divisão Anthocerotophyta (antóceros) de gametófitos multilobados e, a divisão mais expressiva, Bryophyta (musgos) que possuem gametófito com filídios que partem de um eixo central (caulídeo) e rizóide. Estas duas últimas divisões passam a apresentarem estômatos na fase esporofítica (JUDD et al., 2009; LLERAS, 1977). No ciclo de vida apresentam alternância de gerações, onde a fase duradoura da planta é gametofítica (n) e que gera os esporos, e, a fase curta, a esporofítica ($2n$) que é a formação dos esporos para fechar seu ciclo (COSTA et al., 2010).

Caracteristicamente são criptógamas, ou seja, não desenvolvem flores e sim esporos. Possuem pigmentos fotossintéticos como clorofila *a* e *b*, carotenos, xantofilas e reservas de amido, gordura, celulose e hemicelulose (COSTA et al., 2010). Devido não possuir sistema vascular, o transporte de água e substâncias são transportadas de célula para célula adquirida do ambiente circundante, ou seja, são poiquiloidricas e necessitam se ajustar de acordo com o ambiente (DELTORO et al., 1998; OLIVER et al., 2005). Isto resulta em um crescimento restrito, possivelmente sendo a causa de serem pequenas e não ultrapassando 20 cm de altura, e conseqüentemente a necessidade de ambientes úmidos e com pouca incidência direta de luz para evitar transpiração. Ainda assim, apresentam ampla capacidade de distribuição habitando os mais diversos tipos de substratos e tolerando as mais diversas condições ambientais extremas, sendo catalogadas desde regiões polares até desérticas (COSTA et al., 2010).

Sabe-se que possuem importante papel para o equilíbrio do meio ambiente, de forma que os estudos *in vitro* com musgos têm acrescido para fins biotecnológicos devido estes expressarem respostas fisiológicas mais rapidamente que plantas superiores, auxiliando no entendimento acerca da relação planta x ambiente.

No Brasil, a família Funariaceae Schwagr. possui 3 gêneros (*Entosthodon*, *Funaria* e *Physcomitrium*) e 13 espécies sendo 7 endêmicas, e uma destas é o musgo *Physcomitrium acutifolium* Broth. a espécie do presente estudo que se encontra atualmente com grau de ameaça Vulnerável (VU) (COSTA et al., 2005). Esta abrange uma área de distribuição desde

o estado do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul sendo encontrada em ambientes com altitude de 0-200 m e clima úmido (COSTA et al., 2012).

1.2 Estresse hídrico

O déficit hídrico é uma condição abiótica que expressa a falta de água no ambiente, ou seja, ocasiona um desvio nas condições ótimas de vida do organismo. Esse regime altera a morfofisiologia das plantas através de processos bioquímicos e fisiológicos, como fechamento estomático, declínio na taxa de crescimento, acúmulo de solutos e substâncias antioxidantes (CARVALHO et al., 2003), clorose, redução da expansão foliar, crescimento radicular, resposta hormonal (BELO, 2011).

Como adaptação morfológica à dessecação Kürschner & Ghazanfar (1998) dão exemplos de algumas briófitas, como *Aloina* e *Crossidium*, que mantêm células hialinas no filídio com uma deposição de células mortas fortemente aderidas como proteção contra dessecação e danos físicos. Outros como, *Pseudocrossidium* spp. e *Tortula porphyreoneura* (Müll. Hal.) C.C. Towns possuem células clorofilianas extras no filídio para aumentar a área fotossintética.

Como os musgos são desprovidos de estômatos verdadeiros, a troca gasosa ocorre livremente na superfície das células. De acordo com Bewley (1979), se a planta encontra-se dessecada devido ao ambiente não ocorrem trocas gasosas e posteriormente há uma queda nos processos fotossintéticos e de respiração. O teor de clorofila é pouco afetado em espécies tolerantes ao déficit hídrico devido estes serem capazes de reabsorverem a água rapidamente em comparação com as espécies não tolerantes que apresentam consideráveis perdas de clorofila (BEWLEY, 1979). De acordo com Santos et al. (2012), a degradação da clorofila, pode ocasionar uma considerável redução na taxa fotossintética e conseqüentemente uma redução na produtividade. Devido isso, segundo Makinde & Akande (2012), sua determinação tornou-se um parâmetro para avaliação ecofisiológica sendo então aplicada para estudos envolvendo condições ambientais.

Segundo Charron & Quatrano (2009), as Espécies Reativas de Oxigênio (EROS ou ROS em inglês) são responsáveis pela degradação da clorofila e de proteínas, além de causarem danos ao DNA e lipídios. Assim, a produção de EROS deve ser tamponada ou pode acarretar em sérios danos ao estado fisiológico ideal e na morte celular. Ainda, o acúmulo ativo de solutos orgânicos como a prolina e os açúcares solúveis e íons no citosol quando ocorre a

seca, ele diminui o potencial osmótico para manter o turgor o mais próximo possível do nível normal da planta para manter os processos fisiológicos estáveis (SILVEIRA et al., 2009).

Em maioria os musgos, durante curtos períodos, podem suportar dessecações de -20 a -40 Mpa (potencial hídrico) quanto outras espécies suportam apenas de -1,5 a -3 Mpa. A capacidade de tolerância a dessecação seria a reidratação da planta em recuperar seu metabolismo normal dentro de poucas horas (SOARES, 2013). Poucos possuem uma alta capacidade de tolerância a dessecação, como a espécie desértica *Tortula caninervis* (Mitt.) Broth. (Pottiaceae), que é capaz de permanecer a aproximadamente por 6 anos em -540 Mpa e ainda poder se recuperar com a reidratação (OLIVER et al., 2005). No mais, os danos causados pelo déficit hídrico às plantas podem ou não ser reversíveis irá depender do tempo de duração do estresse. Os mecanismos associados às plantas resistentes a dessecação são amplamente estudados a fim de, utilizar este conhecimento para melhorar a tolerância de espécies economicamente importantes.

1.3 Pigmentos fotossintetizantes

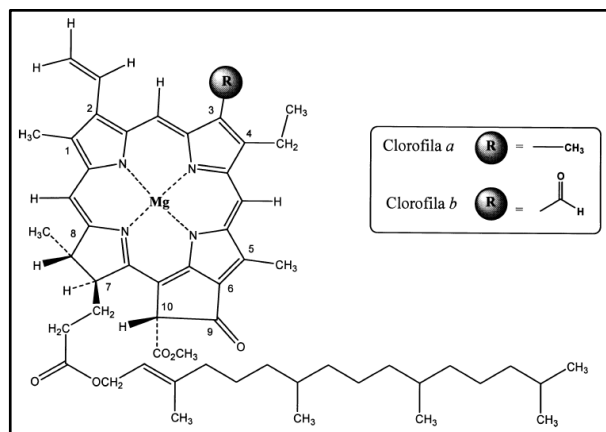
Na natureza existem vários tipos de clorofila com estruturas moleculares diferentes. A clorofila *a* está presente em todos os organismos fotossintetizantes e corresponde a 75% da pigmentação verde total. Outros tipos de clorofilas atuam como acessórios para absorção e/ou transferência de luz em outros comprimentos de onda para os centros de reação, como a clorofila *b*, também presente em vegetais terrestres, algas verdes e algumas bactérias, que atua em outro comprimento de luz para transferir a energia luminosa para a clorofila *a* realizar a fotossíntese e gerar energia (RAVEN, et al., 1996); a clorofila *c*, comum de diatomáceas e a clorofila *d*, em algas vermelhas (STREIT et al., 2005). Em relação às bactérias fotossintetizantes púrpuras e verdes, não ocorre a clorofila *a* para realizar fotossíntese e sim uma forma de bacterioclorofila e bioclorofilas (VON ELBE, 2000).

As clorofilas encontram-se em organelas chamadas de plastídeos, porém sua característica cor verde o faz serem conhecidos por cloroplastos, possuem dimensões de aproximadamente 7 µm de diâmetro por 3 µm de largura. Possuem duas membranas lipoprotéicas que controlam a saída e entrada de metabólitos. Em seu interior há o estroma composto por numerosas vesículas, os tilacóides, que também possuem revestimento por membrana e se arranjam em pilhas conhecidas como grana (BORRMAN, 2009; SINNECKER et al., 2002).

A produção de energia pela planta pode ocorrer na presença e/ou ausência de luz em reações fotoquímicas e bioquímicas. A clorofila e as enzimas necessárias para as reações luminosas encontram-se aderidas às membranas dos tilacóides através de proteínas e transformam a luz em duas formas de energia, ATP e NADPH, sendo o produto final o O_2 . Contudo, na falta ou presença de luz a reação que passa a ocorrer é a de fixação de carbono com as enzimas atuando no estroma e utilizando o ATP e NADPH para converter o CO_2 em energia, glicose (BORRMAN, 2009; GROSS, 1991; SINNECKER et al., 2002; STREIT et al., 2005). As clorofilas ligam-se à proteínas por ligações não covalentes e sempre estão acompanhadas de carotenoides (BORRMAN, 2009).

A estrutura molecular das clorofilas *a* e *b* são de alcoóis diterpenóides e ésteres com característica polar e lipofílica, enquanto o restante da molécula é hidrofílica (VON ELBE, 2000; SINNECKER et al., 2002). As proporções das duas clorofilas geralmente são de 3:1, porém difere de espécie para espécie (VON ELBE, 2000). A diferença molecular das duas clorofilas, visualizado na Figura 1, mostra que na *a* no anel de porfirina há um grupo radical de metil (-CH₃) enquanto que a *b* o radical é um grupo aldeído (-CHO) que lhe dá mais estabilidade devido aos elétrons do radical (VON ELBE, 2000). Pouco se sabe sobre a rota da biossíntese da clorofila *b* ou sobre suas proteínas envolvidas (TANAKA et al., 1998), porém muitos estudos estão sendo desenvolvidos, e, até o momento, descobriu-se que a oxidação do grupo metil para o grupo aldeído ocorre através da enzima clorofila *a* oxigenase (XU et al., 2001); enquanto, o processo inverso é realizado pela enzima clorofila *b* redutase (STREIT et al., 2005).

Figura 1 – Estrutura molecular da clorofila *a* e clorofila *b*.



Fonte: Streit et al., 2005.

Os carotenoides são pigmentos amarelos, laranjas e vermelhos, sendo encontrados em nos cloroplastos e cianobactérias (RAVEN et al., 1996), porém não são visíveis em parte das plantas devido a estes estarem mascarados pelo pigmento da clorofila. Somente quando a planta, devido a fatores ambientais e fisiológicos, perde clorofilas a pigmentação dos carotenoides pode ser visível. Por exemplo, em algumas espécies de plantas outonais ocorre a diminuição da clorofila para a senescência destas expondo os característicos tons vermelhos do outono.

A função dos carotenoides como pigmentos acessórios para as clorofilas é na captação de luz, como exemplo a luteína e a neoxantina. E sua função como fotoproteção nos tecidos vegetais é na inativação de espécies reativas de oxigênios (ROS) que são originados da reação do O₂ com a clorofila excitada. Para a planta os ROS representam muito perigo, pois os mesmo levam a oxidação das clorofilas gerando o branqueamento da planta (MANRIQUE, 2003).

Há duas classificações para os carotenoides: os primários que ocorrem nos tecidos verdes sendo então necessários para as reações fotossintéticas; e, os secundários, encontrados em frutas e flores (VON ELBE, 2000). Os primários ainda são divididos em duas categorias: os carotenos que não possuem oxigênio em sua composição e xantofilas que são oxigenadas (LICHTENTHALER, 1987; RAVEN et al., 1996; VON ELBE, 2000). Dentro da classificação dos carotenos, o α - caroteno, por exemplo, dá origem à luteína, considerada a principal xantofila nas plantas. Enquanto o β -caroteno, a forma de caroteno mais importante, origina as xantofilas zeaxantina, violaxantina e anteraxantina (MANRIQUE, 2003).

Estas xantofilas são componentes menores que os carotenos, porém de grande importância para regulação da atividade fotossintética nos tilacoides dos cloroplastos. Normalmente sua composição (% em peso) varia com β -caroteno de 25-40%, luteína, 40-57%, violaxantina, 9-20% e neoxantina, 5-13. E, em determinadas condições ambientais, como altas intensidades luminosas, levam as violaxantinas a serem oxidadas para anteraxantinas e zeaxantinas (LICHTENTHALER, 1987). Esta última dissipa a energia proveniente de uma clorofila excitada e este processo torna-se menos intenso com a diminuição da luminosidade (MANRIQUE, 2003).

Os pigmentos organizados no cloroplasto são oriundos do fotossistema, este possui dois sistemas: o centro de reação, onde há duas moléculas de clorofilas que atuam na fotossíntese e um complexo antena que por sua vez, possui carotenoides para atuarem como uma espécie de rede para captação de luz que a transfere para um centro de reação, posteriormente as moléculas de clorofila tornam-se carregadas (RAVEN et al., 1996).

1.4 Solventes

Para extração dos pigmentos, os solventes polares são mais eficazes (VON ELBE, 2000). Porém, de acordo com Santos et al. (2007), não há até o momento um protocolo estabelecido de extração de pigmentos em plantas cultivadas *in vitro*. Cita-se que essas culturas também estariam em condições estressantes como a alta umidade, altos níveis de nutrientes/hormônios, gases acumulados nos recipientes e ainda baixos níveis de radiação, o que leva a estas cultivares possuírem baixos níveis de clorofilas.

O solvente acetona 80% é um dos métodos de extração de pigmentos mais utilizados, porém mais aplicado para plantas *in vivo* (SANTOS et al. 2007), mas comum para estudos *in vitro* e briófitas (AROYEHUN & MAKINDE, 2016). Porém, é um método maçante e destrutivo, o qual envolve maceração e centrifugação (CRUZ et al., 2007). Portanto, o uso do dimetilsulfóxido (DMSO) pode vir a ser um método substituinte e não destrutivo apenas necessitando de uma imersão por x tempo e x temperatura (BARNES et al., 1992). Ambos os métodos geralmente são executados em conjunto no intuito de comparar suas eficiências na extração.

O DMSO é um solvente orgânico que permite uma alta difusão nas membranas semipermeáveis (RONEN & GALUN, 1984), pode ser aplicado em plantas dessecadas (ALPERT, 1984), tem rápida execução e capacidade de estabilização dos extratos quando estocados no escuro e frio (TAIT & HIK, 2003) a ± 4 °C, sendo ainda possível realizar leituras de absorvância até sete dias após a extração. Hiscox & Israelstam (1979) sugerem ser um método superior ao da acetona. Desta forma, vem sendo utilizado em plantas superiores (HISCOX & ISRAELSTAM, 1979; BARNES et al., 1992; TAIT & HIK, 2003), líquens (RONEN & GALUN, 1984; BARNES et al., 1992), musgos (ALPERT, 1984; AROYEHUN & MAKINDE, 2016).

O polietilenoglicol (PEG) é uma solução utilizada para reduzir a disponibilidade hídrica, ou seja, simular a seca para as plantas, sendo um agente osmótico e atóxico para as plantas. Ainda, Menezes et al. (2007) cita que a PEG possui moléculas grandes que não conseguem penetrar no tegumento das plantas. Em experimentos *in vitro*, Hohl & Scopfer (1991), observaram que as moléculas de PEG permanecem inertes e impermeáveis no meio. Sendo assim, é uma solução recomendada como indutora de déficit hídrico para estudo.

Dentro deste contexto, as briófitas vêm sendo estudadas devido seus grandes potenciais biotecnológicos, como para medição de poluentes de metais pesados, para análise da qualidade do ar, fonte de energia provindo de turfeiras, tecnologia biofotovoltaica e genes com potencial biotecnológico e efeito de chuva ácida (Makinde & Akande, 2012). Entretanto, pouco se compreende seus processos fisiológicos. Sabe-se que os musgos possuem capacidade de resiliência perante a dessecação, porém varia de espécie para espécie. Neste sentido os pigmentos fotossintéticos podem vir a ser um parâmetro para avaliação ambiental e biotecnológico visto que trazem informações a cerca da biologia do organismo. No caso, a espécie de musgo em estudo, *P. acutifolium*, ainda possui poucos estudos que propõem a analisar seus parâmetros fisiológicos quando submetido à estresse hídrico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta dos pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e *b* e carotenoide) da espécie de musgo *Physcomitrium acutifolium* Broth. (Funariaceae) sob dois tempos de estresse em diferentes regimes hídricos.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e comparar a eficiência entre os métodos de extração de pigmentos fotossintéticos com dimetilsulfóxido (DMSO) e acetona 80%;
- Avaliar a capacidade de armazenamento do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) comparando os valores da extração imediata (primeiro dia) com as leituras de três e sete dias posteriormente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

O experimento foi realizado no Laboratório do Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica - NEVA da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus São Gabriel,

São Gabriel, RS. A espécie vegetal do estudo, o musgo *Physcomitrium acutifolium* Broth. é cultivado em condições assépticas e mantido com recultivo a cada 30 dias em meio KNOP + Micronutrientes com pH ajustado para 5.8 em estufa BOD com fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro) a temperatura de $20 \pm 1,4$ °C.

3.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi casualizado em cinco condições hídricas com duas repetições técnicas contendo 15 explantes (gametófitos) cada sendo dividido em sete repetições biológicas. A indução do estresse hídrico foi realizada com as diferentes concentrações de Polietilenoglicol 6000 (PEG) de acordo com a Tabela 1 combinados com duas formas de tempo de duração do estresse hídrico, de 2 horas e de 24 horas. O experimento ocorreu em mesa agitadora (shaker) à 120 rpm com meio KNOP + Micronutrientes, pH 5.8, em estufa BOD com fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro) a temperatura de $20 \pm 1,4$ °C.

Tabela 1 – Especificação dos tratamentos utilizados quanto a concentração de Polietilenoglicol 6000 (PEG).

Tratamentos	Potencial Hídrico Ψ_w (Mpa)	Concentração PEG-6000 (g L ⁻¹)
1 (Controle)	0	0
2	-0.10	78,498
3	-0.20	119,57
4	-0.30	151,41
5	-0.40	178,34

Fonte: Adaptado de Meneses et al (2007)

3.3 Extração dos pigmentos fotossintetizantes

Para a extração com DMSO de acordo com o método de Shakya et al (2008) foi pesado 20 mg do musgo e inserido em um tubo falcon com adição 3 mL de DMSO. Cada tubo foi envolto em papel alumínio para evitar degradação dos pigmentos e, posteriormente incubados em banho-maria a 65 °C por 2 horas.

O método de extração com acetona 80% de Tait & Hik (2003) foi feito paralelamente com o método com DMSO. Para 20 mg de musgo adiciona-se 1 mL do solvente e realiza a

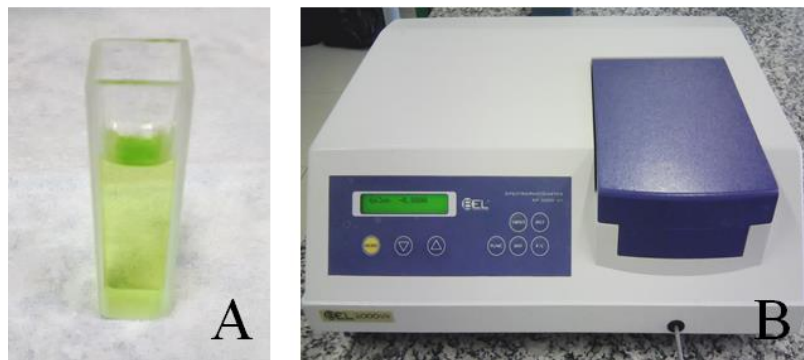
maceração com cadinho e pistilo, posteriormente completando o volume de solução final para 10 mL o transferindo para tubo falcon para centrifugar a 663 x g por 5 minutos.

3.4 Espectrofotometria

Após o período de incubação e centrifugação uma alíquota de 3 mL do extrato é transferido para uma cubeta de quartzo para leitura em espectrofotômetro (modelo SP 2000UV) como demonstra a Figura 2 nos comprimentos de 663, 645 e 470 para DMSO (mg/g FW) e, respectivamente 663.2, 646.8 e 470 para acetona 80% (ug/mol); correspondendo, respectivamente a clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides. A cada leitura realizava-se a leitura branca com respectivo solvente para maior aproximação dos valores.

As amostras com DMSO foram reservadas em refrigeração a 4 °C no escuro para prosseguir novamente com as leituras ao 3° e 7° dia após a extração. Estas eram descongeladas rapidamente e refrigeradas após cada leitura. Devido a acetona apresentar uma taxa de evaporação, sua leitura deve ocorrer de forma imediata, segundo a metodologia usada.

Figura 2 – A – Cubeta com mL de solvente; B – Espectrofotômetro SP 2000UV.



Fonte: autora.

3.5 Análises estatísticas

As concentrações absolutas dos pigmentos para DMSO foram determinadas de acordo com Alves et al. (2016), onde:

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg/g FW)} = \{ [(11,75 * A_{663}) - (2,35 * A_{645})] * 50 \} / 500$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg/g FW)} = \{ [(18,61 * A_{645}) - (3,96 * A_{663})] * 50 \} / 500$$

$$\text{Carotenóide (mg/g FW)} =$$

$$\{ [\{ [(1000 * A470) - (2,27 * \text{Clorofila a (valor)}) - (81,4 * \text{Clorofila b (valor)})] / 227 \}] * 50 \} / 500$$

Onde, A663 corresponde a absorvância a 663 nm; A645 a 645 nm e A470 a 470 nm.

E para acetona 80%, de acordo com Lichtenthaler & Buschamm (2001):

$$\text{Clorofila } a \text{ (ug/mol)} = 12.25 * A663.2 - 2.89 A646.8$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (ug/mol)} = 21.50 * A646.8 - 5.10 * A663.2$$

$$\text{Carotenóide (ug/mol)} = (1000 * A470 - 1.82 C_a - 85.02 C_b) / 198$$

Onde, A663.2 corresponde a absorvância a 663 nm; A646.8 a 645 nm e A470 a 470 nm.

Os dados foram submetidos à ANOVA realizando teste t-Student e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro ($p \leq 0,05$) no software RStudio (2018).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Analisando-se os dados, são visíveis os efeitos da simulação de potencial hídrico com PEG. O método de acetona 80% expressa diferenças significativas em ambos os tempos de duração de estresse no tratamento mais extremo em comparação com o tratamento controle, no caso o P5 (-0.40 Mpa), apresentando maior presença dos pigmentos em 2 horas e, em contrapartida menos em 24 horas (Tabela 2). Porém, observa-se na Figura 3 que este método exibiu desvio padrão em todos os extratos, enquanto que o método DMSO, embora não expressou diferenças estatísticas, proporcionou valores mais estáveis.

Tabela 2 – Valores Teste de Tukey a 5% de probabilidade para método de acetona 80%. P= Tratamento. Valores seguidos de mesma letra, nas colunas para cada comprimento de onda, não apresentam diferença estatística.

P	Acetona 80%					
	2 horas			24 horas		
	663.2	646.8	470	663.2	646.8	470
P1	0,983c	0,569b	0,554b	1,542a	1,109a	0,841a
P2	1,122bc	0,633b	0,587b	1,545a	1,061a	0,876a
P3	1,319b	0,827ab	0,705b	1,307ab	0,818ab	0,743ab
P4	1,264bc	0,757b	0,621b	1,076b	0,696ab	0,584bc
P5	1,784a	1,087a	0,887a	0,986b	0,472b	0,492c

Fonte: autora.

Entretanto, como consta na Tabela 3, o método com DMSO além de apresentar valores significativamente menores em comparação com a acetona 80%, apenas expressou diferença estatística no tempo de 24 horas para a clorofila *a* (663). Ao contrário dos autores que constataram que o DMSO demonstrou melhores valores como Alpert (1984), Aroyehun & Makinde (2016), Cruz et al., (2007), Hiscox & Israelstam (1979) e Barnes et al. (1992) que sugere a técnica para estudos com líquens, Tait & Hik (2003) citam que para seus macerados de *Cymbopogon citrates* o método de DMSO com incubação à 65 °C também evidenciou valores inferiores da acetona 80%, porém não significativamente, ou seja, os valores de absorvância dependem da temperatura de incubação.

Tabela 3 - Valores Teste de Tukey a 5% de probabilidade para método de DMSO. P= Tratamento. Valores seguidos de mesma letra, nas colunas para cada comprimento de onda, não apresentam diferença estatística.

P	DMSO					
	2 horas			24 horas		
	663	645	470	663	645	470
P1	0,389a	0,104a	0,164a	0,402ab	0,117a	0,179ab
P2	0,366a	0,105a	0,153a	0,508a	0,114a	0,210a
P3	0,389a	0,114a	0,156a	0,412ab	0,113a	0,180ab
P4	0,431a	0,115a	0,170a	0,405ab	0,107a	0,162bc
P5	0,454a	0,126a	0,181a	0,326b	0,079a	0,132c

Fonte: autora.

Contudo, observando a Figura 3, mesmo que os métodos proporcionem diferenças significativas, a imagem demonstra que os valores expressam uma similaridade comportamental em todos os comprimentos de onda (663, 645, 470) condizendo com as condições hídricas.

Em geral, os musgos podem suportar períodos curtos de estresse hídrico como de -20 a -40 Mpa (OLIVER et al., 2005). O *P. acutifolium* demonstrou resiliência aumentando a expressão de todos os pigmentos no 5º tratamento hídrico de duração de 2 horas, porém no estresse de 24 horas, o mesmo apontou um decréscimo. Ou seja, ao período de 24 horas o tratamento mais extremo de -0.40 Mpa mostrou-se ser limitante para a capacidade fotossintética do musgo, pois de acordo com Aroyehun & Makinde (2016), a deficiência hídrica é um fator determinante na redução fotossintética levando a um rompimento dos

lipídios do cloroplasto (GUSHINA et al., 2002). Quando ocorre a dessecação em espécies tolerantes, como *Tortula ruralis* (Hedw.) G. Gaertn., B. Mey. & Scherb., os cloroplastos e as mitocôndrias se incham separando suas membranas externas dos tilacóides, no caso os cloroplastos, e das membranas internas ou crista, das mitocôndrias, se descompactando. Entretanto a extensão deste dano depende do tempo de dessecação, ou seja, quando mais rápidos mais danos ocorrem (OLIVER et al., 2005).

A adjacente diminuição dos carotenoides corrobora por serem pigmentos acessórios que sempre estão aderidos às clorofilas *a* lhes dando fotoproteção, isto é, inativa os oxigênios originados nos centros de reação que se tornam espécies reativas de oxigênios (ROS), tóxicos para as plantas, pois leva as clorofilas a oxidarem e, posteriormente ocorrer o amarelamento (clorose) das mesmas (MANRIQUE, 2003). Alguns estudos utilizam o hormônio vegetal ácido abscísico (ABA) por ser essencial para a tolerância da planta ao estresse hídrico, pois este ativa via de transdução de sinal que reduzem a formação de ROS. GUSHINA et al. (2002) menciona que duas plantas, *Corchorus capsularis* L. e *Corchorus olitorius* L., tiveram suas folhas pulverizadas de ABA durante o estresse hídrico e acabou aumentando a ação de enzimas redutoras de ROS.

Em outro estudo, Dhindsa & Bewley (1977) observaram que o efeito do déficit hídrico em musgos sensíveis inibia a síntese protéica, ao contrário dos musgos não-sensíveis. A síntese proteica para reidratação de um musgo dessecado deve ocorrer em luz, como finalidade de reparar dano foto-oxidativo. Porém, a assimilação do CO₂ requer uma síntese de proteínas, e acreditava-se que esta era de suma necessidade para recuperar-se da desidratação. Bewley (1979) também cita que o estresse provoca oxidação da enzima NADP + GAPDH o que acarreta na diminuição da capacidade fotossintética. No caso, um estudo de Oliver et al. (2005) desenvolvido com *Tortula ruralis* desidratado, concluiu que a síntese proteica é em parte necessária para recuperação fotossintética.

Seguindo a metodologia de Tait & Hik (2003), era indicado para o descongelamento uma temperatura de ~20 °C, porém o mesmo cita que em seus extratos ocorreram diminuição dos valores a cada descongelamento. Já no presente trabalho, observou-se um aumento gradativo do primeiro ao sétimo dia de mensuração. Ainda assim, a avaliação das leituras do 1º, 3º e 7º não obtiveram diferenças significativas no estresse de 24 horas, exceto o comprimento de onda 645 do dia 1 (Tabela 4), corroborando com Barnes et al. (1992), Hiscox e Israelstam (1979) e Alpert (1984) que também observaram uma estabilização ao 7º dia. No caso, o acréscimo dos valores provavelmente são consequências das etapas de

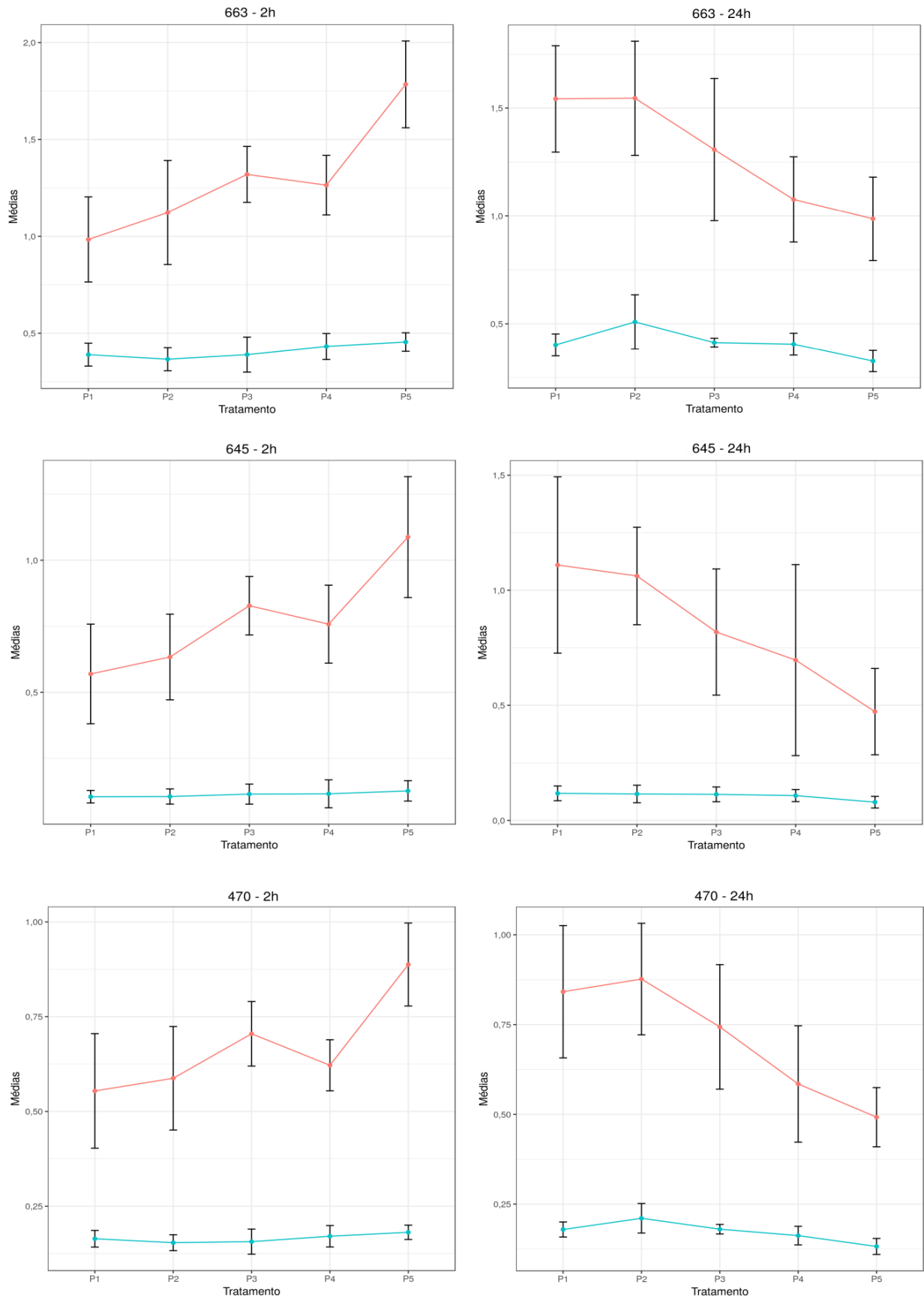
descongelamento e congelamento (TAIT & HIK, 2003). Havendo indicativos de que ao descongelar a determinada temperatura, provavelmente o DMSO se aquece e volta a extrair resquícios de pigmentos dos gametófitos, antes congelados. Com isso, ainda sugere-se estudar um tempo de incubação superior à 2 horas, a fim de comparar se o valores mensurados obterão diferença estatística perante às extrações anteriores.

Tabela 4 – Valores Teste de Tukey a 5% de probabilidade para leituras do 1º, 3º e 7º dia do método DMSO. Valores seguidos de mesma letra não apresentam diferenças estatísticas. P- Tratamento.

Dia	P	2 horas			24 horas		
		663	645	470	663	645	470
1	P1	0,389	0,104	0,164	0,402	0,117	0,179
		a	a	a	ab	a	ab
	P2	0,366	0,105	0,153	0,508	0,114	0,210
		a	a	a	a	a	a
	P3	0,389	0,114	0,156	0,412	0,113	0,180
a		a	a	ab	a	ab	
P4	0,431	0,115	0,170	0,405	0,107	0,162	
	a	a	a	ab	a	bc	
P5	0,454	0,126	0,181	0,326	0,079	0,132	
	a	a	a	b	a	c	
3	P1	0,373	0,109	0,163	0,420	0,160	0,190
		b	a	a	bc	ab	ab
	P2	0,370	0,113	0,155	0,526	0,171	0,218
		b	a	a	a	a	a
	P3	0,385	0,112	0,155	0,444	0,163	0,191
ab		a	a	b	a	ab	
P4	0,432	0,109	0,174	0,432	0,139	0,167	
	ab	a	a	bc	ab	bc	
P5	0,471	0,124	0,188	0,355	0,115	0,147	
	a	a	a	c	b	c	
7	P1	0,373	0,109	0,163	0,420	0,171	0,190
		b	a	a	bc	a	ab
	P2	0,370	0,113	0,155	0,526	0,163	0,218
		b	a	a	a	a	a
	P3	0,385	0,112	0,155	0,444	0,160	0,191
ab		a	a	b	ab	ab	
P4	0,432	0,109	0,174	0,432	0,139	0,167	
	ab	a	a	bc	ab	bc	
P5	0,471	0,124	0,188	0,355	0,115	0,147	
	a	a	a	c	b	c	

Fonte: autora.

Figura 3 – Valores da absorvância da clorofila *a* (663), clorofila *b* (645) e carotenoide (470) em função das cinco condições hídricas. Linha vermelha = acetona 80%; Linha azul = DMSO; Linha vertical equivale ao desvio padrão.



Fonte: Adriano L. Schünemann

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando as condições experimentais e os reagentes utilizados no presente trabalho, foi observado que o método de acetona 80% apresentou os maiores valores de extração, expressando diferenças estatísticas no estresse hídrico de 2 horas e 24 horas, principalmente no tratamento simulando o maior déficit hídrico (P5, -0.40 Mpa) em comparação com o controle (P1), porém exibindo certo desvio padrão. Em contrapartida, o método de DMSO apenas exibiu diferença estatística no tempo de estresse de 24 horas para a clorofila *a* (663), contudo proporcionou valores mais estáveis. Analisando a eficiência de ambos os métodos, constata-se que para o presente estudo o método de acetona 80% foi mais eficiente devido este trazer maiores valores de extração e demonstrar diferenças significativas. Contudo, salienta-se que a escolha do método de extração de pigmentos deve-se basear na necessidade da forma do estudo e nas características da espécie em estudo, pois algumas podem carecer de maceração ou a temperatura combinada com o tempo correto para a extração de pigmentos.

No geral, os pigmentos obtiveram um comportamento semelhante, onde, no tempo de estresse de duas horas no P5 houve um aumento dos valores dos mesmos; em contrapartida, esses diminuem no tempo de 24 horas sob estresse hídrico.

As leituras do método com DMSO nos dias 1, 3 e 7 não apresentaram diferença estatística, exceto o comprimento de onda 645 do dia 1. Todavia, os valores analisados apresentaram numericamente valores aleatórios entre os dias, onde, em alguns comprimentos de ondas obteve-se um acréscimo nos valores e outros um decréscimo. Desta forma, constata-se que o processo de descongelamento e congelamento possa influenciar no solvente DMSO e passando a extrair mais clorofila dos gametófitos.

O musgo *Physcomitrium acutifolium* Broth. demonstrou possuir resiliência perante as condições hídricas, principalmente na condição mais extrema, no caso o P5 (-0.40 Mpa), apenas nas primeiras 2 horas, mostrando-se suscetível ao estresse após de 24 horas de déficit hídrico induzido não apresentando diferenças morfológicas. Sendo assim, este estudo apresenta informações fisiológicas novas para esta espécie de musgo que pode vir a se desenvolver como uma espécie modelo de estudos.

REFERÊNCIAS

- ALPERT, P. Analysis of chlorophyll content in mosses through extraction in DMSO. **Bryologist**, p. 363-365, 1984.
- AROYEHUN, F. S., & MAKINDE, A. M. Comparative Extraction of Chlorophylls in Selected Forest and Savanna Mosses Using Dimethylsulphoxide and Acetone. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 8, n. 3, p. 347-353, 2016.
- BARNES, J.D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S.; DAVISON, A.W. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls *a* and *b* in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, 32: 85-100.
- BELO, E. DOS S. Efeito do estresse hídrico no metabolismo de gabirobeira. 2012.
- BEWLEY, J. D. Physiological aspects of desiccation tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 30, n. 1, p. 195-238, 1979.
- BORRMANN, D. **Efeito do déficit hídrico em características químicas e bioquímicas da soja e na degradação da clorofila, com ênfase na formação de metabólitos incolores**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- CHARRON, A. J.; QUATRANO, Ralph S. Between a rock and a dry place: the water-stressed moss. **Molecular Plant**, v. 2, n. 3, p. 478-486, 2009.
- COSTA, D. P. D.; CÂMARA, P. E. A. S.; PÔRTO, K. C.; LUIZI-PONZO, A. P., & ILKIUBORGES, A. L. **Briófitas**. Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2012.
- CRUZ, A. C. F. Métodos comparativos na extração de pigmentos foliares de três híbridos de *Bixa orellana* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 777-779, 2007.
- DA COSTA, D. P.; IMBASSAHY, C. A. A.; DA SILVA, V. P. A. Diversidade e importância das espécies de briófitas na conservação dos ecossistemas do estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, p. 13-49, 2005.
- DE CARVALHO, L. M., CASALI, V. W. D., DE SOUZA, M. A., & CECON, P. R. Disponibilidade de água no solo e crescimento de artemísia. **Hortic. bras**, v. 21, n. 4, 2003.
- DHINDSA, R. S.; BEWLEY, J. D. Water stress and protein synthesis: V. protein synthesis, protein stability, and membrane permeability in a drought-sensitive and a drought-tolerant Moss. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 295-300, 1977.
- GROSS, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**. New York: Van Nostrand Reinhold, 351p, 1991.
- GUSCHINA, I. A., HARWOOD, J. L., SMITH, M., & BECKETT, R. P.. Abscisic acid modifies the changes in lipids brought about by water stress in the moss *Atrichum androgynum*. **New Phytologist**, v. 156, n. 2, p. 255-264, 2002.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian journal of botany**, v. 57, n. 12, p. 1332-1334, 1979.

HOHL, M.; SCHOPFER, P. Water relations of growing maize coleoptiles: comparison between mannitol and polyethylene glycol 6000 as external osmotica for adjusting turgor pressure. **Plant Physiology**, v. 95, n. 3, p. 716-722, 1991.

JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F., & DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal-: Um Enfoque Filogenético**. Artmed Editora. 2009.

KÜRSCHNER, H.; GHAZANFAR, S. A. Bryophytes and lichens. In: **Vegetation of the Arabian Peninsula**. Springer, Dordrecht, 1998. p. 99-124.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, 2001.

LICHTENTHALER, Hartmut K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 350-382, 1987.

LLERAS, E. Estômatos em Briófitas e Pteridófitas. Alguns conceitos gerais. **Acta Amazonica**, v. 7, n. 2, p. 199-207, 1977.

MAKINDE, A. M.; AKANDE, F. I. Effects of lead and simulated acid rain on chlorophyll contents of selected tropical mosses. **Ife Journal of Science**, v. 14, n. 2, p. 309-313, 2012.

MANRIQUE, E. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz. **Ecosistemas**, v. 12, n. 1, 2003.

MENESES, C. H. S. G.; LIMA, L. D. M.; LIMA, M. D. A., PEREIRA, W.; BRUNO, R. & VIDAL, M. Potencial hídrico induzido por polietilenoglicol-6000 na viabilidade de sementes de algodão. **Embrapa Algodão-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**. 2007.

OLIVER, M. J.; VELTEN, J. E. F. F.; MISHLER, B. D. Desiccation tolerance in bryophytes: a reflection of the primitive strategy for plant survival in dehydrating habitats?. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 5, p. 788-799, 2005.

R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 5^a. ed. Coord. Trad. J.E.Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1996.

RONEN, R.; GALUN, M. Pigment extraction from liquens with dimethylsulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. **Environmental and Experimental Botany**, 24: 239-245, 1984.

SANTOS, D. B. DOS, FERREIRA, P. A, OLIVEIRA, F. G. DE, BATISTA, R. O., COSTA, A., & CANO, M. A. O. Produção e parâmetros fisiológicos do amendoim em função do estresse salino. **Idesia (Arica)**, 30(2), 69-74, 2012.

SANTOS, R. P., DA CRUZ, A. C. F., IAREMA, L., FERNANDES, K. R. G., KUKI, K. N., & OTONI, W. C.. Avaliação da eficiência do dimetilsulfóxido na extração de pigmentos foliares de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia* propagadas in vitro. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 888-890, 2007.

SHAKYA, K.; CHETTRI, M. K.; SAWIDIS, T. Impact of heavy metals (copper, zinc, and lead) on the chlorophyll content of some mosses. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 3, p. 412-421, 2008.

SILVEIRA, J. A. G., ARAÚJO, S. A. M., LIMA, J. P. M. S., & VIÉGAS, R. A. Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, n. 1, p. 1-8, 2009.

SINNECKER, P., GOMES, M.S.O., ARÊAS, A.G., LANFER-MARQUEZ, U.M. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds during ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3961-3966, 2002.

SOARES, C. Q. G. Efeito do estresse hídrico na expressão de proteínas em duas variedades de soja contrastantes para o conteúdo de óleo e proteína. 2013. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P., CANTO, M. W. D., & HECKTHEUER, L. H. H. The chlorophylls. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

TAIT, M. A.; HIK, D. S. Is dimethylsulfoxide a reliable solvent for extracting chlorophyll under field conditions?. **Photosynthesis research**, v. 78, n. 1, p. 87-91, 2003.

TANAKA, A. et al. Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*. **Plant Biology**, v.95, p.12719-12723, 1998.

VON ELBE J.H. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza : Wisconsin - Madison, Cap.10, p.782-799, 2000.

XU, H.; VAVILIN, D. & VERMAAS, W. Chlorophyll *b* can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.24, november, 2001.

ANEXOS

ANEXO A

O script gerado no software RStudio é o mesmo utilizado para os três comprimentos de onda analisados. Para isso substitui-se na entrada o 470 por 645 e depois por 663, gerando 3 scripts, um para cada comprimento.

```
#####
##          PPGCB - UNIPAMPA          ##
#####
##    UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA    ##
#####
##    Script Clorofila 3 Dias          ##
#####
## Elaborado por:                      ##
## Adriano luis Schünemann - als@unipampa.edu.br ##
## Mariele -                            ##
## Data: dezembro de 2018              ##
#####
##### Escolhendo o diretorio #####

pasta <
"/home/adriano/Dropbox/Adriano/Unipampa_2018/Pesquisa_2018/Mariele/Mari_3/D1_3_7"
setwd(pasta)
getwd()

options(OutDec = ",")
##### Carregar os pacotes #####
pkg <- c("gdata","ggplot2","agricolae","dplyr", "car", "corrplot", "tidyr")
sapply(pkg, require, character.only=TRUE)

##### Carregar os dados #####
```

```

lf <- list.files(getwd(), pattern = ".csv")
lf

##### Criando a tabela #####
dados <- read.csv(lf[1], header = TRUE, sep = ";", dec = ",")
summary(dados)

# Corrigindo um problema
dados$COMPRIMENTO[dados$COMPRIMENTO == 646] <- 645
boxplot(dados[1])

#####

### Organizando os dados

df_470 <- as.data.frame(dados %>% filter(COMPRIMENTO== 470))

# Dia 1 - df 2h e dm
df_D1_470_2_dm <- as.data.frame(df_470 %>% filter(ESTRESSE== "2 horas")
                               %>% filter(METODO == "DMSO")
                               %>% filter(DIA == 1))
shp_D1_df_470_2_dm <- shapiro.test(df_D1_470_2_dm[,1])
if (shp_D1_df_470_2_dm$p.value > 0.05) {print("NORMAL")} else { print("NÃO
NORMAL")}

# df 24h e dm
df_D1_470_24_dm <- as.data.frame(df_470 %>% filter(ESTRESSE== "24 horas")
                               %>% filter(METODO == "DMSO")
                               %>% filter(DIA == 1))
shp_D1_df_470_24_dm <- shapiro.test(df_D1_470_24_dm[,1])
if (shp_D1_df_470_24_dm$p.value > 0.05) {print("NORMAL")} else { print("NÃO
NORMAL")}

# Dia 3 - df 2h e dm
df_D3_470_2_dm <- as.data.frame(df_470 %>% filter(ESTRESSE== "2 horas")

```

```

    %>% filter(METODO == "DMSO")
    %>% filter(DIA == 3))
shp_D3_df_470_2_dm <- shapiro.test(df_D3_470_2_dm[,1])
if (shp_D3_df_470_2_dm$p.value > 0.05) {print("NORMAL")} else { print("NÃO
NORMAL")}

# df 24h e dm
df_D3_470_24_dm <- as.data.frame(df_470 %>% filter(ESTRESSE== "24 horas")
    %>% filter(METODO == "DMSO")
    %>% filter(DIA == 3))
shp_D3_df_470_24_dm <- shapiro.test(df_D3_470_24_dm[,1])
if (shp_D3_df_470_24_dm$p.value > 0.05) {print("NORMAL")} else { print("NÃO
NORMAL")}

# Dia 7 - df 2h e dm
df_D7_470_2_dm <- as.data.frame(df_470 %>% filter(ESTRESSE== "2 horas")
    %>% filter(METODO == "DMSO")
    %>% filter(DIA == 3))
shp_D7_df_470_2_dm <- shapiro.test(df_D7_470_2_dm[,1])
if (shp_D7_df_470_2_dm$p.value > 0.05) {print("NORMAL")} else { print("NÃO
NORMAL")}

# df 24h e dm
df_D7_470_24_dm <- as.data.frame(df_470 %>% filter(ESTRESSE== "24 horas")
    %>% filter(METODO == "DMSO")
    %>% filter(DIA == 3))
shp_D7_df_470_24_dm <- shapiro.test(df_D7_470_24_dm[,1])
if (shp_D7_df_470_24_dm$p.value > 0.05) {print("NORMAL")} else { print("NÃO
NORMAL")}

#####
### Fazendo ANOVA e tukey
####

```

```

# ANOVA D1 df 2h e dm
anova_D1_470_2_dm <- aov(LEITURA ~ TRATAMENTO, data = df_D1_470_2_dm)
summary(anova_D1_470_2_dm)

# Tukey df 2h e dm
tk_D1_T_470_2_dm <- HSD.test(anova_D1_470_2_dm, "TRATAMENTO")
tk_D1_T_470_2_dm_tabela <- as.data.frame(tk_D1_T_470_2_dm$groups)
tk_D1_T_470_2_dm_tabela
colnames(tk_D1_T_470_2_dm_tabela) <- c("Médias","Grupos")

####

# ANOVA D1 df 24h e dm
anova_D1_470_24_dm <- aov(LEITURA ~ TRATAMENTO, data = df_D1_470_24_dm)
summary(anova_D1_470_24_dm)

# Tukey df 24h e dm
tk_D1_T_470_24_dm <- HSD.test(anova_D1_470_24_dm, "TRATAMENTO")
tk_D1_T_470_24_dm_tabela <- as.data.frame(tk_D1_T_470_24_dm$groups)
tk_D1_T_470_24_dm_tabela
colnames(tk_D1_T_470_24_dm_tabela) <- c("Médias","Grupos")

#####

### Fazendo ANOVA e tukey

####

# ANOVA D3 df 2h e dm
anova_D3_470_2_dm <- aov(LEITURA ~ TRATAMENTO, data = df_D3_470_2_dm)
summary(anova_D3_470_2_dm)

# Tukey df 2h e dm
tk_D3_T_470_2_dm <- HSD.test(anova_D3_470_2_dm, "TRATAMENTO")
tk_D3_T_470_2_dm_tabela <- as.data.frame(tk_D3_T_470_2_dm$groups)
tk_D3_T_470_2_dm_tabela
colnames(tk_D3_T_470_2_dm_tabela) <- c("Médias","Grupos")

```



```

####
# ANOVA D3 df 24h e dm
anova_D3_470_24_dm <- aov(LEITURA ~ TRATAMENTO, data = df_D3_470_24_dm)
summary(anova_D3_470_24_dm)

# Tukey df 24h e dm
tk_D3_T_470_24_dm <- HSD.test(anova_D3_470_24_dm, "TRATAMENTO")
tk_D3_T_470_24_dm_tabela <- as.data.frame(tk_D3_T_470_24_dm$groups)
tk_D3_T_470_24_dm_tabela
colnames(tk_D3_T_470_24_dm_tabela) <- c("Médias", "Grupos")

#####

### Fazendo ANOVA e tukey
####
# ANOVA D7 df 2h e dm
anova_D7_470_2_dm <- aov(LEITURA ~ TRATAMENTO, data = df_D7_470_2_dm)
summary(anova_D7_470_2_dm)

# Tukey df 2h e dm
tk_D7_T_470_2_dm <- HSD.test(anova_D7_470_2_dm, "TRATAMENTO")
tk_D7_T_470_2_dm_tabela <- as.data.frame(tk_D7_T_470_2_dm$groups)
tk_D7_T_470_2_dm_tabela
colnames(tk_D7_T_470_2_dm_tabela) <- c("Médias", "Grupos")

####
# ANOVA D7 df 24h e dm
anova_D7_470_24_dm <- aov(LEITURA ~ TRATAMENTO, data = df_D7_470_24_dm)
summary(anova_D7_470_24_dm)

# Tukey df 24h e dm
tk_D7_T_470_24_dm <- HSD.test(anova_D7_470_24_dm, "TRATAMENTO")
tk_D7_T_470_24_dm_tabela <- as.data.frame(tk_D7_T_470_24_dm$groups)
tk_D7_T_470_24_dm_tabela
colnames(tk_D7_T_470_24_dm_tabela) <- c("Médias", "Grupos")

```

```
#####
### Primeiros resultados
## Gravando os resultados
sink("./resultados_novo/Resultados_Mariele_Ultimo_470_DMSO_NOVO_A.txt",
type="output", append=F)
cat("-----", "\n",
    "-----", "\n",
    "Resultado da ANOVA para 470 Dia 1 - 2 horas - DMSO:", "\n",
    "-----", "\n",
    fill=F)
summary(anova_D1_470_2_dm)
cat("-----", "\n",
    "Teste de Tukey para 470 Dia 1 - 2 horas - DMSO:", "\n",
    "-----", "\n",
    fill=F)
tk_D1_T_470_2_dm_tabela
cat("-----", "\n",
    "-----", "\n",
    "Resultado da ANOVA para 470 Dia 1 - 24 horas - DMSO:", "\n",
    "-----", "\n",
    fill=F)
summary(anova_D1_470_24_dm)
cat("-----", "\n",
    "Teste de Tukey para 470 Dia 1 - 24 horas - DMSO:", "\n",
    "-----", "\n",
    fill=F)
tk_D1_T_470_24_dm_tabela

cat("-----", "\n",
    "-----", "\n",
    "Resultado da ANOVA para 470 Dia 3 - 2 horas - DMSO:", "\n",
    "-----", "\n",
```

```

fill=F)
summary(anova_D3_470_2_dm)
cat("-----", "\n",
    "Teste de Tukey para 470 Dia 3 - 2 horas - DMSO:", "\n",
    "-----", "\n",
    fill=F)
tk_D3_T_470_2_dm_tabela
cat("-----", "\n",
    "-----", "\n",
    "Resultado da ANOVA para 470 Dia 3 - 24 horas - DMSO:", "\n",
    "-----", "\n",
    fill=F)
summary(anova_D3_470_24_dm)
cat("-----", "\n",
    "Teste de Tukey para 470 Dia 3 - 24 horas - DMSO:", "\n",
    "-----", "\n",
    fill=F)
tk_D3_T_470_24_dm_tabela

cat("-----", "\n",
    "-----", "\n",
    "Resultado da ANOVA para 470 Dia 7 - 2 horas - DMSO:", "\n",
    "-----", "\n",
    fill=F)
summary(anova_D7_470_2_dm)
cat("-----", "\n",
    "Teste de Tukey para 470 Dia 7 - 2 horas - DMSO:", "\n",
    "-----", "\n",
    fill=F)
tk_D7_T_470_2_dm_tabela
cat("-----", "\n",
    "-----", "\n",
    "Resultado da ANOVA para 470 Dia 7 - 24 horas - DMSO:", "\n",

```

```

"-----","\n",
fill=F)
summary(anova_D7_470_24_dm)
cat("-----","\n",
"Teste de Tukey para 470 Dia 7 - 24 horas - DMSO:", "\n",
"-----","\n",
fill=F)
tk_D7_T_470_24_dm_tabela

sink()

#####
### Alguns graficos
trat <- as.character(unique(df_470_24_ac[,2]))
analises <- c("mean_df_470_2_ac", "mean_df_470_2_dm", "mean_df_470_24_ac",
"mean_df_470_24_dm")

### Médias
mean_df_470_2_ac <- as.data.frame(df_470_2_ac %>% group_by(TRATAMENTO) %>%
summarise(mean=mean(LEITURA),sd=sd(LEITURA)) )
mean_df_470_2_ac[,4] <- c("2h")
mean_df_470_2_ac[,5] <- c("ACETONA 80%")
colnames(mean_df_470_2_ac) <- c("TRATAMENTO", "mean", "sd", "ESTRESSE",
"METODO")

mean_df_470_2_dm <- as.data.frame(df_470_2_dm %>% group_by(TRATAMENTO) %>%
summarise(mean=mean(LEITURA),sd=sd(LEITURA)) )
mean_df_470_2_dm[,4] <- c("2h")
mean_df_470_2_dm[,5] <- c("DMSO")
colnames(mean_df_470_2_dm) <- c("TRATAMENTO", "mean", "sd", "ESTRESSE",
"METODO")

mean_df_470_24_ac <- as.data.frame(df_470_24_ac %>% group_by(TRATAMENTO) %>%
summarise(mean=mean(LEITURA),sd=sd(LEITURA)) )

```

```

mean_df_470_24_ac[,4] <- c("24h")
mean_df_470_24_ac[,5] <- c("ACETONA 80%")
colnames(mean_df_470_24_ac) <- c("TRATAMENTO", "mean", "sd", "ESTRESSE",
"METODO")

mean_df_470_24_dm <- as.data.frame(df_470_24_dm %>% group_by(TRATAMENTO)
%>%
summarise(mean=mean(LEITURA),sd=sd(LEITURA)) )
mean_df_470_24_dm[,4] <- c("24h")
mean_df_470_24_dm[,5] <- c("DMSO")
colnames(mean_df_470_24_dm) <- c("TRATAMENTO", "mean", "sd", "ESTRESSE",
"METODO")

mean_df_470_2h <- rbind(mean_df_470_2_ac, mean_df_470_2_dm)
mean_df_470_24h <- rbind(mean_df_470_24_ac, mean_df_470_24_dm)

# ggplot pontos e linhas com desvios - mean_df_470_2_ac
ggplot(mean_df_470_2h, aes(x=TRATAMENTO, y=mean, group = METODO)) +
  geom_errorbar(aes(ymin=mean-sd, ymax=mean+sd), width=.1) +
  geom_line(aes(colour = METODO)) +
  geom_point(aes(colour = METODO)) +
  theme_bw() +
  ggtitle(" GRAFICO 470 - 2h ") +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5)) +
  labs(x = "Tratamento", y = "Médias") +
  ggsave("Grafico_NOVO_470_2h.tiff", width = 190, height = 150, units = "mm", dpi = 300)

# ggplot pontos e linhas com desvios - mean_df_470_24_ac
ggplot(mean_df_470_24h, aes(x=TRATAMENTO, y=mean, group = METODO)) +
  geom_errorbar(aes(ymin=mean-sd, ymax=mean+sd), width=.1) +
  geom_line(aes(colour = METODO)) +
  geom_point(aes(colour = METODO)) +
  theme_bw() +
  ggtitle(" GRAFICO 470 - 24h ") +

```

```

theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5)) +
labs(x = "Tratamento", y = "Médias") +
ggsave("Grafico_NOVO_470_24h.tiff", width = 190, height = 150, units = "mm", dpi =
300)

```

```
#####
```

```
### Teste t para a par
```

```
## ac - 2 - P1
```

```

df_470_2_ac_P1 <- as.data.frame(df_470_2_ac %>% filter(TRATAMENTO == "P1") )
df_470_2_ac_P2 <- as.data.frame(df_470_2_ac %>% filter(TRATAMENTO == "P2") )
df_470_2_ac_P3 <- as.data.frame(df_470_2_ac %>% filter(TRATAMENTO == "P3") )
df_470_2_ac_P4 <- as.data.frame(df_470_2_ac %>% filter(TRATAMENTO == "P4") )
df_470_2_ac_P5 <- as.data.frame(df_470_2_ac %>% filter(TRATAMENTO == "P5") )

```

```
## dm - 2 - P1
```

```

df_470_2_dm_P1 <- as.data.frame(df_470_2_dm %>% filter(TRATAMENTO == "P1") )
df_470_2_dm_P2 <- as.data.frame(df_470_2_dm %>% filter(TRATAMENTO == "P2") )
df_470_2_dm_P3 <- as.data.frame(df_470_2_dm %>% filter(TRATAMENTO == "P3") )
df_470_2_dm_P4 <- as.data.frame(df_470_2_dm %>% filter(TRATAMENTO == "P4") )
df_470_2_dm_P5 <- as.data.frame(df_470_2_dm %>% filter(TRATAMENTO == "P5") )

```

```
## ac - 24 - P1
```

```

df_470_24_ac_P1 <- as.data.frame(df_470_24_ac %>% filter(TRATAMENTO == "P1") )
df_470_24_ac_P2 <- as.data.frame(df_470_24_ac %>% filter(TRATAMENTO == "P2") )
df_470_24_ac_P3 <- as.data.frame(df_470_24_ac %>% filter(TRATAMENTO == "P3") )
df_470_24_ac_P4 <- as.data.frame(df_470_24_ac %>% filter(TRATAMENTO == "P4") )
df_470_24_ac_P5 <- as.data.frame(df_470_24_ac %>% filter(TRATAMENTO == "P5") )

```

```
## dm - 24 - P1
```

```

df_470_24_dm_P1 <- as.data.frame(df_470_24_dm %>% filter(TRATAMENTO == "P1") )
df_470_24_dm_P2 <- as.data.frame(df_470_24_dm %>% filter(TRATAMENTO == "P2") )
df_470_24_dm_P3 <- as.data.frame(df_470_24_dm %>% filter(TRATAMENTO == "P3") )
df_470_24_dm_P4 <- as.data.frame(df_470_24_dm %>% filter(TRATAMENTO == "P4") )

```

```

df_470_24_dm_P5 <- as.data.frame(df_470_24_dm %>% filter(TRATAMIENTO == "P5"))

cb <- cbind(df_470_2_ac_P1, df_470_2_ac_P2, df_470_2_ac_P3, df_470_2_ac_P4,
df_470_2_ac_P5,
          df_470_24_ac_P1, df_470_24_ac_P2, df_470_24_ac_P3, df_470_24_ac_P4,
df_470_24_ac_P5,
          df_470_2_dm_P1, df_470_2_dm_P2, df_470_2_dm_P3, df_470_2_dm_P4,
df_470_2_dm_P5,
          df_470_24_dm_P1, df_470_24_dm_P2, df_470_24_dm_P3, df_470_24_dm_P4,
df_470_24_dm_P5)
colnames(cb)

df <- cb[,-c(2:7, 9:14, 16:21, 23:28, 30:35, 37:42, 44:49, 51:56, 58:63, 65:70, 72:77, 79:84,
          86:91, 93:98, 100:105, 107:112, 114:119, 121:126, 128:133, 135:140)]

colnames(df) <- c("2h-ac-P1", "2h-ac-P2", "2h-ac-P3", "2h-ac-P4", "2h-ac-P5",
          "24h-ac-P1", "24h-ac-P2", "24h-ac-P3", "24h-ac-P4", "24h-ac-P5",
          "2h-dm-P1", "2h-dm-P2", "2h-dm-P3", "2h-dm-P4", "2h-dm-P5",
          "24h-dm-P1", "24h-dm-P2", "24h-dm-P3", "24h-dm-P4", "24h-dm-P5")

combinations <- combn(colnames(df),2, simplify = FALSE)
class(combinations)
a <- t.test(df[,1], df[,2])
a$p.value
# Do the t.test
results <- lapply(seq_along(combinations), function (n) {
  df <- df[,colnames(df) %in% unlist(combinations[n])]
  result <- t.test(df[,1], df[,2])
  return(result)})

# Rename list for legibility
names(results) <- paste(matrix(unlist(combinations), ncol = 2, byrow = TRUE)[,1],
matrix(unlist(combinations), ncol = 2, byrow = TRUE)[,2], sep = " vs. ")

```

```

p_values <- as.data.frame(sapply(results, '[', 'p.value'))

for (i in 1:nrow(p_values)) {
  if (p_values[i,1] < 0.05) {p_values[i,2] = "Diferem Significativamente"} else {p_values[i,2]
= "NÃO Diferem Significativamente"}
}
p_values[,3] <- rownames(p_values)
colnames(p_values) <- c("p-valor", "Resultado", "Combinação")

# Quais Não diferem
df_470_t_nao_diferem <- as.data.frame(p_values %>% filter(Resultado=="NÃO Diferem
Significativamente"))

x <- gather(df, colnames(df)[1]:colnames(df)[20], factor_key=TRUE)
colnames(x) <- c("key", "value")

df.3 <- (pairwise.t.test(x$value, x$key, pool.sd=FALSE,
                        paired = FALSE, p.adjust.method = "none"))
teste_t <- as.matrix(df.3$p.value)
M <- teste_t

jpeg(filename = paste("Não_Diferem_470_t_test.jpg"), width = 150, height = 110, units =
"mm",
      bg = "white", res = 300)

corrplot(M, sig.level = 0.05, type = "lower",
         insig = "p-value", tl.srt = 10, is.corr = FALSE)

dev.off()
#####
### Fim do Script
#####

```