UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal

Tese

Ação de herbicidas sobre a atividade fotossintética de plantas com metabolismo C_3 e C_4

Camila Pinho de Sousa

Pelotas, 2012

Camila Pinho de Sousa

Ação de herbicidas sobre a atividade fotossintética de plantas com metabolismo C_3 e C_4

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Doutora em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Dr. Marcos Antonio Bacarin

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
(Gladis Rejane Moran Ferreira – CRB – 10/1793)

S725a Sousa, Camila Pinho de

Ação de herbicidas sobre a atividade fotossintética de plantas com metabolismo C_3 e C_4/ Camila Pinho de Sousa – Pelotas, 2012.

122f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas – Pelotas, 2012, Marcos Antonio Bacarin, Orientador.

1. Fluorescência da clorofila *a*2. OJIP3. PAM4. Trocas gasosas I. Bacarin, Marcos Antonio (orientador) II. Título

CDU 628.393:633.15+633.34

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Antonio Bacarin (Presidente)

Prof[a]. Dr[a]. Diolina Moura Silva

Prof. Dr. Nei Fernandes Lopes

Dr[a]. Emanuela Garbin Martinazzo

A Deus razão de tudo o que somos e fazemos.

Ao meu marido Diogo pelo amor, incentivo, apoio incondicional, companheirismo e suporte emocional, além dos sacrifícios e concessões.

A minha mãe Gladis, razão da minha existência e exemplo de amor com que fui criada e educada.

A minha família por sempre acreditar que eu alcançaria meus objetivos.

Dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente, guiando meus passos e permitindo que este sonho se tornasse realidade;

Ao professor Marcos Antonio Bacarin, pela orientação, aprendizado, dedicação, paciência, sensibilidade e apoio ao longo desta jornada, e por ter sido compreensivo e um grande amigo nos momentos em que precisei;

Aos meus grandes amigos Ane, Cris, Manu, Anderson e Domi, pessoas tão queridas e especiais, que foram fundamentais para a concretização desta etapa, além de proporcionarem momentos de lazer e descontração, imprescindíveis ao bom andamento deste estudo;

Aos estagiários e bolsistas de iniciação científica Márcio, Aline eLia, pelo auxílio na condução dos experimentos e pela amizade;

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal (PPGFV) pela convivência e apoio;

Aos professores e funcionários do PPGFV pelos ensinamentos e apoio recebido;

À banca pelas valiosas sugestões e trabalho dedicado a avaliação do presente estudo;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o curso;

E por fim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que esta tese se tornasse realidade,

MUITO OBRIGADO!

“Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”
Josué 1:9

RESUMO

SOUSA, Camila Pinho de. **Ação de herbicidas sobre a atividade fotossintética de plantas com metabolismo C_3 e C_4.** 2012. 122f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Este trabalho teve por objetivodeterminar os parâmetros fisiológicos relacionados à fotossíntese por meio de análises da fluorescência da clorofila *a* transiente e modulada, e das trocas gasosas de discos foliares de plantas com metabolismo C_3 e C_4 submetidos a herbicidas inibidores do FSII, da síntese de carotenóides e da síntese das clorofilas. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação e laboratórios da UFPel, no município de Capão do Leão/RS. Foram avaliados discos foliares de milho e soja obtidos de folhas maduras de plantas em estádio vegetativo. O esquema fatorial utilizado foi 3x4, sendo o fator A o tipo de herbicida (bentazon, clomazone e fomesafen) e o fator B a concentração do herbicida (0μM, 100μM, 250μM e 500μM).Foram realizados dois ensaios distintos, sendo utilizadas 15 e 5 repetições por tratamento, respectivamente para o ensaio I e II. No ensaio I foi avaliado o efeito dos herbicidas sobre a fluorescência transiente da clorofila *a*,medida utilizando-se um fluorômetro portátil (HandyPEA, Hansatech). No segundo ensaio, foi avaliado o efeito dos herbicidas sobre a fluorescência modulada da clorofila *a*(cinética de relaxamento de fluorescência e curvas de fluorescência em resposta à luz) e trocas gasosas, medidas pelo analisador de gás no infravermelho (IRGA LI 6400XT, LI-COR).O herbicida bentazon foi o que mais afetou as intensidades defluorescência da clorofila e os demais parâmetros obtidos através das duas técnicas utilizadas. Os herbicidas clomazone e fomesafenapresentaram pouca alteração dos parâmetros referentes à fluorescência transiente, sendo os parâmetros de fluorescência modulada e de trocas gasosas mais sensíveis à sua ação.Os índices de desempenhoPI_{ABS} e $PI_{ABStotal}$foram os parâmetros de fluorescência transiente mais sensíveis a ação de bentazon, clomazone e fomesafen, enquanto que para a fluorescência modulada, F_S, F_M', ETR e φ_{PSII} foram os parâmetros que demonstraram maior sensibilidade. As plantas de milho são menos sensíveis aos herbicidas bentazon, clomazone e fomesafen que a soja, sugerindo que plantas com metabolismo C_4, embora sofram com a ação dos herbicidas, apresentam capacidade de tolerância maior que as espécies com metabolismo C_3.

Palavras-chave: fluorescência da clorofila *a*, OJIP, PAM, trocas gasosas.

ABSTRACT

SOUSA, Camila Pinho de. **Actionof herbicideson thephotosynthetic activityof plants withC3and C4metabolism.** 2012. 122f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The objective of this research wasto studythe physiological parametersrelated to photosynthesisusingchlorophyll a fluorescenceand gas exchangeon leaf discsfrom a $C_3$and a C_4plantsubmitted toPSII-inhibiting herbicides.Both transientand modulatedchlorophyll a fluorescence were studied. The herbicides used affect the synthesis ofcarotenoidsand the synthesis ofchlorophyll. The experimentwas conducted in a green-house in UFPel laboratory in the town of Capão do Leão/RS. We evaluatedleaf discsof corn and soybeanobtained frommature leaves ofplantsin vegetative stage. The factorial arrangement 3x4 was used, where the first factor was the type of herbicide (bentazon, clomazone and fomesafen) and the other factor was the concentration of the herbicide (0µM, 100µM, 250µM and 500µM). There were twodistinctexperiments, with 15and 5 replicatesper treatment. In the first experiment (n=15), the effects of herbicides onthetransient chlorophyll*a* fluorescencewas measuredusing aportable fluorometer(HandyPEA, Hansatech). In the second experiment (n=5), we evaluated the effect of herbicides on modulated chlorophyll *a* fluorescence (relaxation kinetics and light curves).Gas exchange was studied using the parameters determined by the portable infra-red CO_2 analyzer (model IRGA LI 6400XT, LI-COR). The intensityof chlorophyll fluorescenceand the other parameters were most strongly affected by the herbicidebentazon.The herbicidesclomazoneand fomesafencaused relatively smallchanges inthe transient fluorescencedata, whereas the modulatedfluorescence parametersand gas exchangewere more sensitiveto clomazoneand fomesafen action. Thedesempenho indexesand$PI_{ABS}$$PI_{ABStotal}$ were the transient fluorescence parametersmost sensitive tothe actionof the three herbicides. For themodulatedfluorescence, F_S, F_M', ETR and φ_{PSII} were the most sensitive parametersactionof bentazon, clomazone and fomesafen. Cornleaves were lesssusceptible to the three herbicidesthansoybeanleaves. Such difference might suggest that C_4 plants have the ability to better tolerateherbicides than species withonly the C_3metabolism.

Keywords: chlorophyll*a* fluorescence, JIP, PAM, gas exchange.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 09

2. MATERIAL E MÉTODOS 31

2.1. Instalação do experimento e aplicação dos tratamentos **..... ...31**

2.2. Ensaio I: Efeito dos herbicidas sobre a fluorescência transiente **..... ...32**

2.3. Ensaio II: Efeito dos herbicidas sobre a fluorescência modulada da clorofila *a* e trocas gasosa **35**

2.3.1. Cinética de relaxamento de fluorescência **..... ...35**

2.3.2. Curvas de fluorescência em respota a luz **..... ...36**

2.4. Delineamento experimental e análise estatística **..... ...37**

3. RESULTADOS 38

3.1. Soja 38

3.1.1. Fluorescência transiente **..... ...38**

3.1.1.1. Cinética de emissão de fluorescência transiente da clorofila *a* **...38**

3.1.1.2. Teste JIP **..... ...41**

3.1.1.3. Análise de duplo flash **..... ...44**

3.1.2. Fluorescência modulada **..... ...46**

3.1.2.1. Análise da cinética de relaxamento **..... ...46**

3.1.2.2. Análise de curva de intensidade luminosa *vs* parâmetros de PAM **..... ...53**

3.1.3. Trocas gasosas **..... ...60**

3.2. Milho 65

3.2.1. Fluorescência transiente **..... ...65**

3.2.1.1. Cinética de emissão de fluorescência transiente da clorofila *a* **...65**

3.2.1.2. Teste JIP **..... ...67**

3.2.1.3. Análise de duplo flash **..... ...70**

3.2.2. Fluorescência modulada **..... ...72**

3.2.2.1. Análise da cinética de relaxamento **..... ...72**

3.2.2.2. Análise de curva de intensidade luminosa *vs* parâmetros de PAM **..... ...78**

3.2.3. Trocas gasosas **..... ...84**

4. DISCUSSÃO 89

5. CONCLUSÃO 100

6. REFERÊNCIAS 101

1. INTRODUÇÃO

A fotossíntese é o processo fisiológico fundamental do metabolismo das plantas, sendo responsável pelo crescimento e produtividade das culturas, podendo ser fortemente afetada por estresses ambientais. É um processo pelo qual as plantas convertem a energia luminosa em energia química (ATP e NADPH), utilizados para a síntese de carboidratos, essenciais para a manutenção dos vegetais. O processo fotossintético ocorre nos cloroplastos e compreende duas etapas interdependentes e simultâneas, a fase fotoquímica (reações de absorção e conversão da energia luminosa que ocorrem nos tilacóides) e a fase bioquímica (reações de carboxilação que ocorrem no estroma).

Os cloroplastos são organelas com aproximadamente 5-10μmde diâmetro,preenchidos commatriz aquosachamadade estroma, envolta por dupla camada de membrana(MUSTÁRDY; GARAB, 2003).No estroma existe um sistema demembrana contínua, conhecido como membranas dostilacóides. Estas membranasestão organizadas emgrana(empilhadas) e interligadas pelaslamelasdo estroma(desempilhadas) (Fig. 1). Asmembranas dos tilacóides são preenchidas porumafaseaquosa interior, denominada de lúmen.

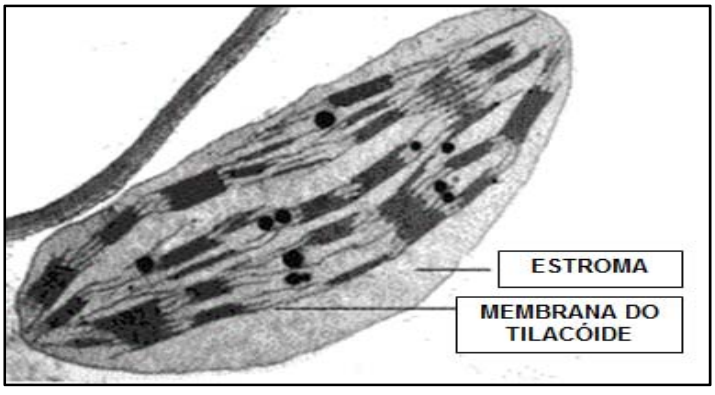

Figura 1. Micrografia eletrônica de um cloroplasto. (URL: http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lect10.htm)

As clorofilas são pigmentos de extrema importância presentes nos cloroplastos, que têm a função de absorver a energia luminosa. São moléculas tetrapirrólicas com um íon magnésio ao centro, esterificadas com um radical fitol (STREIT et al., 2005). Embora elas executem suas funções com alta eficiência, nemtoda a energiade radiação absorvidasegue para a efeito fotoquímico, o excesso pode serdissipadona formade calor(cerca de18% do total da luzabsorvida pelas plantas)oure-emitidacomo fluorescência(1-2%)(KRAUSE;WEIS,1991) (Fig.2).A fração de radiação absorvida e dissipada varia de acordo com o estado metabólico, e fornece a base para o entendimento dos processos fotossintéticos.Os trêsprocessos ocorremem competiçãodireta,de maneira quequalquer aumentoda eficiência deumirá causarumdecréscimo no rendimentodosoutros, masem condições fisiológicas normaiso processo queapresenta maior rendimento é areação fotoquímica da fotossíntese,que ocorre dentrodo centrode reaçãodo fotossistema II (FSII)(BUONASERA et al., 2011).

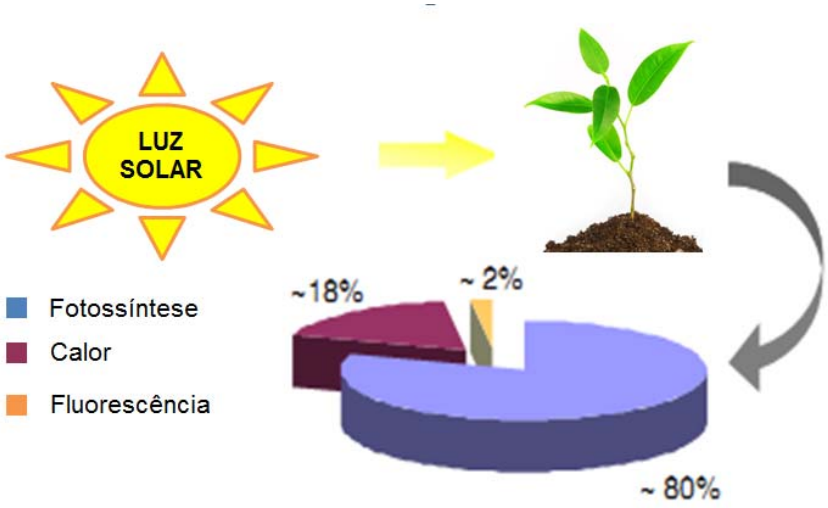

Figura 2.Destino daenergia absorvida a partirda radiação solar.A maioria da energia(cerca de 80%) é convertidano processofotoquímicoda fotossíntese, enquanto que a energia restanteé dissipadana forma de calor(cerca de18%) ou re-emitidacomo fluorescência(1-2%). (Adaptado de: BUONASERA et al., 2011).

Na etapa fotoquímica da fotossíntese a energia luminosa é absorvida pelas clorofilas presentes nos fotossistemas e em conjunto com os demais componentes da cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese é convertida em energia química. O fotossistema II (FSII) é um supercomplexo protéico com múltiplas subunidades. Funcionalmente,pode ser descritoem trêsdomínios estruturaisprincipais: (1) o núcleode reaçãotransmembranaque consiste

numheterodímerocomposto de duas proteínas D_1 e D_2, quesão centralmenteenvolvidas na ligaçãodocomplexofotooxidável clorofilaP_{680}, e proporcionama maior parte das ligações dos cofatorescom o complexoMn_4Ca, que formam o complexo de evolução do oxigênio (CEO), local deoxidação da água(LOLL et al.,2005); (2)o complexo declorofilas doFSIIrepresentado pelas antenas interiores e periféricas e (3)o conjunto de proteínasextrínsecos, que incluem três subunidades de membrana que são PsbO, PsbP e PSbQ (KERN; GUSKOV, 2011), e estão intimamente associados ao CEO, estando localizadas no lado do lúmen do tilacóide.

No complexo de clorofilas as antenas interiores consistem em proteínas de ligação, chamadas CP47eCP43, formadas por seis hélicestransmembranarese14e16 moléculas de clorofila *a*, respectivamente. Enquanto, as antenas periféricas - LHCII -transferem energia paraa antenainterior, quetransfere a energiapara o centrode reação, sendo formada por trêshélicestransmembranareshidrofóbicaseumahéliceanfipáticaexpostaà superfície luminalda membrana, coordenandoseteclorofilas *a*, cincoclorofilas *b*, etrês ou quatromoléculas de carotenóides(luteína, neoxantinaeviolaxantina), sendo sua funçãoprincipal absorverfótonse transportara energia de excitaçãopara o centrode reaçãodo FSII – P_{680} (GUSKOV et al., 2009). Dessa forma a energia do fóton absorvido é transferidaentre as clorofilas, até chegar a feofitina e assim iniciar a sequência de transporte de elétrons para as plastoquinonas Q_A e Q_B(WILLIANSON et al., 2011)(Fig. 3). Todos estes cofatores ligam-se as proteínas D_1 e D_2que também apresentam um resíduo de tirosina e deferro não-heme(Fe^{2+})(XIONG et al., 1996; ZHU et al. 2005). O núcleo de reação ainda apresenta uma membranaintrínseca, conhecida comocitocromo *b559*, que é compostapelas subunidadesPsbEePsbF (KERN; GUSKOV, 2011).

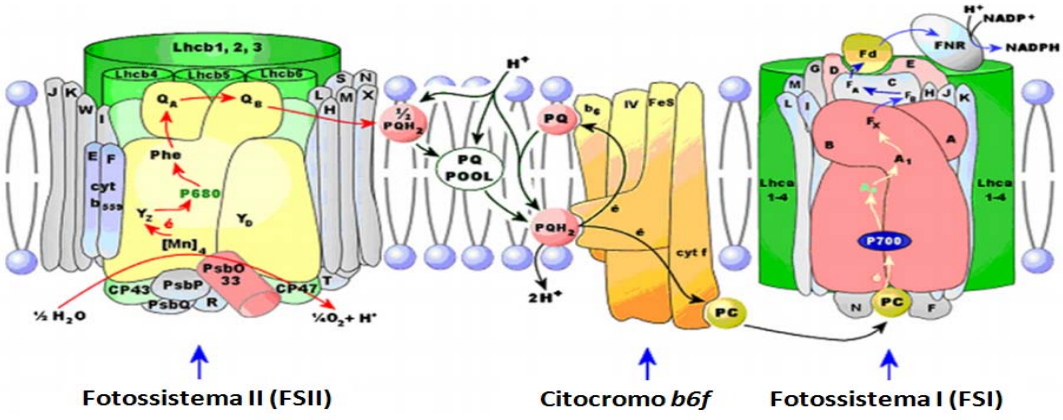

Figura 3. Desenho esquemático da etapa fotoquímica da fotossíntese (Adaptado de: ALLAKHVERDIEV, 2011).

Asreaçõesno centrode reação doFSIIiniciam com aexcitaçãodeP_{680}, que rapidamenteperde um elétronpara reduzir o aceptorprimário– feofitina, que transfereo elétronde forma sequencial as plastoquinonas (Q_A e Q_B) que estão ligadas ao centro de reação (OKAMURA et al., 2000) (Fig.4A e 4B).Enquanto Q_A está fortemente ligada na membrana do tilacóide, Q_B é levemente ligada (GUO; TAN, 2011). Depois de receber dois elétrons, Q_B^{-2} vai se combinar com dois prótons do estroma para se tornar uma plastohidroquinona (PQH_2) (Fig.4C). A plastohidroquinona reduzida desacopla-se da proteína D1 e, por difusão, entra na porção hidrocarbonada da membrana, onde transfere os seus elétrons ao complexo citocromo *b_6f* (Cyt *b_6f*). A PQH_2 será oxidada pelo Cyt *b_6f* e a plastoquinina (PQ) resultante (Figura 4D) irá retornar para o conjunto de PQ (GOLTSEV; YORDANOV, 1997). O complexo Cyt *b_6f* é desprovido de pigmentos e catalisa a transferência de elétrons entre o FSII e o FSI.

$$Q_A^- + Q_B \leftrightarrow Q_A + Q_B^- \quad (\boldsymbol{A})$$

$$Q_A^- + Q_B^- \leftrightarrow Q_A + Q_B^{-2} \quad (\boldsymbol{B})$$

$$Q_B^{-2} + PQ + 2H^+ \rightarrow Q_B + PQH_2 \quad (\boldsymbol{C})$$

$$PQH_2 \rightarrow PQ + 2H + 2\boldsymbol{e}^- \quad (\boldsymbol{D})$$

Figura 4. Esquema das transferências de elétrons que ocorrem entre as quinonas FSII (Adaptado de: GUO; TAN, 2011).

O fotossistema I (FSI) é o outrocomplexo envolvido na fase fotoquímica da fotossíntese. Este complexo recebe elétrons provenientes doFSII, através da plastocianina (PC). Os componentes do centro de reação do FSI estão organizados ao redor de duas proteínas principais, PsaA e PsaB. Os elétrons são transferidos da PC para o P_{700} e daí para um monômero de clorofila (A_0), para uma filoquinona (A_1), para os centros Fe-S, e finalmente para a proteína ferro-sulfurosa hidrossolúvel ferredoxina (Fd) (TAIZ; ZEIGER, 2009). A flavoproteína associada à membrana, ferredoxina-NADP redutase (FRN), reduz o $NADP^+$ a NADPH, completando assim o transporte acíclico de elétrons (KARPLUS et al.,1991). Nem todos os elétrons que

chegam a ferredoxina resultam na formação de NADPH, rotas alternativas podem ser tomadas dependendo da necessidade do vegetal. Os elétrons oriundos da ferredoxina reduzida, que é produzida pelo FSI, interagem com várias enzimas ferredoxina-dependente não apenas nas assimilações de nitrogênio inorgânico, enxofre e fixação de N_2, mas também na regulação do ciclo de assimilação de CO_2(FUKUYAMA, 2004).

Adicional ao fluxo acíclico de elétrons, onde os elétrons da ferredoxina são transferidos para o $NADP^+$, resultando na acumulação de NADPH, existem outros dois tipos de fluxo de elétrons que podem ocorrer na fase fotoquímica da fotossíntese, o fluxo cíclico e o pseudocíclico. O fluxo cíclico ou fosforilação cíclica depende apenas da reação fotoquímica do FSI (MUNEKAGE; SHIKANAI, 2005), pois os seus elétrons são reciclados a partir da ferredoxina àplastoquinona, gerando um gradiente de prótons através da membrana do tilacóide, que resulta na produção de ATP, sem acumular NADPH (SHIKANAI, 2007). Neste processo, os elétrons circulam indefinidamente ao redor do FSI.O fluxo de elétrons pseudocíclico ocorre em certas condições fisiológicas quando o O_2 recebe os elétrons oriundos da ferredoxina no lugar do $NADP^+$, através de uma reação não-enzimática (FRIDLYAND; SCHEIBE, 1999). Esta reação foi descrita por Mehler (1951), e por esta razão, é conhecida como reação de Mehler. Esta reação pode ter um importante papel na proteção dos vegetais sob condições de estresse (HAUPT-HERTING; FOCK, 2002).

O poder redutor gerado através da fase fotoquímica, NADPH, bem como, a energia disponível a partir da hidrólise de ATP, são críticos para a produção de carboidratos a partir de CO_2, que ocorre na fase bioquímica (STIRBET; GOVINDJEE, 2011). Esta etapa ocorre no estroma dos cloroplastos, num processo denominado de ciclo de Calvin-Benson, tendo a Rubisco (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase) como enzima-chave na assimilação fotossintética de CO_2 (BASSHAM, 2003).

A eficiência de conversão de energia dos fotóns para NADPH e ATP é elevada quando a assimilação líquida de CO_2 é limitada pelo fornecimento de fótons, neste caso, o rendimento quântico ou eficiência fotoquímica do FSII (φ_{FSII}) é alto (MIYAKE et al., 2005). No entanto, quando a assimilação líquida de CO_2 é limitada pela reação de carboxilação da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) catalisada pela Rubisco, a sua eficiência é baixa. Como resultado, aφ_{FSII} diminui e a energia dos

fótons absorvidos é apenas parcialmente utilizada para assimilação de CO_2(MIYAKE et al., 2005). Nestes casos, o excesso de energia noFSII pode causardanosnas membranas dostilacóides, estimulando a produção de espéciesreativas de oxigênio (NIYOGI,2000).O parâmetro φ_{FSII}pode ser usadopara calcular a taxadetransferência de elétronslinear (ETR) (GENTYet al,1989)

Quando a quantidade deenergia produzida pelo excesso de luz excede a capacidade detransporte de elétronsparaviasdisponíveis,outrosmecanismos de deexcitaçãotornam-seimportantes. Inicialmente ocorre àprodução declorofila“triplet” (^{3}Chl), que pode reagircom oxigênio molecularproduzindo oxigênio“singlet” ($^3O_2$),uma espécie muitoreativae nociva para os vegetais (BARBER, 2001).O danoinclui a oxidaçãode lípidos, proteínas e pigmentos(FORMAGGIO et al., 2001), levando a fotoinibiçãodo aparatofotossíntético. No entanto, oscomplexos do FSII e FSIpossuem pigmentos responsáveis pela proteção contra fotodanos, denominadoscarotenóides. Estes carotenóides sãoisoprenóides que podem agirde duas maneiras: (I) por extinçãode clorofilas “triplets”ou (II) por eliminar diretamente o oxigênio “singlet”; em ambos os casos os“triplets”de carotenóidesquesão formadosvoltam parao estado fundamental, produzindo calor (KRIGER-LIZKAY et al., 2008). Para estes processosocorrerem,clorofilas ecarotenóidesprecisam estar extremamente próximosporqueelétronssão transferidos das clorofilasaos carotenóidesatravés domecanismo de troca deDexter (a transferência de elétrons é facilitada quando os núcleos dos complexos estiverem em uma determinada posição que torna iguais a energia dos elétrons dos sistemas)(SIEFERMANN-HARMS, 1985).Asdistâncias entre os pigmentos muito curtassão mantidas pelasproteínas, quecoordenamos pigmentos, permitindo assim que a transferência de energia sejarápida eeficiente na fotoproteção(MOZZO et al., 2008).

A composição de carotenóides de plantas superiores é altamente conservada. As subunidades do FSII e FSI codificadas no cloroplasto se ligam a β-caroteno, enquanto a antena externa, composta por complexos codificados no núcleo (LHC), apresentam luteína, neoxantina, e violaxantina à luz moderada, e zeaxantina (MOZZO et al., 2008) através da epoxidação de violaxantina sob condições de estresse de luz (GOSS; JAKOB, 2010).

A extensão da fotoinativação do FSIIdepende diretamente doestado redoxde Q_A(MELIS,1999)e indiretamentedo nível dedissipação de energiatérmica (NIYOGI,1999)nos complexos deFSII. O estado redox deQ_Ae o nível dedissipação

de energiatérmicasão tradicionalmenteestimados utilizando-seoscoeficientes de extinção fotoquímicos(qP) enão-fotoquímicos (NPQ) de fluorescência, respectivamente (MAXWELL; JOHNSON,2000;MÜLLERet al., 2001;ROHÁCEK,2002, 2010).

O NPQ é um índice que demonstra claramente o processo fotoprotetor de excitação de estados “singlets” na antena do FSII (LAVAUD,2007). Tem sido demonstrado que NPQ é de fato essencial tanto para o crescimento ótimo, como para a sobrevivência das plantas sob condições naturais (KÜLHEIM et al., 2002) e é induzido porbaixasφ_{FSII}(MIYAKE etal., 2004,MIYAKEetal., 2005).A indução deNPQrequerumgradiente de pHatravés das membranas dos tilacóides. Aacidificaçãodo lúmen dostilacóidesé impulsionadapelo fluxode elétronscíclicoem torno doFSI(MIYAKEet al., 2005). O fluxo cíclico de életrons aumenta em condições de saturação de luz e/ou redução da pressãoparcialdeCO_2eestá positivamentecorrelacionado com o NPQ(MIYAKEetal., 2004).Os mecanismos de indução não-fotoquímico foram classificados em trêsclasses: 1) os de extinção dependente de energia - qE, um componente rapidamente reversível causado pela ΔpH através da membrana tilacóide; 2) os de extinção dependentes do estado de transição–qT; e 3) os de extinção dependentes da fotoinibição - qI (KRAUSE; WEIS, 1991). Todos estes processos têm papéis fisiológicos que contribuem para a proteção do aparelho fotossintético.

Uma maneira comumpara caracterizar aoperação de processos fotoprotetoresou à susceptibilidadeà fotoinibiçãoé quantificar aresposta à luzdoNPQ. Isto é feitoatravés da construção decurvasNPQ, “versus”a radiância fotossinteticamente ativa (RFA) que registramo desenvolvimento deNPQquando aradiação incidenteaumenta.Estas curvassão análogas àscurvas de luz em função da taxa de transporte de elétrons (ETR) frequentementemedidas, no sentido de queelas representama variaçãodo estado estacionário daatividade fotossintéticaentre os diferentes níveisde luz, portanto, nãoinformandosobre a cinética dageraçãoNPQ, mas sim o nível deNPQatingívelem cadairradiância (MINAGAWA, 2008). A forma dacurva deNPQ“versus”RFAvaria amplamente, em relação tantoa sua formageral quanto aos valores absolutosde NPQalcançadas.Normalmente,NPQaumentamonotonicamente comirradiância, variando de zero (no escuro), para valores máximos, que variam muitocom os

grupostaxonômicos, estado fisiológico, restrições ambientaisou níveis de luzaplicados.

O estudode processosde dissipação de energiaé complicadopelo fato depesquisadoresutilizaremtermos diferentes paranão-fotoquímico, por exemplo os parâmetrosNPQ“versus”qN. Diferentemente de NPQ, que apresenta uma escalade zero a infinito (MINAGAWA, 2008), o parâmetro qN,requer uma mediçãodeF_0e cai sobreuma escala de0-1sendo, portanto,relativamente insensívela variaçõesdeextinçãoa valores mais elevados(KOOTEN;SNEL, 1990).

Já o parâmetro qPrepresenta a extinção causada pelo processo fotoquímico, ou seja, aquela causada pela utilização da energia para a redução do $NADP^+$. Ele indica a proporção de centros de reação abertos noFSII (MINAGAWA, 2008), estando diretamente relacionado com o estado redox deQ_A, e decresce na proporção do fechamento dos centros de reação (redução de Q_A). Quando a etapa fotoquímica é bloqueada devido à redução de Q_A, (qP = 0) o rendimento de fluorescência é máximo. Quando todos os centros de reação são capazes de realizar fotoquímica, ou seja, quando todas as Q_A encontram-se oxidadas, qP é máximo (= 1) e o rendimento de fluorescência é baixo (TING; OWENS, 1992).

Todos estes processoscompetem entre si e contribuem para a redução de clorofilas no estado “triplet”.Portanto,umaumentona taxa deumdesses processos, diminuio rendimento da fluorescência(φ_F) (SERÔDIO; LAVAUD, 2011). Historicamente, o termo"extinção" refere-se a todos os processosque reduzemφ_F.O rendimento da fluorescência,variando no tempo, permite a investigação dos mecanismos através dos quais a energia da luz absorvida em complexos do FSII é utilizada na fotossíntese. De acordo com a lei da conservação de energia, o aumento da eficiência dos processos fotoquímicos conduz à diminuição da eficiência dos processos não-fotoquímicos, em que a energia de excitação é redistribuída, e vice-versa. Interpretação da extinção da fluorescência da clorofila depende da capacidade de resolver contribuições de muitos fatores que conduzem à redução do φF (GENTY et al., 1989; ZHU et al.,2005).

A avaliação de fluorescênciapermite a mediçãoda fraçãode radiação absorvidafotossinteticamenteativa nãoutilizada na fase fotoquímica pelo centrode reaçãoe, portanto,é geralmente considerada comoumamedida inversada atividadee do estadofuncional doprocesso fotossintético (BUONASERA et al., 2011). Inicialmente acreditava-se que por causa das diferentes propriedades de doadores

de elétrons primários e da organização de receptores de elétrons nos centros de reação, o FSII seria muito mais propenso do que a FSI para reemitir parte da energia absorvida como luz. Entretanto, pesquisas atuais já buscam informações sobre a fluorescência emitida pelo FSI.

Os estudos de fluorescência se iniciaram através de observações realizadas por KautskyeHirsch(1931), onde eles constataram que em uma transição deescuropara aluza intensidadede fluorescência inicialmenteaumenta, seguida por um declínio até chegar a um nível constante (Fig. 5). Os avanços tecnológicosnos últimos80 anospermitem, hoje, medireste fenômenocom muito mais detalhese comuma resolução de tempomuito maior.As reações de fotossíntese ocorrem no FSII durante uma grande faixa de tempo. Reações que duram até centenas de picosegundos são considerados "ultrarápidas" (LAIBLE et al, 1994). As reações que duram de dezenas de microssegundos até dezenas de milissegundos são consideradas “rápidas”, e aqui se encontram aquelas que ocorrem no lado aceptor do FSII, como as que incluem a partilha de elétrons entre as quinonas primárias e secundárias e as reações subsequentes que resultam na redução dos transportadores de elétrons do intersistema. Por último, as reações dependentes da energia de extinção, transições de estado, e fotoinibição são consideradas “lentas” e a sua duração vai de segundos a centenas de minutos (MINAGAWA, 2008). Diferentes técnicas têm sido aplicadas para a elucidação das reações em domínios de tempo diferentes.

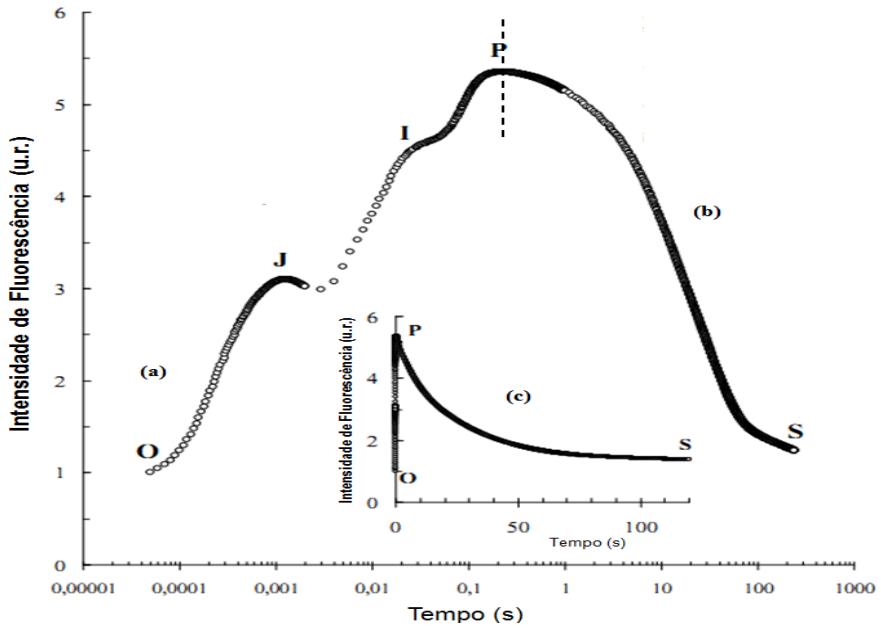

Figura 5. Cinética de emissão da fluorescência ou curva de Kautsky. (a) cinética rápida (escala logarítmica); (b) cinética lenta (escala logarítmica) e (c) curva em escala de tempo linear (até 120s) (Adaptado de: STRASSER et al., 2004).

O estudo da fluorescência da clorofila *a*, é um método simples, rápido e não invasivo, que fornece dados precisos sobre a eficiência fotoquímica e efeitos adversos nas plantas expostas a condições de estresse e tem sido utilizado com sucesso para monitorar mudanças no estado fisiológico do sistema fotossintético. Embora a fluorescência corresponda a uma fração muito pequena da energia dissipada a partir do aparato fotossintético, é uma técnica amplamente aceita e utilizada para fornecer informações sobre os complexos de pigmentos, sua organização, a transferência de energia de excitação entre eles, e sobre as diversas reações de transferência de elétrons específicas do FSII (PAPAGEORGIOU; GOVINDJEE, 2011; STIRBET;GOVINDJEE, 2011).

Nos estudos de fluorescência transiente dois níveis são de extrema importância esão definidoscomo se segue:F_0(rendimentomínimodefluorescência)é o nível defluorescência da clorofilaquandotodos os centros deFSIIestão abertos eF_M(rendimentomáximodefluorescência) é o nível máximo defluorescência da clorofilaquando todos os centros de reação do FSIIestão fechados (MINAGAWA, 2008) (Fig. 6).Na prática,o valor mínimo deF_0é conseguido através daadaptação ao escuroda amostra, o que permite a abertura de todos os centros de reação do FSII. A fluorescênciamáxima,F_M,é obtida porum pulso deluz saturante (STRASSER; STIRBET, 2001; STRASSER et al., 2004). A diferença entrea fluorescênciaproveniente decentrosde reação fechadoe abertoé chamadade fluorescênciavariável, ouF_v($F_V=F_M - F_0$), e é uma medidarelativa doscentros de reaçãofotoquimicamenteativos (MINAGAWA, 2008).Aφ_{FSII} é calculada em amostrasadaptadas ao escuro e é definidapela relaçãoF_V/F_M.Este parâmetro é omais frequentemente referidona literatura eseu declínioindica perda deeficiência fotoquímica, que é, por sua vez,sintomáticodo efeito deváriosestresses ambientais (FARALONI et al., 2011; KALAJI et al., 2011). Entretanto, diversos autores verificaram insensibilidade de F_V/F_M em plantas expostas a estresses ambientais, como desbalanço nutricional (ADAMSKI et al., 2011), excesso de luz (GONÇALVES et al., 2010), salinidade (MEHTA et al., 2010) e estresse hídrico (CATALAYUD et al., 2006; MARTINAZZO et al., 2011; PERBONI et al., 2012).

A cinética da fluorescência da clorofila *a* permite o cálculo de parâmetros de fluorescência que caracterizam o funcionamento do aparelho fotossintético (YUSUF

et al., 2010). Osfluorômetros utilizados são de dois tipos básicos, fluorescência induzida por sinais contínuos, e porexcitação modulada. Existegrandesdebatessobre as vantagens e desvantagens das duas técnicas. No entanto, como ambos verificam o sinal de fluorescência emitida pelo aparato fotossintético, às informações obtidas a partir dos dois métodos não podem ser contraditórias (STRASSER et al., 2004). O que é realmente importante é fazer as ligações entre o sinal de fluorescência ea biofísica do sistema, para se obter as informações desejadas.

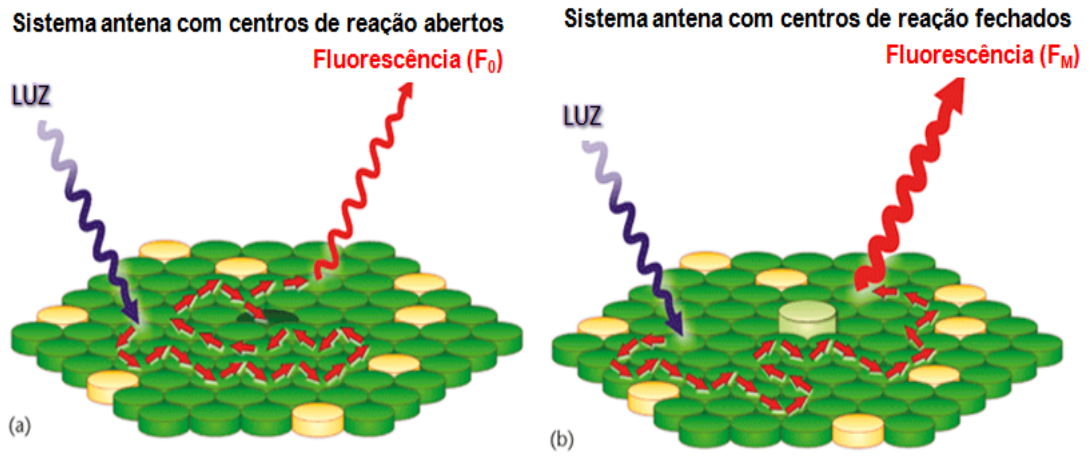

Figura 6. Representação esquemáticamostrando a transferência deenergia de excitação (pequenas setas vermelhas) de umamolécula de clorofilapara outra emum sistema antena "genérico". Os discosverdes representamclorofilas*a* e *b*, e os discosamarelos os carotenóides; odiscoverde mais escuro no meiodo painel(a) representaumcentro de reaçãoaberto e odisco verdemais clarono meio dopainel (b) representa umcentrode reação fechado (Adaptado de: GOVINDJEE et al., 2010).

Nas medições de fluorescência com Pulso de Amplitude Modulado (PAM) (SCHREIBER et al., 1996), as equações foram derivadas à partir da distinção e quantificação dos dois tipos de extinção de fluorescência (ROHÁCEK, 2002), o coeficiente de extinção fotoquímico (qP) e o não-fotoquímico (qN e NPQ) (JUNEAU et al., 2005).

Esta técnica permitea separação doseventos fotoquímicosenão-fotoquímicos extinção de fluorescênciaporutilização depulsos de luzsaturantes, sobreposta àirradiaçãoactínicacontínua (BUONASERA, 2011). Nestas avaliações, os cinco principais níveis de intensidade de fluorescência são obtidos: F_0, F_0', F_M, F_M'e Fs. F_0 e F_M são o rendimento mínimo e máximo de fluorescência como descrito anteriormente. F_0'e F_M' são a intensidade mínima e máxima de fluorescência efetiva, obtidas sem prévia adaptação da planta ao escuro e Fs é o valor de estado

estacionário de fluorescência atingido durante a cinética de indução de luz (GORBE; CATALAYUD,2012). A partir destes valores de fluorescência, os outros parâmetros pode ser calculados como o coeficiente de extinção fotoquímico (qP), o não-fotoquímico (qN e NPQ) (SCHREIBER et al.,1996; SCHREIBER; KLUGHAMMER, 2008) e o rendimento quântico efetivo do FSII (φ'_M) ou F_V'/F_M', que representa a capacidade da planta para converter energia do fóton em energia química, uma vez alcançado o “steady-state” (equilíbrio dinâmico) de transporte de elétrons (GENTY et al., 1989). Isto é possível, pois usando este sistema, o rendimento de fluorescênciapode ser medido, mesmo na presença presença deluz solar.Parâmetros deextinção de fluorescênciasão comumente empregadospara avaliar a eficiênciafotossintética dasplantasexpostasa poluentesou outrosestresses ambientais(JUNEAUetal.,2003).No entanto, alguns parâmetros parecem ser maissensíveisdo que outrosa estes estresses. Por exemplo,φ'_MeqNforamem vários casos,muito mais sensíveisemuma série de indicadoresderesposta ao estressedo queqP, como observado emplantas expostasa algunsherbicidas (FRANKARTetal.,2003).

Nas avaliações da cinética de emissão da fluorescência transiente ou polifásica, pode-se observar que após as plantas serem expostas a um período suficientementelongo de escuro(15-30 minaté uma hora), os dados originais decinéticade indução de fluorescênciasão observadosnovamente quandoa mesma intensidade de luzéligada.Estacurvatem pontosde inflexão (STRASSER et al.,2004): a fase rápidaé rotulada comoOJIP, onde O épara a origem, Je I são níveis (passos) intermediários, e P é opico máximo.Afase lentaé chamadaPSMT(PAPAGEORGIOU; GOVINDJEE, 1968), onde Srepresenta o estado semi-estacionário, M para um máximo, eTpara um nível deestado terminalconstante (Fig. 05).

Alterações de fluorescênciadurante a parterápida dotransiente(isto é, até quando orendimento da fluorescênciaatinge o picoP) podem sercorrelacionadas comos eventos que ocorremnasreduçõessucessivas dosaceptores de elétronsda cadeia de transportede elétronsfotossintética (PAPAGEORGIOU; GOVINDJEE, 2004). A partelentaé mais difícil deinterpretar, pois ocorre umaumento do número deprocessos envolvidosdurante esta fase, como por exemplo, extinção de fluorescência não-fotoquímica,síntese de ATP, ciclo de Calvin, entre outros (STIRBET; GOVINDJEE, 2011).

Estas avaliações da cinética de emissão da fluorescência transiente ou polifásica podem ser descritas utilizando-se o Teste JIP (STRASSER; STRASSER, 1995; STRASSER et al., 2000), o qual quantifica o fluxo de energia que passa pelos fotossistemas e avalia o desempenho fotossintético de plantas. O teste JIP, fornece informações adequadas sobre a conformação, estrutura e função do aparato fotossintético em qualquer estado fisiológico, podendo ser utilizado para estudar ponto a ponto as mudanças no comportamento deste aparato, através das alterações dos parâmetros obtidos(STIRBET; GOVINDJEE, 2011). A derivação das ligações entre a biofísica do aparato fotossintético e os sinais de fluorescência, e sua formulação analítica é baseada na "Teoria dos Fluxos de Energia em Biomembranas" (STRASSER, 1978) e no conceito de que o rendimento de fluorescência do FSII é determinado pelo estado, aberto ou fechado, do centro de reação.Asalterações dinâmicas doestadode fechamentodo FSIIinduzidaspor radiação saturanteconduzem a um aumentorápidodo rendimentode fluorescência queé visto comoumtransienteOJIPpolifásico (STRASSER; GOVINDJEE,1992). Atualmente, sabe-se que quandoQ_A é reduzida, o centro de reação do FSII (CRII)é fechado e a fluorescência da clorofila *a* é alta, enquanto que, quando $Q_A$está no estadooxidado, o CRIIestá abertoe a fluorescênciaé muito baixa (STRASSER et al., 2004).

Além dos CRs abertos e fechados, também é importante destacar o papel dos centros de reação silenciados, ou seja, aqueles que não reduzem Q_A. Isto ocorre, devido a existência delocaisnão-redutores deQ_B, pois alguns sítios de $Q_B$nãopodem aceitarelétrons deQ_A(GUO; TAN, 2011). Os centros de reaçãodo FSIIsãoconsiderados homogêneosno modelosimples usadopara se obter o transiente OJIP, mas sabemos que"in vivo", há vários tipos deheterogeneidades no FSII,tais comoo tamanho diferente das antenaseQ_A ou Q_B inativos (MELIS, 1985). A exposição adiferentesestresses abióticosafetaessas heterogeneidades, alterando as frações dediferentes centros doFSII. A fluorescência das clorofilas *a*deFSII comlocais não-redutoresde $Q_B$tem uma dinâmica diferentedaquela em que os FSII possuem sítios redutores de Q_B(STIRBET; GOVINDJEE, 2011).Os centros não-redutores de $Q_B$são conhecidos por teremumainfluênciaespecífica sobreo transientede fluorescência,especialmente na parteOJ, que tem sido mantidapor meio desimulação numérica(STRASSER; STIRBET,1998). Um testerápidopara a avaliaçãoda fraçãonão-redutora de $Q_B$no FSIIfoi proposto porStrassere

colaboradores(STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL, 1998), com base no fato de estescentros apresentaremuma cinéticade relaxamentolentano escuro. Uma maneira fácil para detectar estes CRs silenciados é a indução de dois pulsos de luz subsequentes (cada um com 1s de duração)separados por umcurtointervalo derelaxamento – escuro (no máximo500ms) (STRASSER et al., 1992). O primeiro pulso fornecido após o período de adaptação ao escuro é suficiente para garantir a reabertura de todos os CRs, e induz uma fluorescência transiente; um segundo pulsosegue, induzindo uma fluorescência transiente, chamada de O*-J *-I*-P* (Fig.7). O intervaloescuroentre os doispulsosé suficientemente curto parapermitir somentea reabertura doCRs redutores de Q_B. Aqueles CRs que se mantém fechados dentro de aproximadamente500ms são consideradoscomo não-redutores de Q_B (STRASSER et al., 2004).

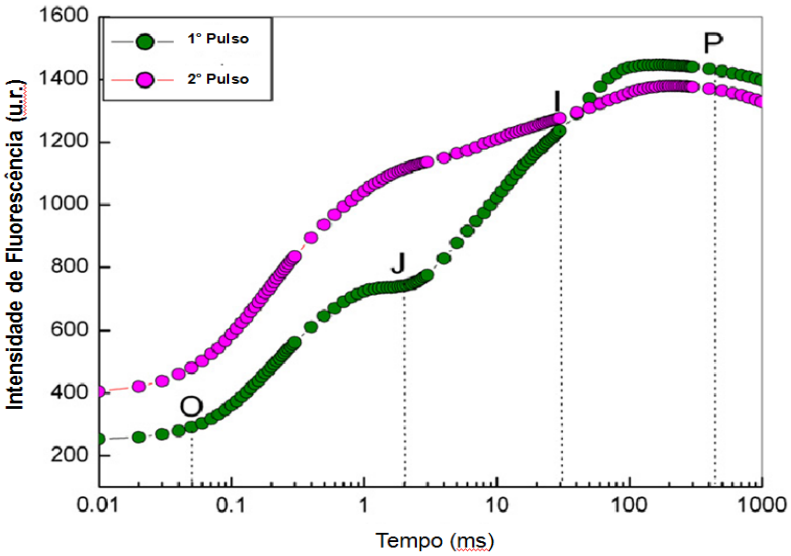

Figura 7. Curva de indução de fluorescência da clorofila *a* obtidaatravés de dois pulsos saturantes, com intervalo de 500 ms entre cada pulso. O 1º pulso foi emitido após a adaptação da folha a 30 min de escuro (Adaptado de: MEHTA et al., 2011).

O Teste JIP envolve duas formas diferentes deprocessamento de dados, que permitem analisar sinais de fluorescência específicos ou as curvas como um todo (YUSUF et al, 2010). No primeiro tipo, são obtidos parâmetros que caracterizam a amostra fotossintética baseandos principalmente nas estimativas de fluxos de energia por centro de reação ou por secção transversal (área) da amostra, nas taxas de fluxos de energia, e em outras expressões matemáticas envolvendo os fluxos de energia. Estes parâmetros são calculados usando os valores específicos de fluorescência a partir dos transientes OJIP obtidos, com base em um número de

hipóteses sobre o aparelho fotossintético e a sua função, tais como a conversão de energia de excitação e as etapas de transferência de elétrons nos dois sistemas fotossintéticos (STIRBET;GOVINDJEE,2011).Dentre os parâmetros que são derivados a partir deste teste encontram-se os que quantificam o fluxo de energia através do centro de reação (CR) do FSII(ABS/RC, TR_0/RC, ET_0/RC, DI_0/RC e RE_0/RC), os fluxos baseados na área da amostra excitada (CS) (ABS/CS_0, TR_0/CS_0, ET_0/CS_0 e DI_0/CS_0), os rendimentos energéticos (φP_0, φE_0, φD_0 e φR_0) e as eficiências (ψ_0, ρ_0 e δ_0). (STRASSER; STRASSER, 1995; FORCE et al., 2003; STRASSER et al., 2004) (Fig. 8).Todos esses fluxos de energia estão interligados e são dependentes de propriedades estruturais e atividade fotossintética da amostra biológica.

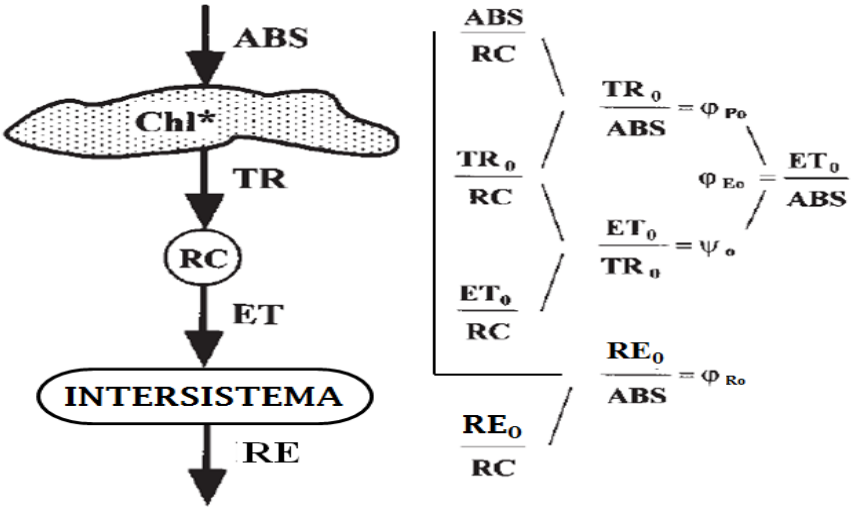

Figura 8. Esquema simplificadoda cascata deenergia a partir daabsorção de luzpara otransporte de elétrons(Adaptado de: STRASSER et al., 2004).

Nas avaliações da fluorescência transiente completa,o que é avaliado é a curva OJIP. No caso de plantas adaptadas ao escuro, no início da iluminação, é possível observar o início desta curva, ou seja, o passo “O” , o qual representa a fluorescênciamínima, isto é, quando todas $Q_A$estão oxidadas. Em seguida, após a emissão de umpulso saturante (por exemplo, 3.000mmol fótons $m^{-2}s^{-1}$), ocorre umrápido aumentoda fluorescência, passo denominado de “P”ou “F_M”(fluorescência máxima - todas$Q_A$encontram-se reduzidas) em ~200ms (YUSUF et al., 2010). Além disso, outros dois passos intermediários podem ser detectados, o “I” e “J”, situados respectivamente em ~2 mse ~ 30ms (TÓTH etal., 2007).

A fase OJ da fluorescência transiente está relacionada com aredução fotoquímicadoprincipalaceptor do FSII (Q_A), sendo a sua cinética fortemente

dependente da densidade de fluxo de luz (SCHANSKERetal., 2005). A fase OI da cinética, revela mudanças no processo entre o éxciton capturado pelos CRs até a redução da PQ (YUSUF et al., 2010). Na cinética da fase JI, são refletidas principalmenteas reduçõesdos transportadoresde elétrons do intersistema da cadeia de transporte de elétrons, ou seja, conjunto de pastoquinonas, Cyt_{b6f}e PC, enquanto na fase IPsão refletidasas reduções dosreceptores de elétronsdo lado aceptor do FSI, ou seja, ferredoxina (Fd), outros intermediárioseNADP$^+$ (SCHANSKERetal., 2005).No nívelde F_M,todas as moléculas deQ_A sãocompletamente reduzidas, devido à redução da cadeia de transportede elétrons acíclica, como resultado deum atolamento de tráfegode elétronsno lado aceptordoFSI(SCHANSKERetal., 2005)

Alguns estudos recentestêm demonstradoque a fase deJIreflete a acumulação de$Q_A^-Q_B^{2-}$ quando a reoxidaçãodo conjunto deplastoquinonaatravésdo Cyt_{b6f}é máxima, enquanto que o aumentode fluorescênciaIPestá relacionada coma acumulação do conjunto deplastoquinonareduzida,devidoa uma diminuiçãode suataxa de oxidação (JOLY; CARPENTIER, 2009). O nívelde fluorescênciano passoJé máximoquando todas as$Q_A$são reduzidas,que é o casoquando há concentraçõessaturantes deinibidores de FSIIdeslocandoo elétron secundáriodo aceptorQ_B^-, tais como os herbicidasfotossintéticos (BUKHOV et al., 2004).A correlação entre ocentro de reação doFSIIfechado e a alteraçãodo pico J (na maioria das vezes expressa comovariávelrelativade fluorescênciaV_J= $(F_J - F_0)/(F_M-F_0)$, com o significado daquantidade relativa de$Q_A$reduzida$[Q_A^-]/[Q_A^-+Q_A]$) é amplamente utilizado com o objetivode detectar e estimara força de uminibidor(CHALIFOUR et al., 2009). O aumentode fluorescênciarápidaOPparece seruma ferramenta essencialpara estudar a atividadee a integridade doaparato fotossintéticosobdiferentes condições de estresse, sendo muito sensível a quaisquer mudançasnas reaçõesde transferênciade elétronsdolado aceptor doFSII(STRASSER et al.,1995).

Para compararas amostrasobtidas nas análises dastransientes, é necessário normalizar os dados para fluorescênciavariávelrelativa (W): $W_{OJ}=(F_t-F_0)/(F_J-F_0)$, $W_{OI}=(F_t-F_0)/(F_I-F_0)$ and $W_{IP}=(F_t-F_I)/(F_P-F_I)$, e realizar a subtração dacinética como$\Delta W=W_{tratamento}-W_{controle}$ (YUSUF et al., 2010). Estas subtrações da cinética revelambandas quegeralmente sãoescondidasentre as etapas O,J,I ePdos transientesprimários (STRASSER et al., 2004). A diferençacinéticaΔW_{OJ}revela a banda “K”(a cerca de 300ms), enquanto que a ΔW_{OK}revela a banda “L”(em cerca de

150ms). A banda -K, está relacionada com a dissociaçãodo complexo de evolução do oxigênio(DERONDEetal, 2004),ou, quando positiva, reflete a inativação deste complexo e/ou um aumento do tamanho da antena do FSII (YUSUF et al., 2010). Enquanto, a presença da banda -L é um indicador da conectividade energética ou do grau de agrupamento das unidades do FSII, sendo mais alta quando a conectividade é menor (STRASSER; STIRBET et al., 1998). Contudo, quanto menor a conectividade, menor a utilização da energia de excitação e menor a estabilidade do sistema (STRASSER et al., 2004). Oukarroum et al. (2007) sugerem que as bandas -K e -L são indicadores potenciaisdeestresse podendo ser consideradascomo indicadores dedistúrbios fisiológicosantes do aparecimentode sinais visíveis de estresse.

Além das análises de fluorescência das clorofilas *a*, as medições das trocas gasosas têm sido amplamente utilizados para parametrizar a fotossíntese de folhas. Estas análises só foram permitidas a partir do modelo de fotossíntese introduzido por Farquhar et al. (1980). Estas análises têm-se revelado úteis para ajudar a prever os efeitos da mudança climática sobre a fotossíntese (SABATÉ et al., 2002), e para avaliar a influência de diversos estresses (WILSON et al., 2000; SCHULTZ, 2003; WARREN, 2004) sobre a capacidade fotossintética.

Outro fator que deve ser levado em consideração quando se estuda a fotossíntese, é o tipo de metabolismo fotossintético que as plantas apresentam. Desde adescoberta das plantasC_4nadécada de 1960, quantidades significativas de pesquisatêm sidorealizadaspara estudar a bioquímicae genéticadafotossínteC_4. A principal diferença entrea fotossínteC_3e C_4éque afotossínteC_4tem ummecanismo deconcentraçãode CO_2, que aumenta aconcentraçãodesteao redor da enzima Rubiscoe, correspondentemente,reduz afotorrespiraçãoe aumentaataxa defixaçãolíquidade CO_2 (SAGE, 2004). Omecanismo de concentração deCO_2depende dacooperaçãodedoistipos de célulasespecializadas, as células dabainhae as do mesofilo.

Nascélulas dabainha, a concentração da Rubiscoéalta, enquanto que nas células domesofilo, a concentração de PEPcarboxilase(PEPcase) é elevada(SAGE, 2004). Alémdas diferençasnabioquímicaentre estesdoistipos decélulas, as plantasC_4tambémpossuem um sistema detransporteeficiente dosmetabólitosentre estes doistipos de células(LEEGOOD, 2002), e aparedecelulardas células dabainhasãomais espessaspara formar umaestrutura denominada de “estrutura

Kranz". Nas células do mesófilo das plantas C_4 acontece a fixação do CO_2, pela PEPcase, que fixa o CO_2 (HCO_3^-) produzindo oxaloacetato, um composto de quatrocarbonos, a partir do fosfoenolpiruvato (3C) diferentemente da Rubisco, que forma trioses no Ciclo C_3. O oxaloacetato é então convertido a malato ou aspartato, passa para as células da bainha, e é descarboxilado, formando piruvato e liberando CO_2, que então é utilizado pela Rubisco para formar trioses no ciclo C_3.

Nas plantas C_4 há uma separação espacial entre a fixação do CO_2 e a redução do composto intermediário de trêscarbonos, pois a PEPcase fixa o CO_2 nas células do mesofilo, e vai concentrá-lo nas células da bainha, onde ocorrerá a redução, no ciclo C_3 (FURBANK; HATCH,1987) (Fig. 9). Essas diferenças metabólicas existentes entre as plantas com metabolismo C_3 e C_4, quando avaliadas, fornecem resultados importantes sobre a complexidade e as interações que existem entre a planta e o meio.

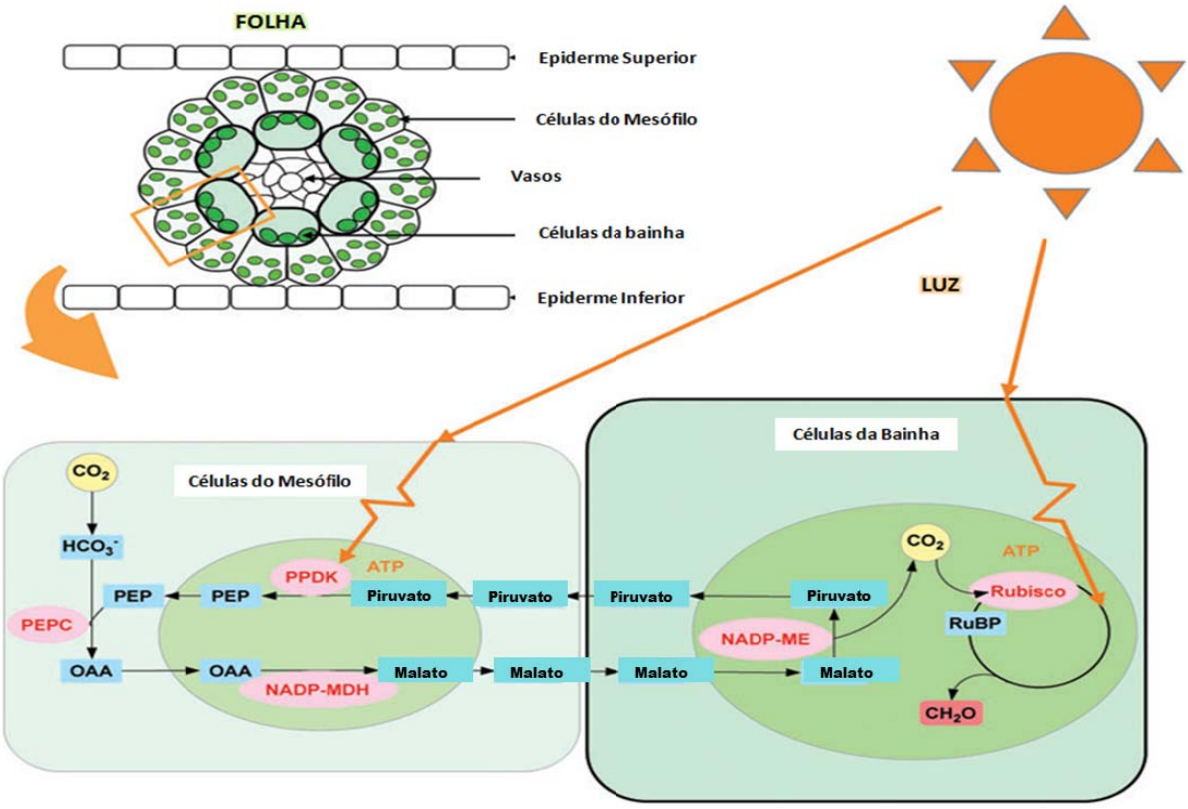

Figura 9. Metabolismo fotossintético C_4. Diferença espacial entre assimilação e redução de CO_2. (PEP = fosfoenolpiruvato; OAA = oxaloacetato; PPDK = ortofosfato dicinase; PEPC = fosfoenolpiruvato carboxilase; NADP-MDH = malato desidrogenase; NADP-ME = enzima málica) (ZHU et al., 2010).

Ao longo dos anos, o estudo do comportamento do metabolismo dos vegetais vem sendo alvo de diversos grupos de pesquisadores, o que resultou em

descobertas importantes que auxiliaram o avanço da agricultura moderna. Desde a década de 50 foi introduzida como prática comum na agricultura a utilização de substâncias químicas capazes de matar ou suprimir o crescimento de espécies específicas de plantas, substâncias estas conhecidas como herbicidas (SENSEMANN, 2007).

Os herbicidas químicos apresentam propriedades eficazes que permitem penetrar na planta, serem translocados até o seu destino (sítio de ação) em uma dose letal. Uma grande maioria de herbicidas inibe enzimas e compete por sítios de ligação específicos que são essenciais para o metabolismo das plantas. Estas moléculas são classificadas por grupos químicos e de acordo com o seu mecanismo de ação. Atualmente existem 15 diferentes mecanismos de ação de herbicidas (HRAC, 2012), entre eles os mais utilizados são os inibidores: da enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase), da enzima acetolactato sintase (ALS), da enzima 5-enolpiruvoil-chiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPs), do fotossistema II, da síntese de carotenóides e da síntese de clorofila.

Os herbicidas inibidores do FSII interrompem o fluxo de elétrons ligando-se a proteína D_1, no sítio onde se acopla a PQ_B, competindo com a plastoquinona pelo sítio de ligação na proteína D_1 (ARMEL et al., 2007) (Fig. 10). Destacam-se como exemplo de herbicidas com este mecanismo de ação o diuron, o metribuzim, a atrazina e o bentazon. As plantas que sofrem a ação destes herbicidas têm a produção de carboidratos extremamente reduzida pelo drástico declínio da taxa fotossintética (POWLES; YU, 2010). Porém a morte das plantas não é resultado apenas desta redução, pois a energia continua sendo absorvida pelo centro de reação do FSII e não é utilizada para a transferência de elétrons na fotossíntese, o que resulta na formação de clorofila triplet, que leva à formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) que causam danos as proteínas e membranas do vegetal (HUGIE et al., 2008).

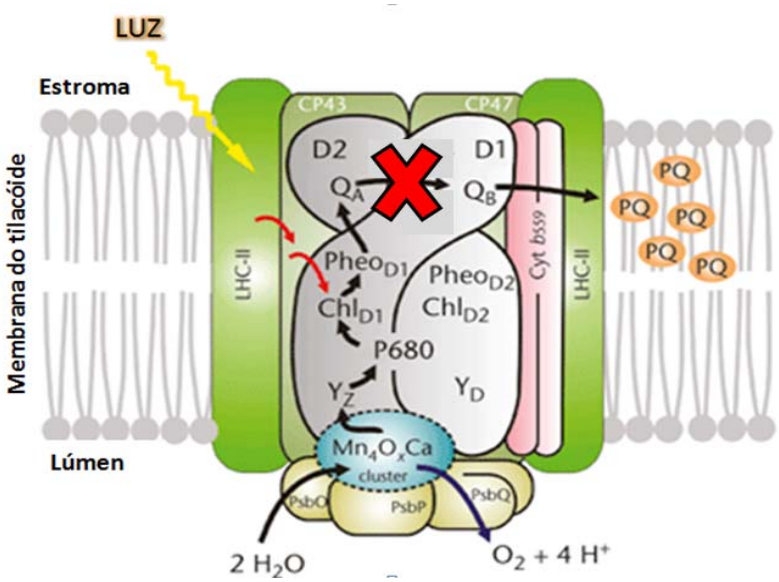

Figura 10. Ação de herbicidas inibidores de FSII. Bloqueio do transporte de elétron de Q_A para Q_B (representado pelo X) (Adaptado de:BUCHANAN et al., 2000; GOVINDJEE et al., 2010).

Além dos herbicidas inibidores de FSII, outros dois mecanismos de ação herbicida estão envolvidos diretamente com a atividade fotossintética das plantas, os inibidores da síntese de carotenóides e da síntese de clorofila.

A biossíntese de clorofilas é realizada em diversas etapas, iniciando-se com o ácido glutâmico que passa por diversas etapas de síntese e conversão em compostos intermediários até a formação das clorofilas *a* e *b* (WETTSTEIN et al., 1995). Os herbicidas inibidores da síntese de clorofilas inibem a ação da enzima protoporfirinogênio IX oxidase (PROTOX) (POWLES; YU, 2010), que realiza a conversão do intermediário protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX, etapa anterior a inserção do magnésio no processo de formação das clorofilas (BEALE; WEINSTEIN, 1990). Com a inibição da PROTOX a protoporfirinogênio IX acumulada sai dos cloroplastos para o citoplasma. No citoplasma esta molécula sofre uma oxidação enzimática formando protoporfirina IX, que no citoplasma não é utilizada como substrato para a enzima Mg-quelatase, que se localiza nos cloroplastos, responsável pela formação da Mg-protoporfirina IX (JACOBS; JACOBS,1993). A protoporfirina IX formada nos citoplasma, sem Mg, interage com o oxigênio e com a luz formando EROS que resultam na peroxidação dos lipídios da plasmalema (BECERRIL ; DUKE, 1989). Dentre os herbicidas inibidores da PROTOX encontram-se os grupos químicos difeniléteres, triazolinonas, ftamilidas e oxadiazóis (SENSEMANN, 2007).

Os carotenóides além da sua função como pigmentos acessórios, desempenham um papel essencial na fotoproteção dos vegetais (TRIANTAPHYLIDÈS; HAVAUX, 2009). Esta fotoproteção pode ser vista como uma válvula de segurança que libera o excesso de energia absorvida pelos pigmentos, antes que este possa causar danos ao sistema. Em condições normais, a energia em excesso absorvida pelas clorofilas é dissipada através dos carotenóides(TAIZ; ZEIGER, 2009). Assim, quando os carotenóides não estão presentes, a clorofila que está no estado triplet não dissipa energia e inicia reações de degradação, nas quais ela é destruída, processo conhecido por fotoxidação (STREIT et al., 2005). Além disso, antes da fotoxidação das clorofilas, estas podem reagir com o oxigênio molecular, formando oxigênio “singlet”.

Herbicidas inibidores da síntese de carotenóides atuam em duas diferentes rotas de formação destes pigmentos, dependendo do seu grupo químico. Os herbicidas do grupo químico das isoxazolidinonas inibem a atividade da deoxixilulose fosfato sintase (DXP sintase), responsável pela síntese de isoterpenóides, precursores básicos dos carotenóides, numa rota alternativa, denominada rota metileritritol 4-fosfato (MEP), que ocorre no cloroplasto (FERHATOGLU; BARRET, 2006). Os demais grupos químicos (tricetona, isoxazol e piridazinona) inibem a ação da enzima 4-hidroxifenil piruvato dioxigenase (4-HPPD), que realiza a conversão de 4-hidroxifenil piruvato em homogentisato, precursores da rota de formação de plastoquinona, que é cofator da enzima fitoeno desidrogenase, que participa da rota do mevalonato de formação de carotenóides, convertendo fitoeno em fitoflueno (MCCURDY et al., 2008).

A identificação da forma como as plantas se comportam na presença de herbicidas pode fornecer informações valiosas sobre o comportamento destas. Devido a isto, diversos estudos sobre o metabolismo dos vegetais estão sendo realizados utilizando herbicidas (CHEN et al., 2008; EULLAFFROY et al.,2009; SMIT et al., 2009). Diversos métodos vêm sendo empregados para o estudo de alterações no comportamento dos parâmetros fisiológicos de plantas expostas a estresses ambientais, inclusive os causados pela aplicação de herbicidas, como a análise da fluorescência da clorofila *a* e as medições das trocas gasosas.Muller et al. (2008), avaliaram a fluorescência da clorofila *a*, pelo método PAM, em algas expostas a herbicidas inibidores de FSII e observaram um declíio nos valores de F_M’ e consequente aumento de NPQ destas plantas em relação ao controle.

Trabalhos envolvendo plantas de*Alternaria alternata* expostas a ácido tezuônico verificaram aumento da faseF-J, em valores próximos a F_M,mostrando quaseumafase de indução oúnicaem vez deumtransientecom doispassos intermédios(J e I) (CHEN et al., 2008).Entretanto, estes mesmos autores, nãoencontraram alterações significativas nos valores deF_0e$F_M$com o tempode exposição das plantas ao ácido tezuônico. Catunda et al. (2005), obtiveram médias de rendimento quântico máximo do FSII (F_V/F_M) menores que as do controle, sugerindo redução no fluxo de elétrons, em plantas de abacaxi expostas a mistura de herbicidas inibidores de FSII e FSI.

Baseado no exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar os parâmetros fisiológicos relacionados à fotossíntese por meio de análises da fluorescência da clorofila *a* transiente e modulada, e das trocas gasosas de discos foliares deplantas com metabolismo C_3 e C_4 submetidos a herbicidas inibidores do FSII, da síntese de carotenóides e da síntese das clorofilas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Instalação do experimento e aplicação dos tratamentos

O experimento foirealizado noLaboratório de Metabolismo Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas, situada no município de Capão de Leão, RS. Sementes de milho e soja foram colocadas para germinar em vasos de polietileno, com capacidade de 10L contendo solo (previamente adubado com uréia) como substrato (Fig.11), em cada vaso foram colocadas 10 sementes, e após a emergência foi realizado o desbaste deixando cinco plantas por vaso, os quais foram mantidos em casa de vegetação, e sempre que necessário os vasos foram irrigados

Figura 11. Visão geral do experimento em casa-de-vegetação.

Quando as plantas estavam em estádio vegetativo pleno, procedeu-se à obtenção dos discos foliares de 10cm^2 (Fig.12A) utilizando-se sempre, folhas maduras. A seguir os discos foram imersos em água destilada por 20 minutos, para

evitar o efeito da difusão da água, em seguida foram imersos em soluções de herbicidas com diferentes modos de ação (tab. 1) nas concentrações de (0, 100, 250 e 500μM), sendo mantidos em caixas de plástico tipo gerbox, por um período de duas horas no escuro (Fig.12B). A concentração de 0μM foi considerada controle.

Após duas horas de imersão nos herbicidas, os discos foliares foram retirados das caixas gerbox, lavados com água destilada e secos com papel toalha, para imediata realização dos ensaios.

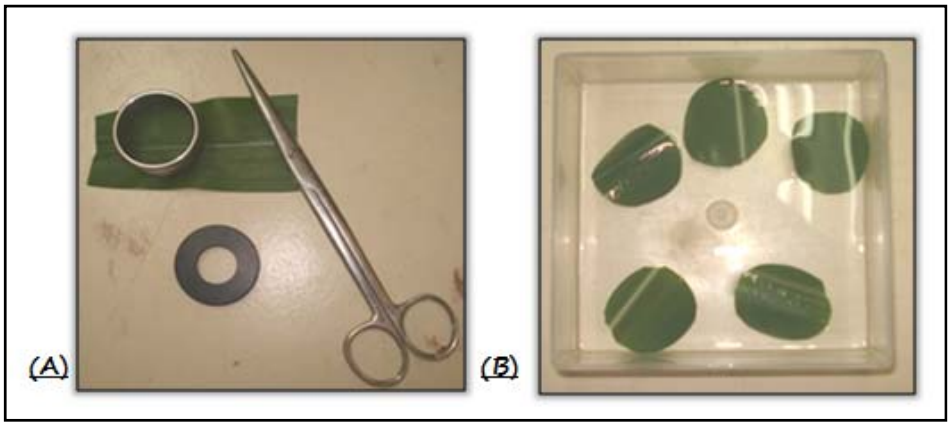

Figura 12. Obtenção dos discos foliares de plantas de milho (A) e imersão em caixas gerbox contendo os tratamentos herbicidas (B).

Tabela 1. Características dos tratamentos herbicidas utilizados

MECANISMO DE AÇÃO	INGREDIENTE ATIVO	NOME COMERCIAL	GRUPO QUÍMICO
Inibido de Fotossistema II	Bentazon	Basagran®	Bentazotadiona
Inibidor da Síntese de Carotenóides	Clomazone	Escudo 500 EC®	Isoxizoladinonas
Inibidor da Síntese de Clorofilas	Fomesafen	Flex®	Difeniléteres

2.2. Ensaio I: Efeito dos herbicidas sobre a fluorescência transiente

Após o período de imersão dos discos nos respectivos tratamentos a fluorescência transiente da clorofila *a* foi medida utilizando-se um fluorômetro portátil (HandyPEA, Hanstech, King's Lynn, Norkfolk, UK). Para tanto, os discos foram inseridos nos clipes fornecidos pelo fabricante e colocados no escuro por 20 minutos, sendo utilizadas 15 repetições por tratamento. A emissão de fluorescência foi induzida em uma área de 4mm de diâmetro da folha pela exposição da amostra a

doispulsos de luz saturante numa intensidade de 3.000µmol m^{-2} s^{-1},sendo o intervalo entre os pulsos de 500ms (tempo suficientemente curto deescuroparapermitir somentea reabertura doRCs redutores de Q_B).

A partir da curva de emissão de fluorescência transiente obtida após o primeiro pulso, as intensidades determinadas a 50µs (fluorescência inicial - F_0), 100, 300µs, 2 (F_J) e 30 (F_I) ms e F_M (fluorescência máxima), foram utilizadas para o cálculo dos parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER; STRASSER, 1995). Na tab. 2, são apresentados os principais parâmetros do Teste JIP.

Após o segundo pulso saturante, na mesma amostra, as intensidades de fluorescência inicial (F_0*) e fluorescência máxima(F_M*) foram utilizadas para determinar estimativa de centro de reação não-redutores de Q_B (V_0* = [(F_V/F_M) – (F_V*/F_M*)] / (F_V/F_M)).

Tabela 2. Principais parâmetros do Teste JIP (Adaptada de: STRASSER et al., 2004 e YUSUF et al., 2010)

Parâmetros de fluorescência calculados a partir dos dados primários obtidos	
$F_V = F_M - F_0$	Fluorescência variável
F_V/F_M	Rendimento quântico máximo do FSII
V_t	Fluorescência variável relativa em um tempo "t"
V_j	Fluorescência variável relativa em relação ao nível J
V_i	Fluorescência variável relativa em relação ao nível I
$M_0 = 4(F_{300\mu s}–F_0)/(F_M–F_0)$	Declive inicial aproximado(em ms^{-1}) dafluorescênciatransiente V = f (t)
$S_s = V_J/M_0$	Área totalnormalizadacomplementarcorrespondenteapenas a fase OJ(refleteum únicovolume de eventosde reduçãode Q_A)
$S_m = (Area)/(F_M – F_0)$	Área totalnormalizadacomplementaracima da curva OJIP (refletemúltiplos eventos de reduçãoQ$_A$)
$N = S_m/S_s$	Número total de elétrons transferidos para a cadeia de transporte de elétrons entre o tempode 0 et (necessário para atingir F_M)
Atividade específica por centro de reação (RC)	
$ABS/RC = M_0 (1/V_J) (1/\varphi Po)$	Medida do tamanho aparente do sistema antena ou o fluxo de absorção por RC
$TR_0/RC = M_0 (1/V_J)$	Máxima taxa pela qual um éxciton é capturado pelo RC resultando em uma redução da plastoquinona (Q_A^-)
$ET_0/RC = M_0 (1/V_J) \Psi_0$	Reoxidação da Q_A^- via transporte de elétrons em um RC ativo
$DI_0/RC = (ABS/RC) – (TR_0/RC)$	Razão de dissipação total de energia de excitação não capturada do total de RC, sendo a dissipação neste caso à perda de energia na forma de calor
RE_0/RC	Redução do aceptor final de elétrons no lado do aceptor de elétrons do FSI por RC
Rendimentos energéticos ou taxas de fluxo	
$\varphi P_0 = TR_0/ABS = F_V/F_M$	Rendimento quântico máximo fotoquímico
$\varphi_{E0} = ET_0/ABS$	Rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons
$\varphi_{D0} = 1 – \varphi Po = (F_0/F_M)$	Rendimento quântico para dissipação de energia
$\varphi_{R0} = RE_0/ABS$	Rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o aceptor final de elétrons do FSI
Eficiências	
$\psi_0 = ET_0/TR_0$	Eficiência com que um éxciton capturado no RC pode mover um elétron de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons
$\rho_0 = RE_0/TR_0$	Eficiência com que um éxciton capturado no RC pode mover um elétron dentro da cadeia de transporte de elétrons de Q_A^- para os aceptores finais de elétrons do FSI
$\delta_0 = RE_0/ET_0$	Eficiência com que um elétron pode mover o intersistema de aceptores de elétrons reduzidos no intersistema para o aceptor final de elétrons do FSI
Índices de desempenho	
$PI_{ABS} = \frac{RC}{ABS} \times \left(\frac{\varphi_{P0}}{1-\varphi_{P0}}\right) \times \left(\frac{\Psi_0}{1-\Psi_0}\right) = \frac{RC}{ABS} \times \frac{TR_0}{DI_0} \times \frac{ET_0}{1-ET_0}$	Índice de desempenho fotossintético (conservação de energiaa partir do éxcitonpara a redução dos aceptores de elétrons do intersistema)
$PI_{ABS,total} = PI_{ABS} \times (\frac{\delta_0}{1-\delta_0})$	Índice de desempenho fotossintético total (conservação de energiaa partir deéxcitonpara a reduçãode aceptoresfinaisdo FSI)

2.3. Ensaio II: Efeito dos herbicidas sobre a fluorescência modulada da clorofila *a* e trocas gasosa

As determinações da fluorescência modulada das clorofilas*a* e de trocas gasosasforam realizadas utilizando-se do analisador de gás a infravermelho IRGA LI 6400XT (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA), com câmara de fluorescência (6400-40 Leaf Chamber Fluorometer), com 380μmol mol^{-1} de CO_2 dentro da câmara. Para as avaliações foram utilizadas cinco repetições por tratamento e protocolo como descrito a seguir.

2.3.1. Cinética de relaxamento de fluorescência

Após os discos foliares serem submetidos aos tratamentos, os mesmos foram lavados com água destilada e secos com papel toalha, e imediatamente acondicionados na câmara de fluorescencia e adaptados ao escuro por 10min. Em seguida, um pulso de luz saturante (8.000μmol m^{-2} s^{-1}) foi emitido e assim se obteve os valores de fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_M). A seguir, a luz actínica foi ligadacom radiação fotossinteticamente ativa de 100μmol m^{-2} s^{-1}, condição em que os discos permaneceram por 10 minutos, para estabilizar as taxas fotossintéticas, findo este período iniciou uma sequencia de 20 pulsos de luz saturante (8.000μmol m^{-2} s^{-1}), com intervalo de 30 segundos entre cada pulso. Em cada pulso foram obtidos os parâmetros,F_M' – fluorescência máxima em um estado adaptadoà luz eF_0' – fluorescência mínima medida logo apósdesligar aluzactínica (pulso escuro), Fs – fluorescência alcançada no “steady-steate” (Fig.13).

Obtidos estas intensidades de fluorescência, foram calculados os seguintes parametros: fluorescência variável em um estado adaptado a luz ($Fv' = F_M' - F_0'$); coeficientes de extinção fotoquímico ($qP = (F_M' - F_S)/(F_M' - F_0')$) e não-fotoquímico ($qN = (F_M - F_M')/(F_M - F_0')$ e $NPQ = (F_M-F_M')/F_M'$)); eficiência quântica fotoquímica efetiva em estado adaptado a luz (F_V'/F_M') e rendimento quântico efetivo do FSII ($\varphi_{FSII} = (F_M' - F_S)/ F_M'$) (GENTY et al., 1989).

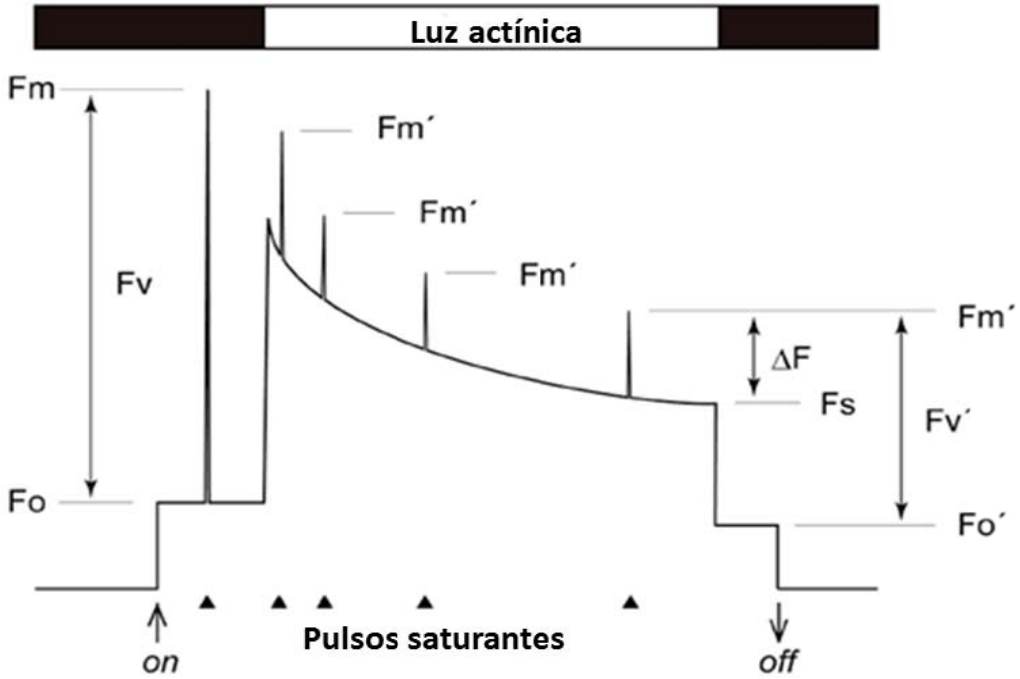

Figura 13. Análise geral da cinética de relaxamento de fluorescênciapelo métododе pulsos saturantes em função do tempo (Adaptado de: SCHEREIBER, 2004).

2.3.2. Curvas de fluorescência em resposta a luz

Em conjunto de discos foliares distintos foram realizadas as determinações dasrespostas fotossintéticas e de fluorescência a diferentes intensidades de luz.

Para estas medições, os discos foliares foram colocados na câmara de fluorescência, sem a necessidade de adaptação ao escuro, e mantidos por 3 minutos em diferentes intensidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo (2.000, 1600, 1200, 800, 400, 100 e 0μmol m^{-2} s^{-1}). Imediatamente após cada período de luminosidade foi aplicado um pulso de luz saturante (8000μmol m^{-2} s^{-1}). Após o pulso saturante foram determinadas as intensidades de fluorescência F_M', F_0' e Fs, e a partir destas calculou-se os seguintes parâmetros: coeficiente de extinção fotoquímico (qP); eficiência fotoquímica efetiva (F_V'/F_M');rendimento quânticodo FSII, calculado a partir da fluorescência (φ_{FSII} = ((F_M'-F_S) / F_M')); rendimento quântico, calculado a partir da assimilação de CO_2 (φ_{CO2} = ((A – A_{escuro}) / (I x α_{folha})), onde A éa taxa de assimilação, A_{escuro}a taxa de assimilação no escuro(ambos em$\mu molCO_2$ $m^{-2}s^{-1}$), I é a densidade do fluxo de fótons incidente(μmol $m^{-2}s^{-1}$), e α_{folha}é a absorbância dafolha (neste trabalho foi utilizado 0,85); e taxa de transporte de elétrons no FSII (ETR = φ_{FSII}x *f*x I x α_{folha}), onde *f*é a fraçãode fótonsabsorvidosquesãoutilizadosno FSII(neste trabalhoassumido como sendo0,5) (EARL; TOLLENAAR, 1998).

Associado as determinações de fluorescência modulada, foram determinados os parâmetros de trocas gasosas em cada intensidade de luz: taxa de assimilação líquida (*A*, μmol m^{-2} s^{-1}), condutância estomática (g_s, mol m^{-2} s^{-1}) e concentração intercelular de CO_2 (C_i, μmol mol^{-1}). Os parâmetros fotossintéticos foram calculados de acordo com o proposto por Caemmerer e Farquhar (1981).

2.4. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 3x4, sendo o fator A o tipo de herbicida (tab. 1) e o fator B a concentração do herbicida (0, 100, 250 e 500μM).Nos ensaios I e II, foram utilizadas 15 e 5 repetições por tratamento, respectivamente.

Os dados de F_0, F_J, F_I, F_M, V_J, V_I, S_S, S_M, N, F_0*, F_M* e V_0* nos ensaiosforam submetidos à análise da variância (ANOVA, $p \leq 0,05$), e havendo significância as médias foram comparadas através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. SOJA

3.1.1. Fluorescência transiente

3.1.1.1. Cinética de emissão de fluorescência transiente da clorofila a

A análise da emissão de fluorescência transiente da clorofila *a*, forneceu informações sobre a intensidade e a cinética de cada fase das curvas OJIP, obtidas a partir de discos foliares de soja submersos em diferentes soluções herbicidas (Fig. 14). Todos os transientes foram normalizados entre os passos O e P, a fim de revelar alterações mais específicas na forma destes entre os dois extremos. Os resultados referentes ao controle demonstram uma curva dupla sigmóide típica.

Para o herbicida bentazon foi observado comportamento dose-dependente, onde o aumento das doses ocasionou injúrias mais severas ao aparato fotossintético dos discos foliares de soja (Fig. 14A). A curva OJIP correspondente à dose de 500μM de bentazon perdeu totalmente a característica sigmóide entre os passos J-I, apresentando basicamente uma fase de indução única, resultado do bloqueio do transporte de elétrons de Q_A para Q_B, mecanismo de ação deste herbicida.Nesta dose saturante de inibidor de FSII, o nívelde fluorescênciano passoJfoi próximo a F_M, devido ao fato de todas as$Q_A$se apresentarem reduzidas.Na dose de 250μM de bentazon o transiente ainda apresenta os passos J e I definidas, porém com intensidades de fluorescência superiores às do controle. Foram observados elevações nos níveis de V_J e V_I, resultado das intensidades elevadas de F_J e F_I, com o aumento crescente das doses do herbicida bentazon (tab. 3).

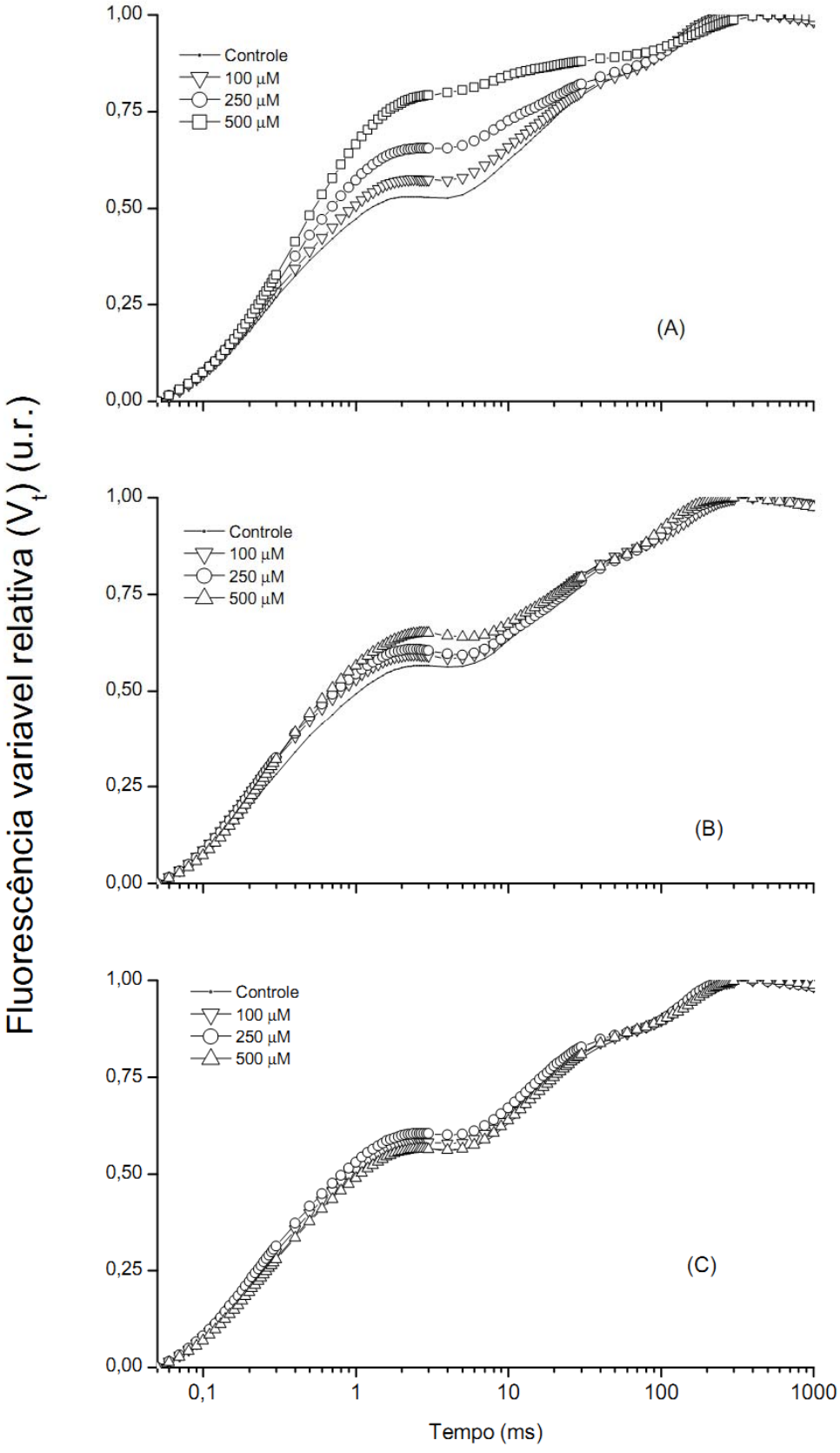

Figura 14. Fluorescência variável relativa (V_t) em discos foliares de soja submetidos a diferentes doses de herbicidas (A) Bentazon, (B) Clomazone e (C) Fomesafen. (n = 15).

A dose de 500μM do herbicida bentazon elevou em 20% S_S, o que demonstra aumento no volume de eventos responsáveis pela redução de Q_A antes do bloqueio do transporte de elétrons. Entretanto, os múltiplos eventos responsáveis pela redução de Q_A acima da OJIP (S_m) sofreram redução de 17% para esta mesma dose, o que resultou em decréscimo de 32% no número total de elétrons transferidos para a cadeia de transporte de elétrons (N). O mesmo ocorreu para as doses inferiores a 500μM de bentazon, porém em menores intensidades.

A ação do herbicida clomazone, inibidor da síntese de carotenóides, nos discos foliares de soja causou suaves alterações na curva OJIP, para todas as doses testadas, quando comparadas ao controle (Fig. 14B). A dose de 500μM deste herbicida reduziu em 10% os níveis de F_M e aumentou na mesma intensidade os níveis de V_J. Os múltiplos eventos responsáveis pela redução de Q_A acima da OJIP (S_m) e o número total de elétrons transferidos para a cadeia de transporte de elétrons (N) sofreram redução de 17% para esta mesma dose (tab. 3). As doses de 100 e 250μM de clomazone resultaram em descréscimo nos valores de F_M, porém não ocasionando redução nos valores de S_m e N.

As curvas transientes OJIP obtidas dos discos foliares tratados com o herbicida fomesafen, inibidor da síntese de clorofilas, não apresentaram diferença em relação ao controle (Fig. 14C). A dose de 250μM resultou em elevação significativa nos níveis de F_J e V_I, porém inferiores a 7% (tab. 3). Esta mesma dose reduziu os valores encontrados para S_m e N em 10%, quando comparados ao controle. O aumento da dose para 500μM, não aumentou a severidade dos danos ao aparato fotossintético dos discos foliares de soja tratados com o herbicida fomesafen.

Tabela 3. Intensidades de fluorescência da clorofila *a* nos passos O (F_o), J (F_J), I (F_I) e P (F_M), fluorescência variável relativa nos passos J (V_J) e I (V_I), área total normalizada complementar correspondente a fase OJ (S_S), área total normalizada complementar acima da OJIP (S_m) e número total de elétrons transferidos para a cadeia de transporte de elétrons (N), de discos foliares de soja submetidos a diferentes doses de herbicidas

Herbicida	Dose	Intensidade de fluorescência/parâmetros								
		F_0	F_J	F_I	F_M	V_J	V_I	S_S	S_m	N
Bentazon	Controle	772 c	2315 c	3081 ns	3684 ns	0,531 c	0,793 c	0,490 c	27,4 a	56,1 a
	100 µM	808 b	2471 b	3137	3716	0,573 c	0,800 c	0,506 bc	25,2 ab	49,9 b
	250 µM	841 b	2632 b	3092	3581	0,658 b	0,823 b	0,537 b	24,7 b	46,0 c
	500 µM	958 a	3028 a	3317	3646	0,775 a	0,879 a	0,592 a	22,7 c	38,4 c
Clomazone	Controle	795 ns	2359 ns	3029 a	3590 a	0,564 b	0,800 ns	0,497 ns	27,5 a	55,4 a
	100 µM	795	2249	2759 b	3253 b	0,592 b	0,798	0,467	26,6 a	56,9 a
	250 µM	793	2320	2773 b	3325 b	0,606 b	0,781	0,467	25,6 a	54,8 a
	500 µM	766	2347	2728 b	3242 b	0,641 a	0,792	0,499	22,8 b	45,6 b
Fomesafen	Controle	795 ns	2359 ab	3029 ns	3590 ns	0,564 ns	0,800 b	0,497 ns	27,5 a	55,4 a
	100 µM	814	2375 ab	3006	3513	0,578	0,811 ab	0,486	26,0 ab	53,4 a
	250 µM	834	2515 a	3155	3640	0,600	0,827 a	0,479	24,0 b	50,2 b
	500 µM	775	2336 b	3034	3572	0,561	0,808 ab	0,504	27,0 a	53,3 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p = 0,05) entre as doses dentro de cada herbicida, ns – não significativo; n = 15.

3.1.1.2. Teste JIP

A fluorescência transiente é rica em informações e sua intensidade pode ser utilizada para derivar diversos parâmetros (tab. 2) estabelecidos pelo Teste-JIP (STRASSER; STRASSER, 1995).A cuidadosa interpretação dos parâmetros medidos e calculados a partir deste teste fornece numerosas informações dos fluxos de energia através do FSII em diferentes níveis (STRASSER et al., 2004).

Os parâmetros obtidos através do Teste-JIP dos discos foliares de soja submersos em diferentes tratamentos herbicidas estão apresentados na Fig. 15. Para o herbicida bentazon foram observadas severas injúrias ao aparato fotossintético dos discos foliares de soja, sendo estas crescentes com o aumento da dose herbicida, o que pode ser observado pela redução dos parâmetros φ_{Eo}, φ_{Ro}, ψ_o, ET_0/RC e RE_0/RC (Fig. 15A), sendo que os índices de desempenho, PI_{ABS} e

$PI_{ABS,total}$ foram os mais sensíveis à ação do herbicida bentazon, apresentando redução de aproximadamente 70% dos seus níveis na dose de 500μM. As expressões para obtenção de PI_{ABS} e $PI_{ABS,total}$são multiparamétricas, ou seja, combinam várias respostas parciais do aparato fotossintético, fornecendo informações valiosas sobre o seu funcionamento. Os parâmetros ABS/RC, TR0/RC, DI0/RC, φ_{Do} e φ_{Po} (F_V/F_M), demonstraram insensibilidade ao herbicida bentazon, mesmo em doses elevadas.

Os discos foliares de soja tratados com o herbicida clomazone apresentaram comportamento semelhante para todas as doses testadas (Fig. 15B). Os parâmetros φ_{Eo}, ψ_o, ET_0/RC e RE_0/RC foram suavemente reduzidos, enquanto DI_0/RC sofreu leve elevação. O parâmetro mais afetado pela ação do herbicida clomazone foi o PI_{ABS}, sendo reduzido em aproximadamente 30% em relação ao controle.

Os resultados observados nos discos foliares de soja tratados com o herbicida fomesafen demonstram alteração apenas dos valores de PI_{ABS} e $PI_{ABS,total}$. Os dois parâmetros reduziram em 10 e 20%, respectivamente para as doses de 100 e 250μM do herbicida fomesafen. A dose de 500μM deste herbicida não apresentou alteração nos valores de nenhum dos parâmetros quantificados pelo Teste-JIP, quando comparados ao controle.

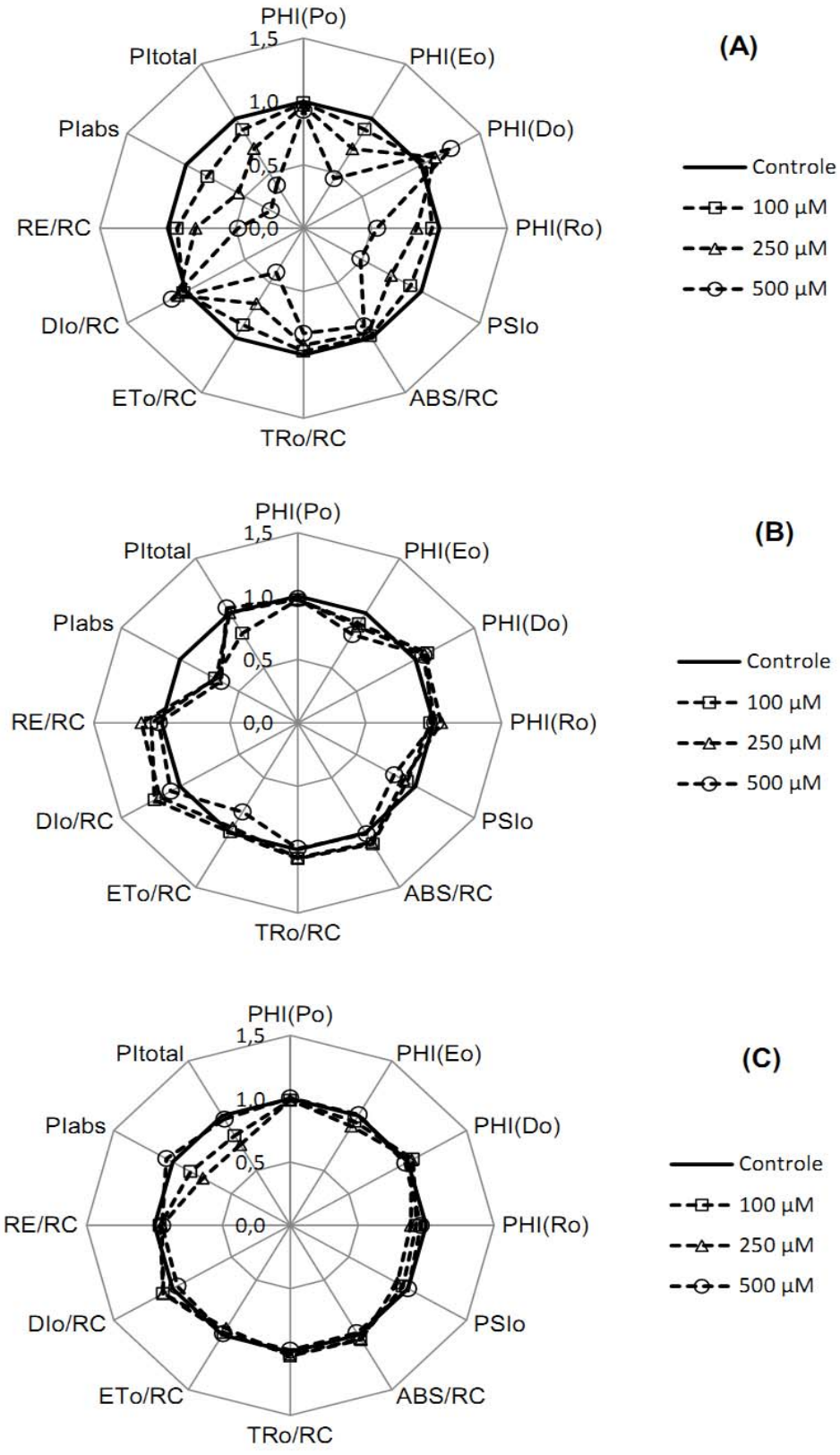

Figura 15. Alguns parâmetros do Teste JIP obtidos em discos foliares de soja submetidos a diferentes doses de herbicidas (A) Bentazon, (B) Clomazone e (C) Fomesafen, expresso em relação aos valores do tratamento controle (valor transformado para 1); (n = 15).

3.1.1.3. Análise de duplo flash

A análise da fluorescência transiente através da emissão de dois pulsos de luz consecutivos permitiu a avaliação da heterogeneidadedo FSII, dos discos foliares de soja tratados com diferentes hebicidas (Fig. 16). Por intermédio destas análises, foi possível distinguir os centros de reação redutores de Q_B dos não redutores.

Os transientes obtidos pela emissão do segundo pulso de luz nos discos foliares de soja tratados com o herbicida bentazon, demonstram diferença em relação ao controle para todas as doses testadas, sendo esta diferença intensificada com o aumento da dose. As intensidades de fluorescência encontradas nos discos foliares tratados com o herbicida foram inferiores aquelas encontradas no tratamento controle (Fig. 16A). Reduções nos valores de F_0* e V_0*, respectivamente, em 15 e 30%, fpram verificadas para a dose de 500μM do herbicida bentazon (tab. 4). Os valores de F_M* não sofreram alteração significativa para este herbicida.

A aplicação do herbicida clomazone provocou alteração nos transientes do segundo pulso em relação ao controle, entretanto nenhuma diferença entre as doses do herbicida foi encontrada (Fig. 16B). Os discos foliares tratados com este herbicida sofreram redução de 5 e 10% nos índices de F_0* e F_M*, respectivamente, em relação ao controle, indiferentemente da dose aplicada (tab. 4). Ao passo que os valores de V_0* para este herbicida, demonstraram suave elevação (inferior a 5%), para todas as doses avaliadas.

Os resultados referentes ao herbicida fomesafen não demonstraram diferença significativa nas intensidades de fluorescência obtidas a partir da emissão do segundo pulso de luz, entre as doses testadas e o tratamento controle (Fig. 16C).

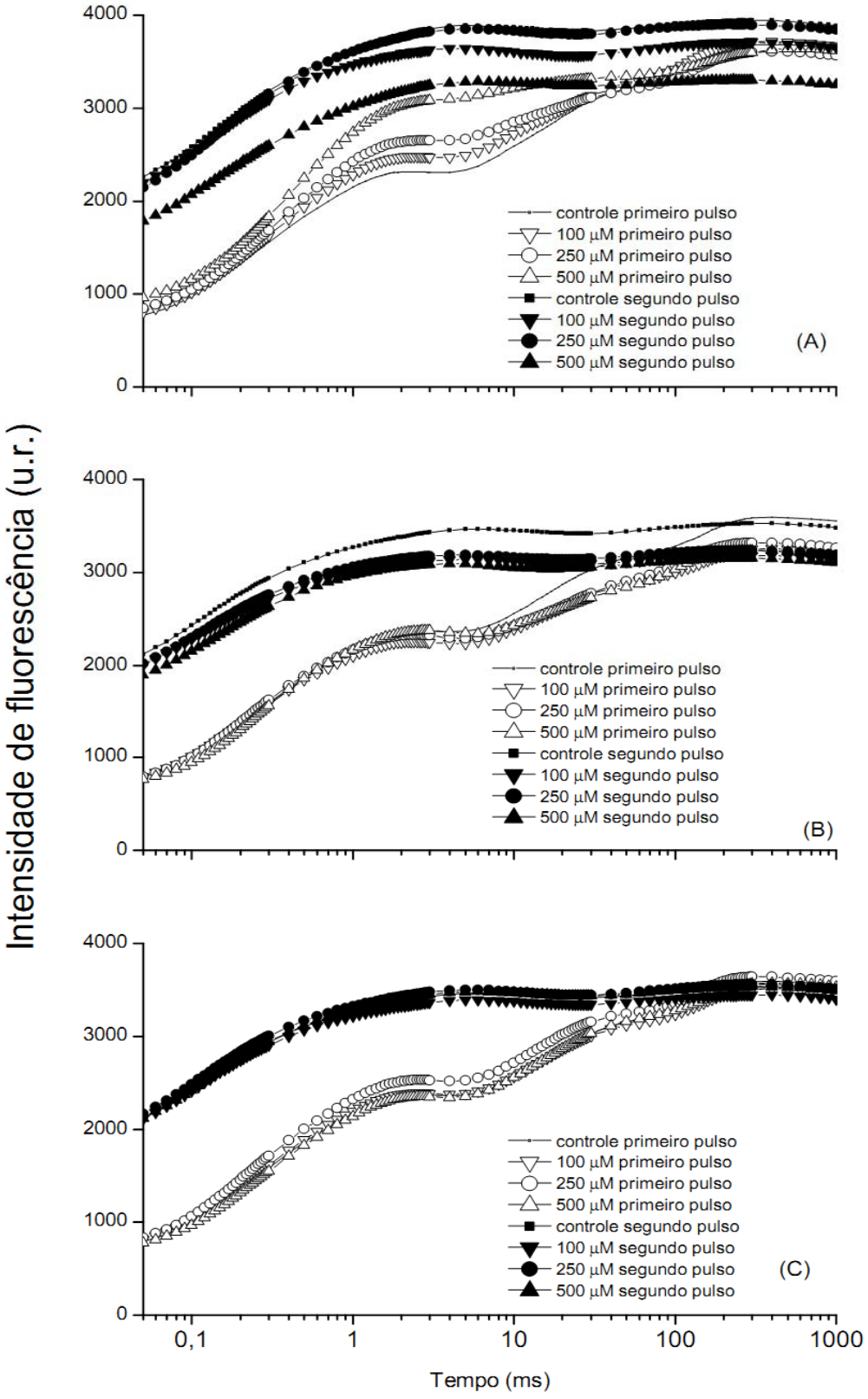

Figura 16. Intensidade de fluorescência da clorofila *a* obtido em discos foliares de soja submetidos a dois pulso saturante com intervalo de 500 ms (A) Bentazon, (B) Clomazone e (C) Fomesafen.

Tabela 4. Intensidades de fluorescência da clorofila *a*, em discos foliares de soja, nos passos O (F_0^*) e P (F_M^*) após o segundo pulso de luz saturante e a estimativa da fração de centro de reação não redutor de Q_B (V_0*)

		Intensidade de fluorescência/parâmetro		
Herbicida	Dose	F_0*	F_M*	V_0*
Bentazon	Controle	2137 a	3610 ^{ns}	0,483 a
	100 µM	2126 a	3635	0,468 b
	250 µM	1909 b	3506	0,403 c
	500 µM	1831 b	3597	0,334 d
Clomazone	Controle	2118 a	3524 a	0,487 b
	100 µM	2004 ab	3182 b	0,510 a
	250 µM	2017 ab	3238 b	0,506 a
	500 µM	1891 b	3155 b	0,476 b
Fomesafen	Controle	2118 ^{ns}	3524 ^{ns}	0,487 ^{ns}
	100 µM	2110	3444	0,495
	250 µM	2164	3559	0,491
	500 µM	2101	3504	0,489

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p = 0,05) entre as doses dentro de cada herbicida, ns – não significativo; n = 15

3.1.2. Fluorescência modulada

3.1.2.1. Análise de cinética de relaxamento

A análise da cinética de relaxamento da fluorescência em função de uma sequencia de pulsos de luz saturante, proporcionou as avaliações da atividade fotossintética dos discos foliares de soja adaptados a luz.

Os resultados do tratamento controle demonstraram comportamento típico para todas as variáveis avaliadas (Fig. 17). Os parâmetros F_0' e F_s foram constantes em todos os pulsos de luz saturante, sendo mantidos aproximadamente em 500 e 600, respectivamente. Os níveis de F_M', F_v'/F_M', φ_{FSII} e qPdescresceram com a sequencia de pulsos saturantes para o tratamento controle, demonstrado pela suave inclinação das retas obtidas para estes parâmetros, apresentando valores mínimos de aproximadamente 1100, 0,6, 0,4 e 0,6, respectivamente. Inversamente, os níveis de qN e NPQ aumentaram com a sequencia de pulsos de luz saturantes, apresentando valores máximos, no tratamento controle, de aproximadamente 0,55 e 0,95, respectivamente. Para o herbicida bentazon foram verificados aumentos nas

intensidades de fluorescência em todas as doses avaliadas, quando comparadas ao tratamento controle (Fig. 18). No primeiro pulso saturante foram observadas intensidades de fluorescência muito próximas para todas as doses de bentazon, entretanto, ao longo da sequencia de pulsos, foram verificadas curvas com inclinações mais acentuadas de acordo com o aumento da dose, o que demonstra menor desempenho do aparato fotossintético dos discos foliares de soja, nas doses mais elevadas. A aplicação do herbicida bentazon aproximou os valores de F_M' e F_s, chegando a valores iguais destas duas variáveis na dose de 500μM.

O parâmetro F_V'/F_M' sofreu drástica alteração com o aumento da dose herbicida, sendo reduzido em 75% na dose de 500μM, quando comparada ao controle. Além disso, embora os valores de F_V/F_M sejam próximos para todas as doses aplicadas, a diferença entre este parâmetro e F_V'/F_M', salienta a baixa eficiência fotoquímica efetiva, nas doses mais elevadas do herbicida betazon. Severa redução nos valores de φ_{FSII}também foi detectada com o aumento da dose herbicida, sendo de 30, 80 e 100%, respectivamente, para as doses de 100, 250 e 500μM. A mesma tendência foi verificada para qP, onde reduções semelhantes foram encontradas. Em contrapartida, foram verificadas elevações de até 50% nos valores de qN na aplicação da dose de 500μM. A inclinação da curva obtida para NPQ dos discos foliares de soja tratados com o herbicida bentazon foi semelhante a do controle, porém com valores iniciais inferiores, exceto para a dose de 100μM onde NPQ se manteve praticamente constante durante a aplicação dos pulsos de luz (Fig. 18).

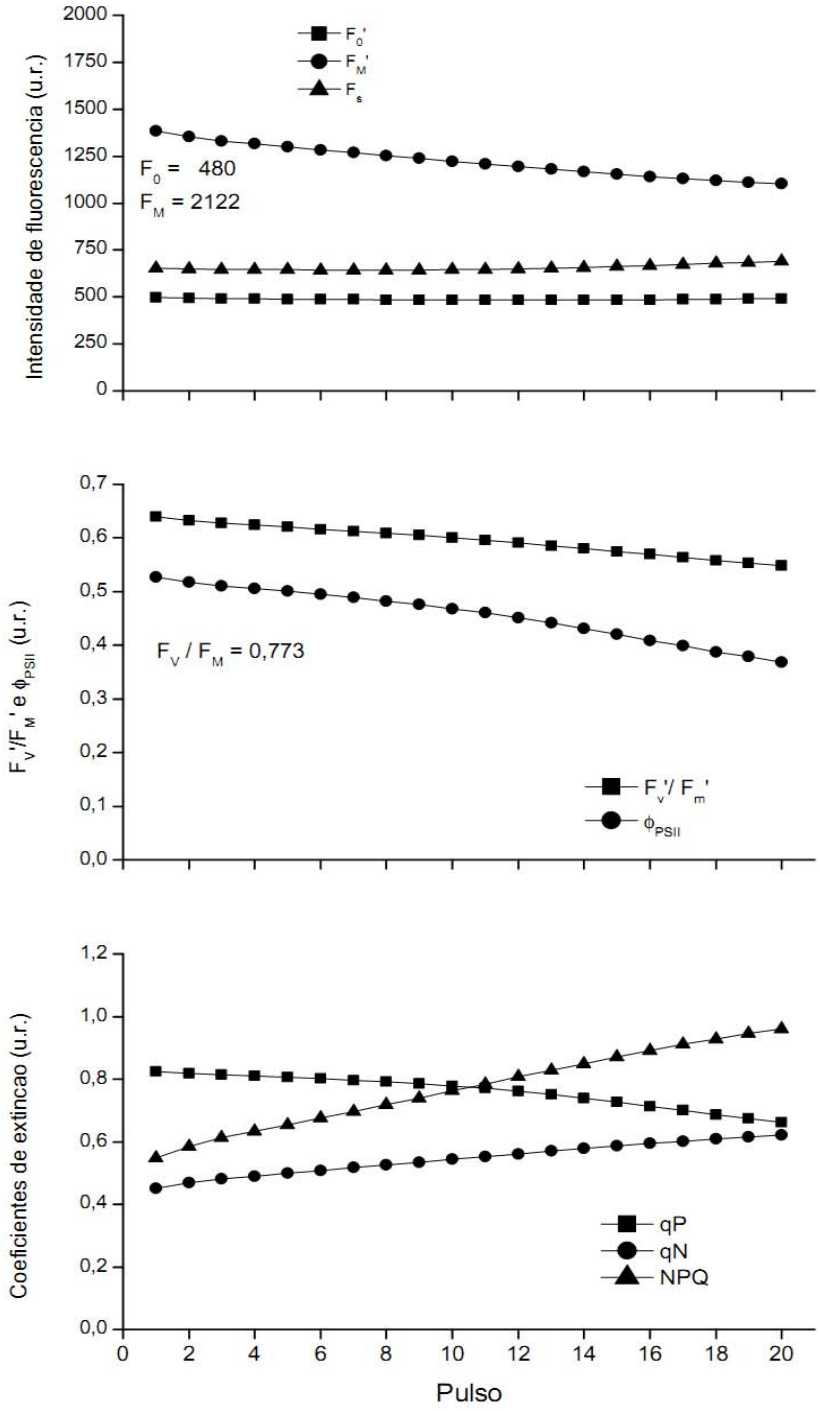

Figura 17.Análise de fluorescência modulada de discos foliares de soja submetidos ao tratamento controle (mais informações veja Figura 13). (F_0 = fluorescência inicial, F_M = fluorescência máxima em estado adaptado ao escuro, F_M' = fluorescência máxima em cada pulso saturante, F_s = fluorescência em estado de state-steady, F_V/F_M = eficiência fotoquímica máxima, F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica máxima efetiva, φ_{FSII} = eficiência fotoquímica do fotossistema II, qP = coeficiente de extinção fotoquímico, qN = coeficiente de extinção não fotoquímico e NPQ = coeficiente de extinção não fotoquímico.

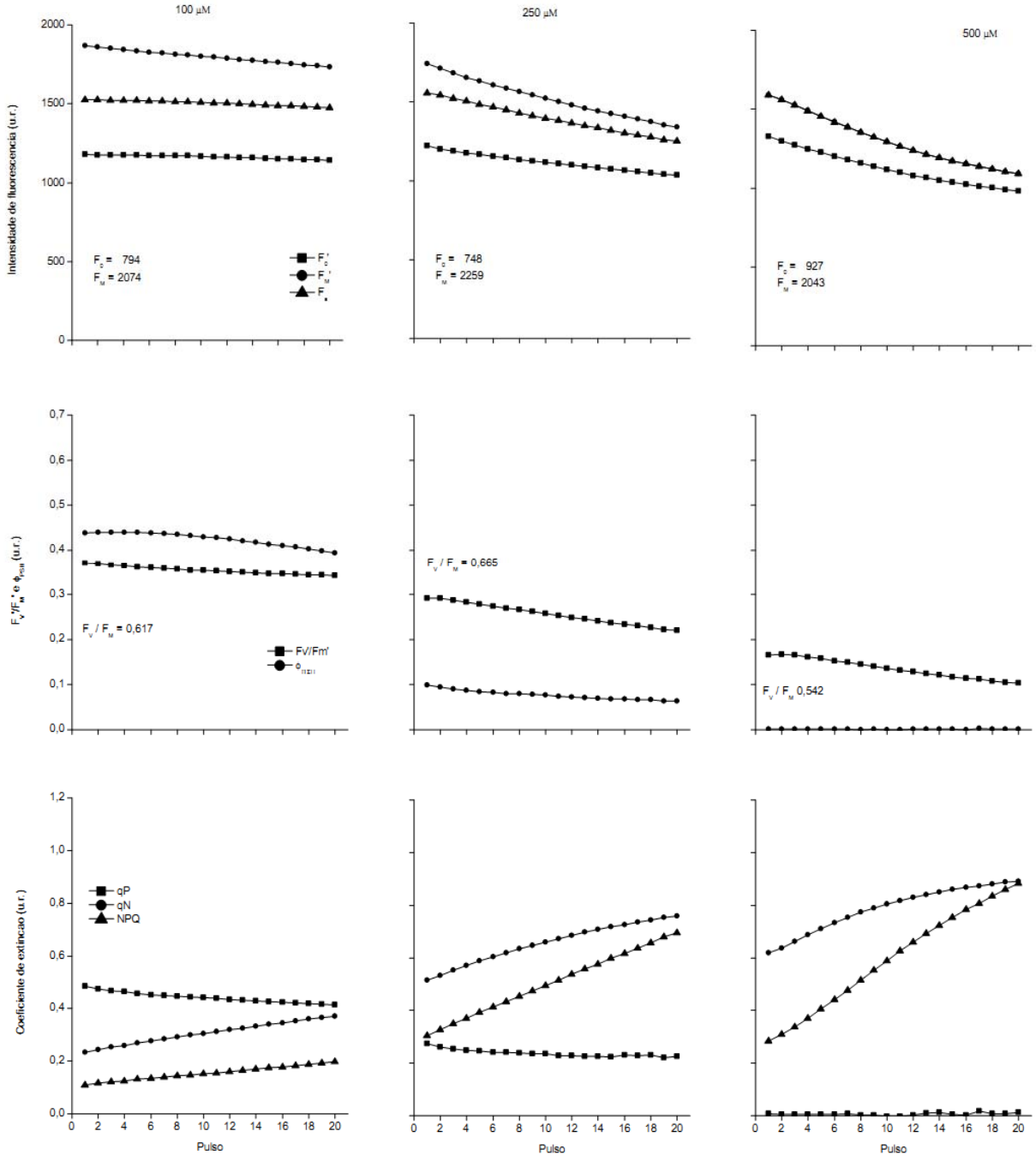

Figura 18. Análise de fluorescência modulada de discos foliares de soja submetidos ao herbicida bentazon em diferentes doses (mais informações veja Figura 13). (F_0 = fluorescência inicial, F_M = fluorescência máxima em estado adaptado ao escuro, F_M' = fluorescência máxima em cada pulso saturante, F_s = fluorescência em estado de state-steady, F_V/F_M = eficiência fotoquímica máxima, F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica máxima efetiva, φ_{FSII} = eficiência fotoquímica do fotossistema II, qP = coeficiente de extinção fotoquímico, qN = coeficiente de extinção não fotoquímico e NPQ = coeficiente de extinção não fotoquímico.

Para o herbicida clomazone aplicado na dose de 100μM nos discos foliares de soja, não houve alteração de nenhum dos parâmetros obtidos pela análise da cinética de relaxamento da fluorescência (Fig. 19), quando comparados ao tratamento controle (Fig. 17). No entanto, nas doses de 250 e 500μM foram observadas alterações nos parâmetros obtidos, sendo estas iguais para as duas doses. Para estas doses foi verificada elevação de aproximadamente 80% nos valores de F_s, chegando a níveis próximos de F_M', sem alteração de F_0'. Além disto, os valores de F_s e F_M', foram praticamente constantes, para todos os pulsos de luz saturante. Nestas mesmas doses os valores de F_V'/F_M',φ_{FSII}, e qP obtidos demonstraram redução de 40, 85 e 90%, respectivamente. Para qN foram encontrados valores iniciais 65% superiores aos do controle, sendo estes valores constantes ao longo da avaliação. Enquanto, o comportamento de NPQ foi distinto entre as duas doses, sendo decrescente para 250μM e crescente para 500μM de clomazone, porém com valores próximos um ao outro (Fig. 19).

Nos discos foliares de soja tratados com o herbicida fomesafen, não foram observadas alterações nos parâmetros da cinética de relaxamento de fluorescência, para as doses de 100 e 250μM (Fig. 20), em relação ao controle (Fig. 17), exceto redução de 30% de NPQ, no final dos pulsos de luz saturantes, chegando a valores próximos a qN na dose de 250μM.Na dose de 500μM de fomesafen houve redução de 20% nos valores de F_M' e elevação de 15% nos valores de F_s. Para F_V'/F_M', qN e NPQ não foram verificadas alterações, enquanto que φ_{FSII}e qP foram reduzidos em 55 e 40% respectivamente, nesta mesma dose, quando comparados ao controle (Fig. 20).

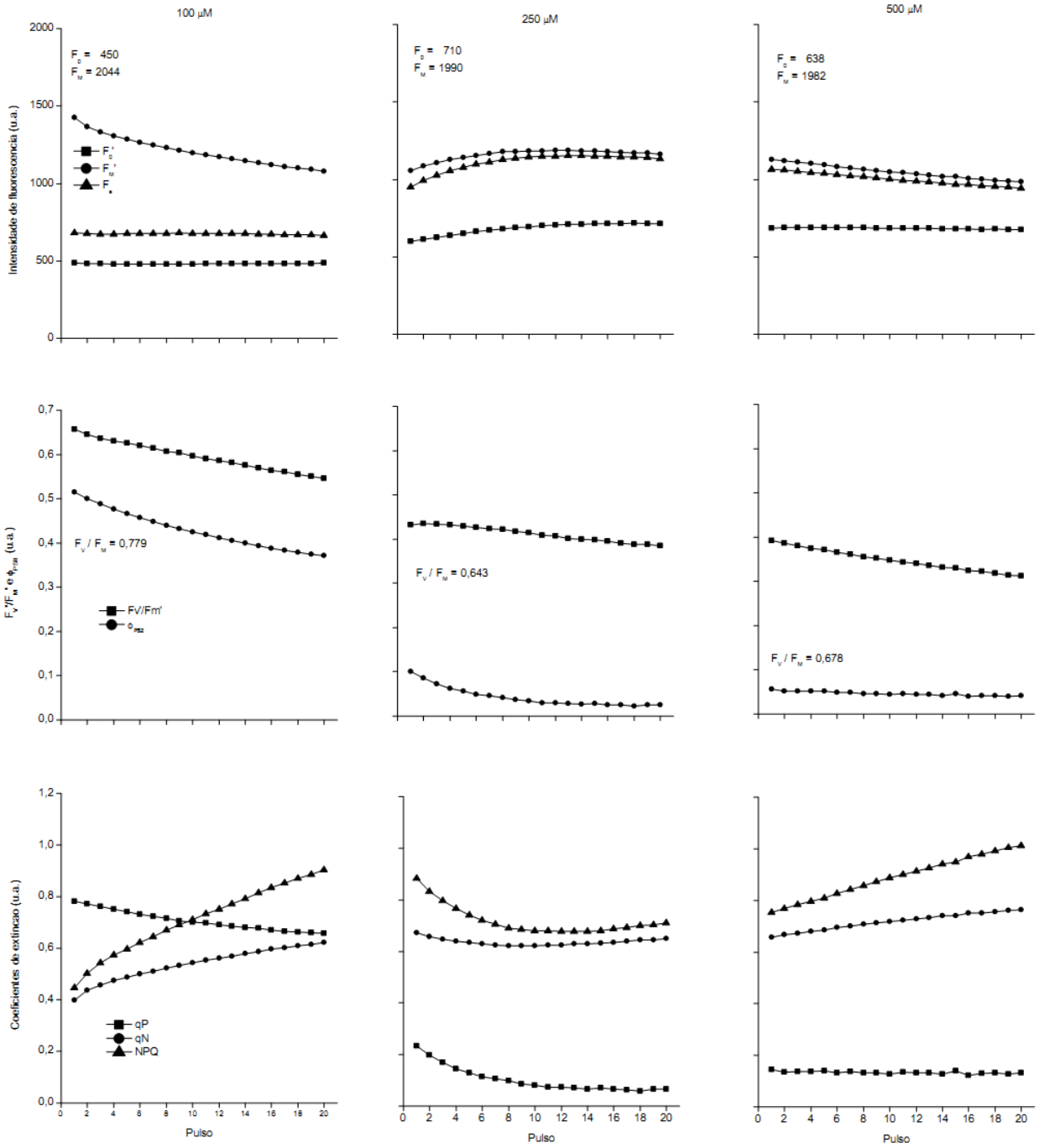

Figura 19. Análise de fluorescência modulada de discos foliares de soja submetidos ao herbicida clomazone em diferentes doses (mais informações veja Figura 13). (F_0 = fluorescência inicial, F_M = fluorescência máxima em estado adaptado ao escuro, F_M' = fluorescência máxima em cada pulso saturante, F_s = fluorescência em estado de state-steady, F_V/F_M = eficiência fotoquímica máxima, F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica máxima efetiva, φ_{FSII} = eficiência fotoquímica do fotossistema II, qP = coeficiente de extinção fotoquímico, qN = coeficiente de extinção não fotoquímico e NPQ = coeficiente de extinção não fotoquímico.

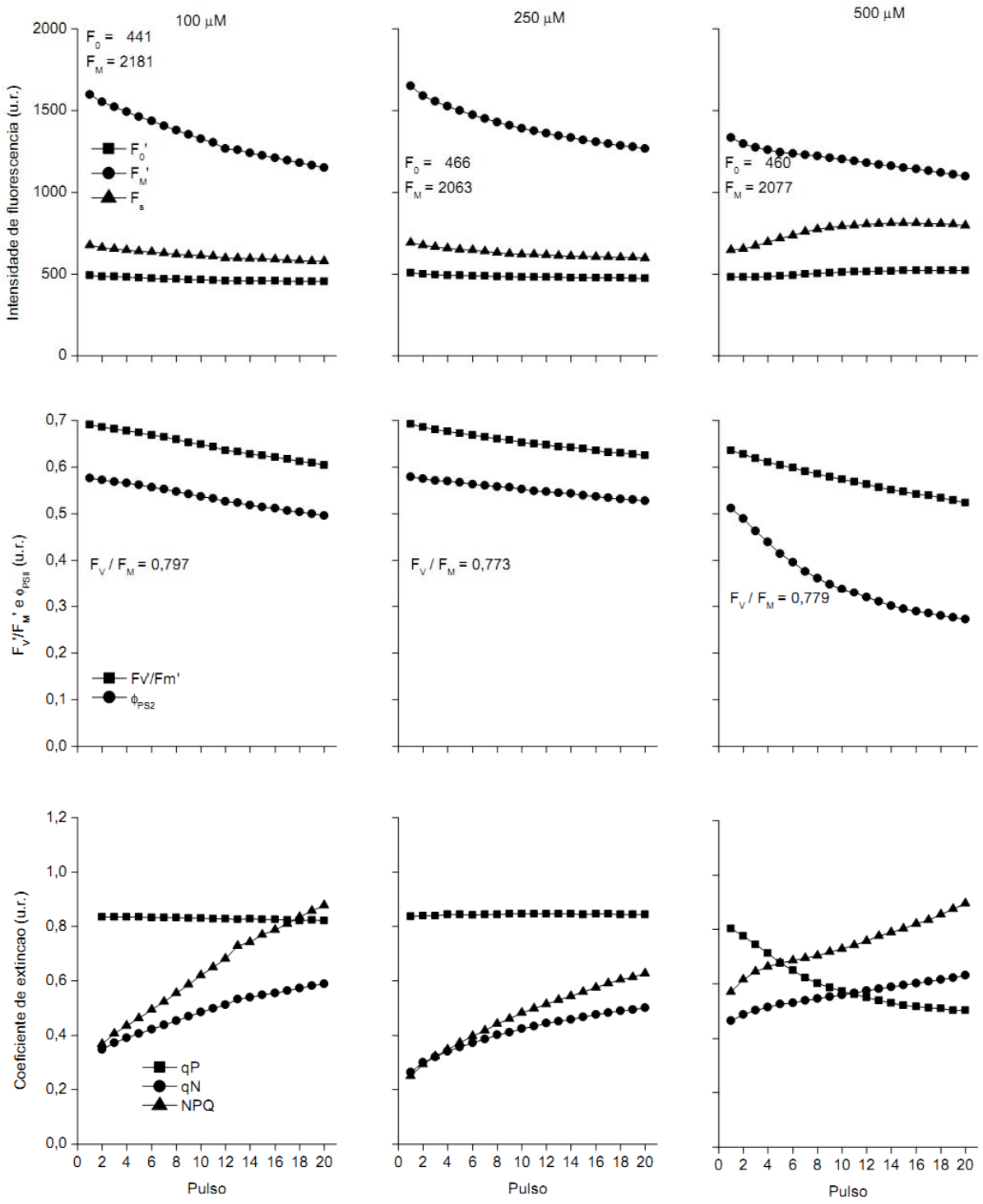

Figura 20. Análise de fluorescência modulada de discos foliares de soja submetidos ao herbicida fomesafen em diferentes doses (mais informações veja Figura 13). (F_0 = fluorescência inicial, F_M = fluorescência máxima em estado adaptado ao escuro, F_M' = fluorescência máxima em cada pulso saturante, F_s = fluorescência em estado de state-steady, F_V/F_M = eficiência fotoquímica máxima, F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica máxima efetiva, φ_{FSII} = eficiência fotoquímica do fotossistema II, qP = coeficiente de extinção fotoquímico, qN = coeficiente de extinção não fotoquímico e NPQ = coeficiente de extinção não fotoquímico.

3.1.2.2. Análise de curva de intensidade luminosa vs. parâmetros de PAM

A relaçãoentre a densidade de fluxo de luz e os parâmetros de fluorescência modulada permite avaliar a atividade do aparato fotossintéticoem diferentes condições fotossintéticas. Os discos foliares do tratamento controle apresentaram os parâmetros em intensidades típicas para plantas em condições normais (Fig. 21). Baixo valor de ETR foi observado no escuro, sendo este bruscamente elevado na densidade de fluxo luminososo de 500µmol m^{-2} s^{-1}, mantendo-se praticamente constante (em torno de 80) para as demais densidades do fluxo de luz. Enquanto,os valores de φ_{FSII}, F_V'/F_M' e qP descresceram com o aumento da radiação, apresentando valores iniciais de 0,5, 0,6 e 0,8 e finais de 0,1, 0,35 e 0,3, respectivamente.

O herbicida bentazon na dose de 100µM causou nas irradiações mais altas de luz, redução de até 40% nos valores de ETR. O φ_{FSII}, F_V'/F_M' e qP sofreram leve queda nos seus valores iniciais, porém o comportamento com o incremento da radiação foi semelhante ao encontrado no tratamento controle. Para as doses de 250 e 500µM foram observados resultados semelhantes, sendo estes mais intensos na dose mais alta do herbicida. Para estas doses foram verificadas reduções superiores a 90% para ETR e φ_{FSII}, e de até 80% para qP. Ao passo que F_V'/F_M' se manteve constante em todas as densidades de fluxo de luz, com valores até 70% inferiores aos obtidos no tratamento controle (Fig. 22).

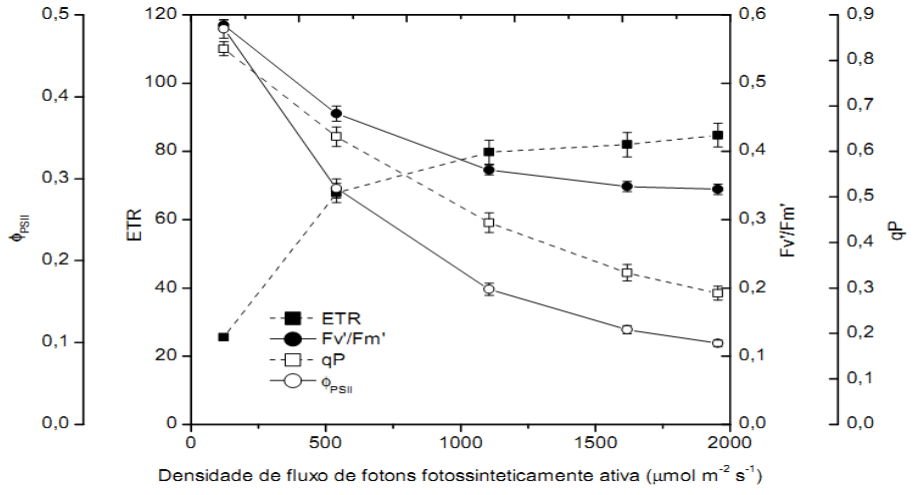

Figura 21. Curva de resposta à luz para os parâmetros de fluorescência modulada em discos foliares de soja submetidos ao tratamento controle. (φ_{FSII} = rendimento quântico do FSII, calculado a partir da fluorescência; ETR = taxa de transporte de elétrons no FSII; F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica efetiva; qP = coeficiente de extinção fotoquímico) (média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos).

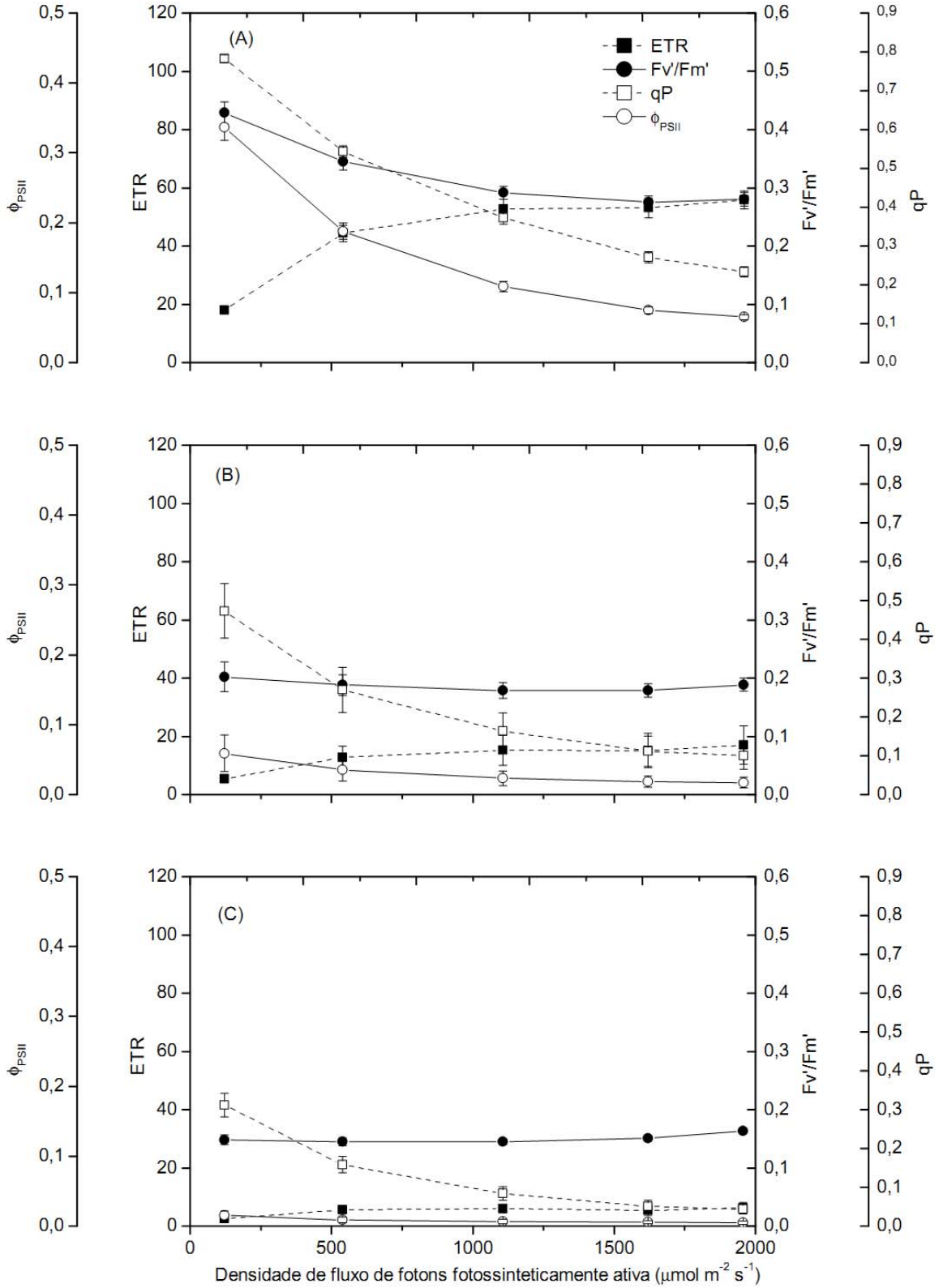

Figura 22. Curva de resposta à luz para os parâmetros de fluorescência modulada em discos foliares de soja submetidos ao herbicida bentazon em diferentes doses(A) 100µM, (B) 250µM e (C) 500µM. (φ_{FSII} = rendimento quântico do FSII, calculado a partir da fluorescência; ETR = taxa de transporte de elétrons no FSII; F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica efetiva; qP = coeficiente de extinção fotoquímico) (média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos).

Os resultados obtidos para o herbicida clomazone demonstraram comportamento semelhante entre as doses de 100 e 250μM avaliadas. Foram observadas reduções de até 25, 55, 65 e 50%, respectivamente, para qP, $\varphi_{FSII,}$ ETR e F_V'/F_M' (Fig. 23), em relação ao controle (Fig. 17), sendo o último praticamente constante em todas as intensidades luminosas.

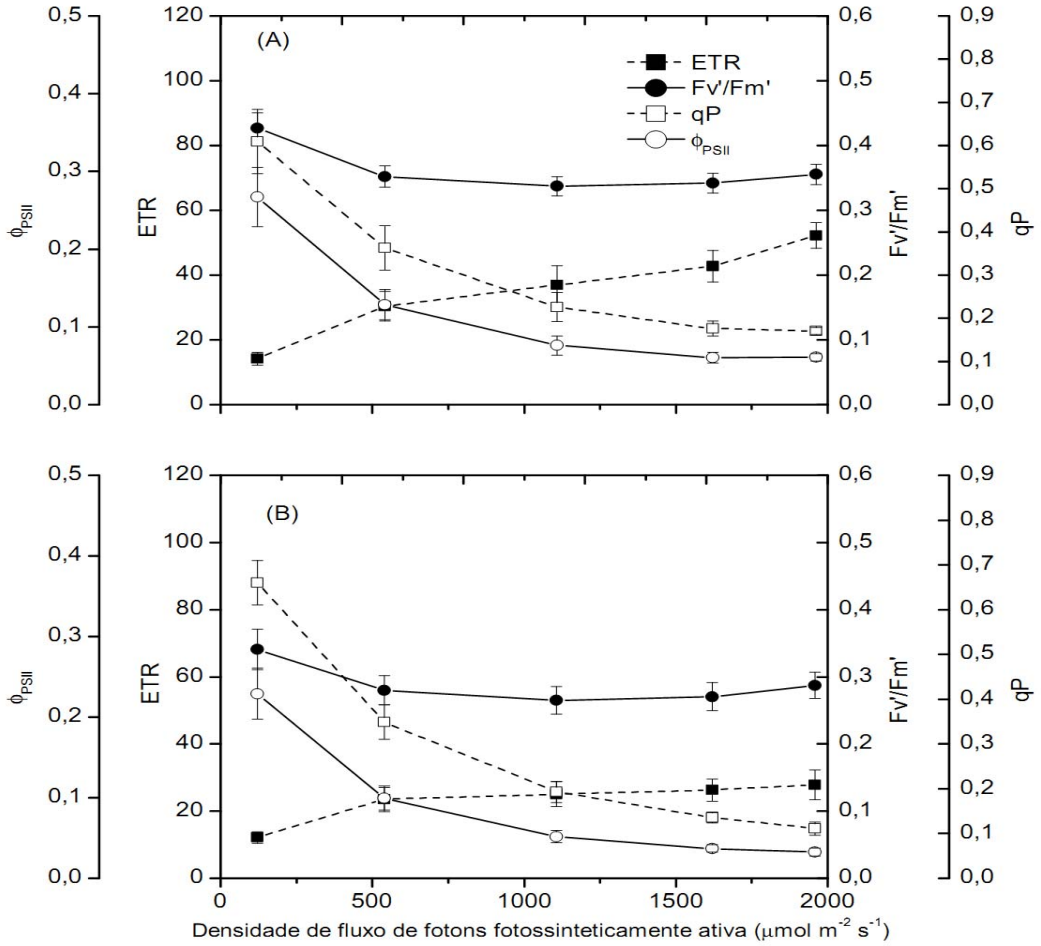

Figura 23. Curva de resposta a luz para os parâmetros de fluorescência modulada em discos foliares de soja submetidos ao herbicida clomazone em diferentes doses(A) 100μM e (B) 250μM. (φ_{FSII} = rendimento quântico do FSII, calculado a partir da fluorescência; ETR = taxa de transporte de elétrons no FSII; F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica efetiva; qP = coeficiente de extinção fotoquímico) (média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos). Obs.: A dose de 500μM foi letal aos discos foliares, não permitindo análise.

O herbicida fomesafen não causou altarações significativas nos parâmetros avaliados quando utilizado na dose de 100μM. Quando aplicado nas doses de 250 e 500μM, provocou o mesmo efeito nos discos foliares de soja, reduzindo qP, $\varphi_{FSII,}$ ETR e F_V'/F_M' em até 55, 70, 35 e 40%. Os resultados obtidos para F_V'/F_M', demonstram que este parâmetro se mantém constante, indepedente da intensidade luminosa aplicada nos discos foliares de soja (Fig. 24).

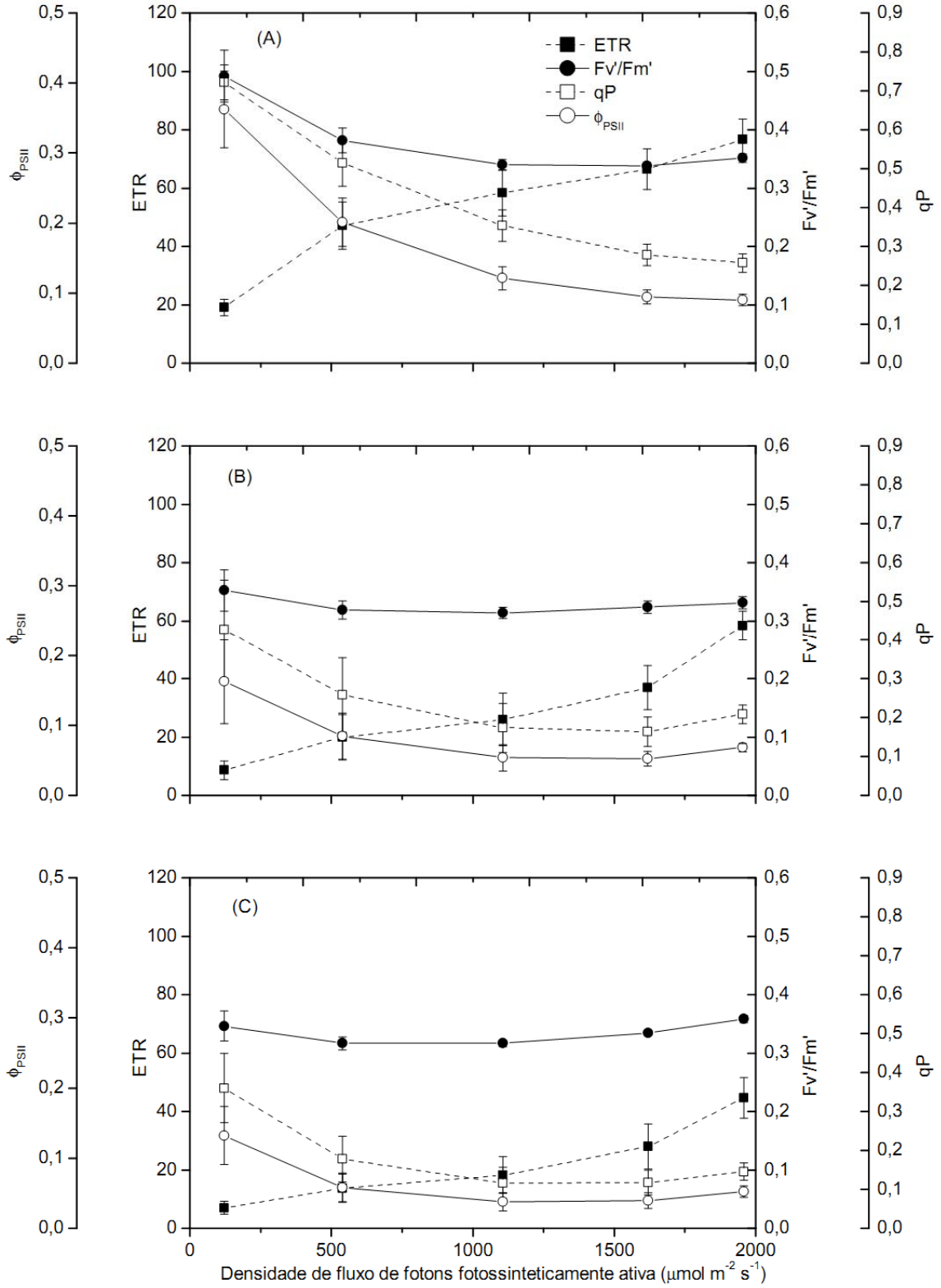

Figura 24. Curva de resposta a luz para os parâmetros de fluorescência modulada em discos foliares de soja submetidos ao herbicida fomesafen em diferentes doses(A) 100µM, (B) 250µM e (C) 500µM. (φ_{FSII} = rendimento quântico do FSII, calculado a partir da fluorescência; ETR = taxa de transporte de elétrons no FSII; F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica efetiva; qP = coeficiente de extinção fotoquímico) (média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos).

Nas avaliações da resposta dos discos foliares de soja em função de intervalos de radiação fotossinteticamente ativa, a relação entre $\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$ pode ser obtida, proporcionando assim importantes informações sobre a capacidade das folhas em assimilar CO_2. Sabe-se que entre estes dois parâmetros existe uma notável correlação, sendo a razão entre$\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$constantedentro de umintervalo de aproximadamente11 a 13 (EDWARDS; BAKER, 1993).Um valor de12 para$\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$implica queseis elétronsdevem ser transportadosatravés deFSIIpara cadamolécula deCO_2assimilado(EDWARDS; BAKER,1993). Medições deφ_{FSII} e φCO2 foram realizadas no intervalo de 100 a 2000µmol m^{-2} s^{-1} de radiação fotossinteticamente ativa. A partir destas medições, gráficos $\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$foram plotados e equações foram obtidas para verificar o ajuste dos pontos a reta que equivale à razão $\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$igual a 12. Para os resultados do tratamento controle (Fig. 25), os dados ajustaram-se em 80% a reta (R^2 = 0,80), apresentando dispersão de apenas alguns pontos do previsto.

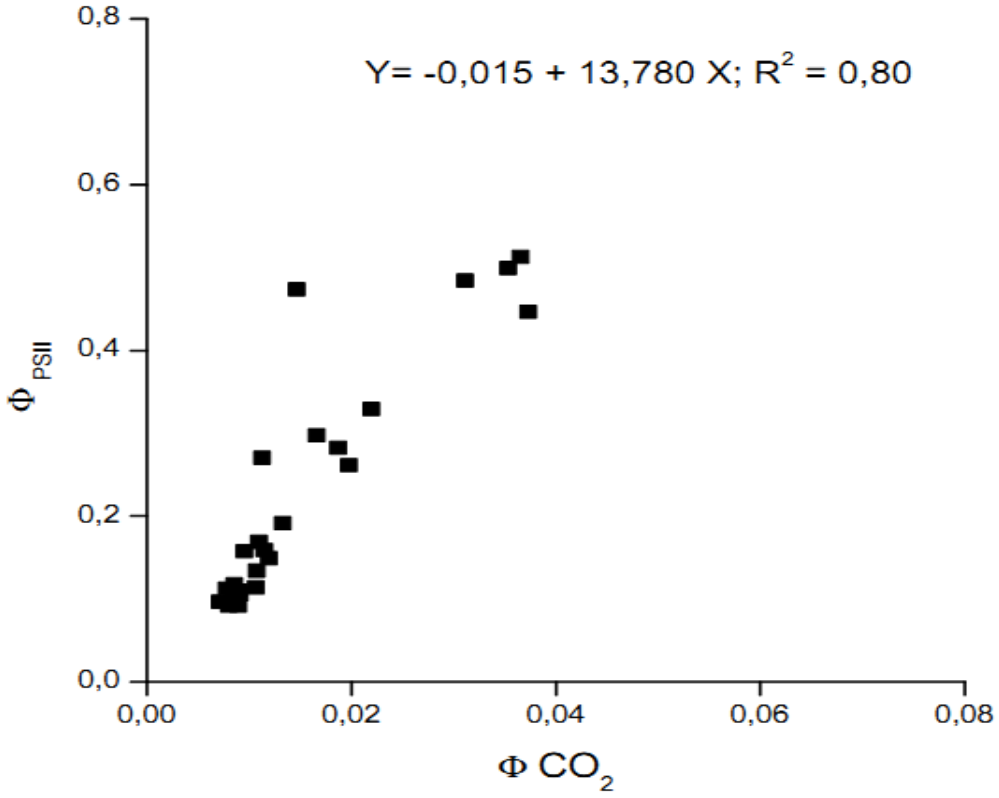

Figura 25**.** Relação entre o rendimento quântico calculado a partir da assimilação de CO_2(φCO_2) e orendimento quântico do FSII calculado a partir da fluorescência (φ_{FSII}) para discos foliares de soja submetidos ao tratamento controle.

Os discos foliares tratados com o herbicida bentazon nas doses de 100 e 250μM demonstraram ajuste a curva semelhante ao obtido para o tratamento controle, porém com valores reduzidos de φ_{FSII} e φCO_2. A dose de 500μM não apresentou ajuste significativo a reta, devido aos valores muito próximos a zero encontrados para os dois parâmetros. As duas doses avaliadas do herbicida clomazone demonstraram ajuste a reta inferior a 60%. Isto se deve, aos altos valores obtidos para φ_{FSII} em relação aos obtidos para φCO_2. Para o herbicida fomesafen não foram encontrados ajustes significativos para nenhuma das doses avaliadas, devido aos valores superiores a 12 encontrados para a relação $\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$(Fig. 26).

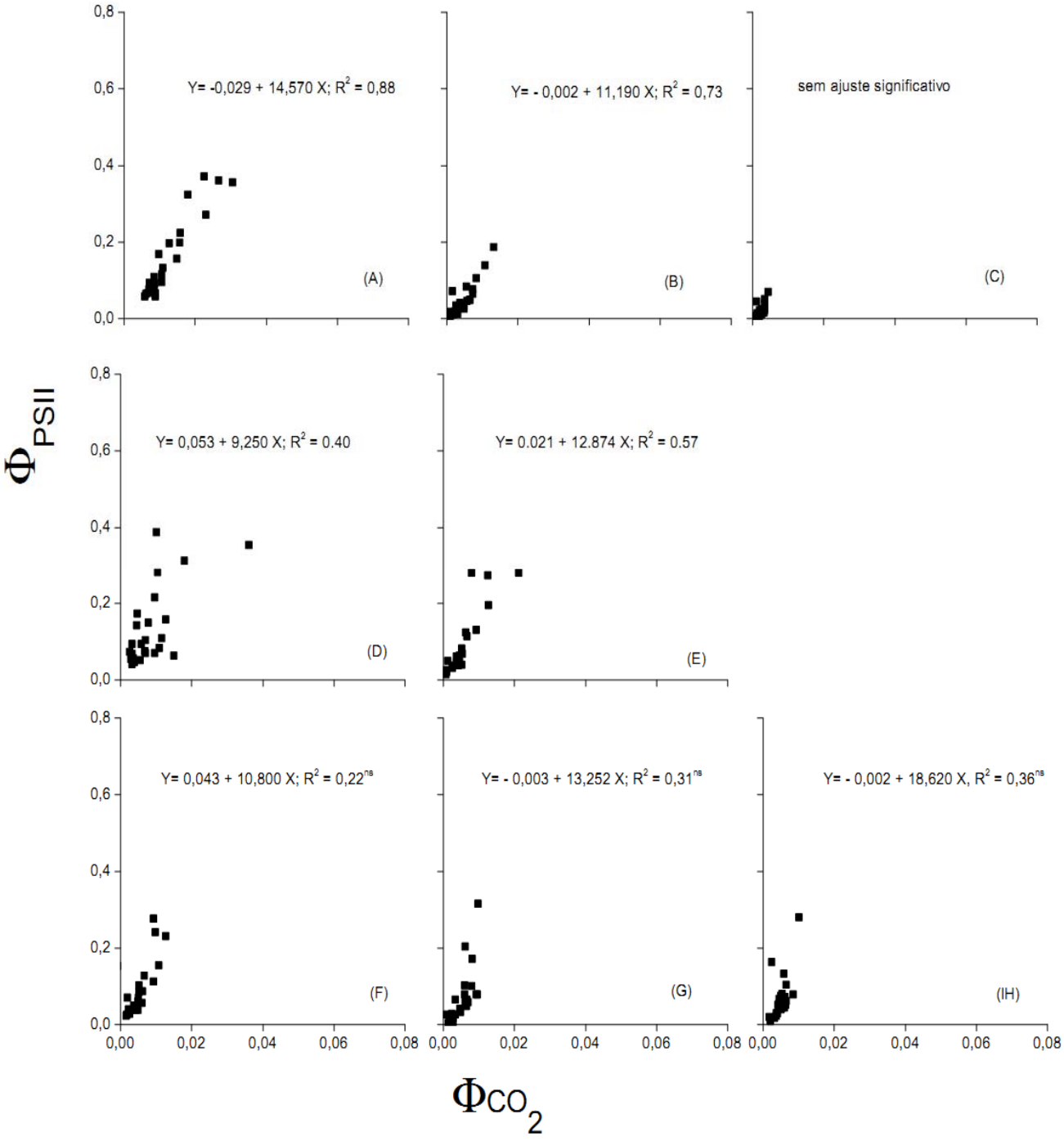

Figura 26. Relação entre o rendimento quântico calculado a partir da assimilação de CO_2 (φCO_2) e o rendimento quântico do FSII calculado a partir da fluorescência (φ_{FSII}) para discos foliares de soja submetidos aos tratamentos com herbicidas: bentazon (A-C, doses de 100, 250 e 500μM), clomazone (D-E, doses de 100 e 250μM) e fomesafen (F-H, doses de 100, 250 e 500μM).

3.1.3. Trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas em função da intensidade luminosa crescente (curvas de luz) foram obtidos dos discos foliares de soja expostos a diferentes tratamentos herbicidas. Os resultados obtidos para o tratamento controle encontram-se na Fig. 27. Valores próximos a 300 µmol molforam obtidos para Ci no escuro, sendo estes reduzidos a 240 na presença de luz e constantes em todas as intensidades luminosas.Para A e g, foram encontrados valores próximos a zero no escuro, sendo estes crescentes com o aumento da radiação, chegando a níveis próximos a 13 µmol m^{-2} s^{-1}e 0,19mol m^{-2} s^{-1}, respectivamente. A ação do herbicida bentazon (Fig. 28) diminuiu a taxa fotossintética líquida (A) e a condutividade estomática (g) para todas as irradiâncias nas três doses avaliadas. Reduções de aproximadamente 40 e 100% foram verificadas respectivamente para A e g, na dose de 500µM. A concentração interna de CO_2 (Ci) se manteve próxima ao controle na dose de 100µM, sendo elevada em 30 e 40%, respectivamente para as doses de 250 e 500µM do mesmo herbicida.

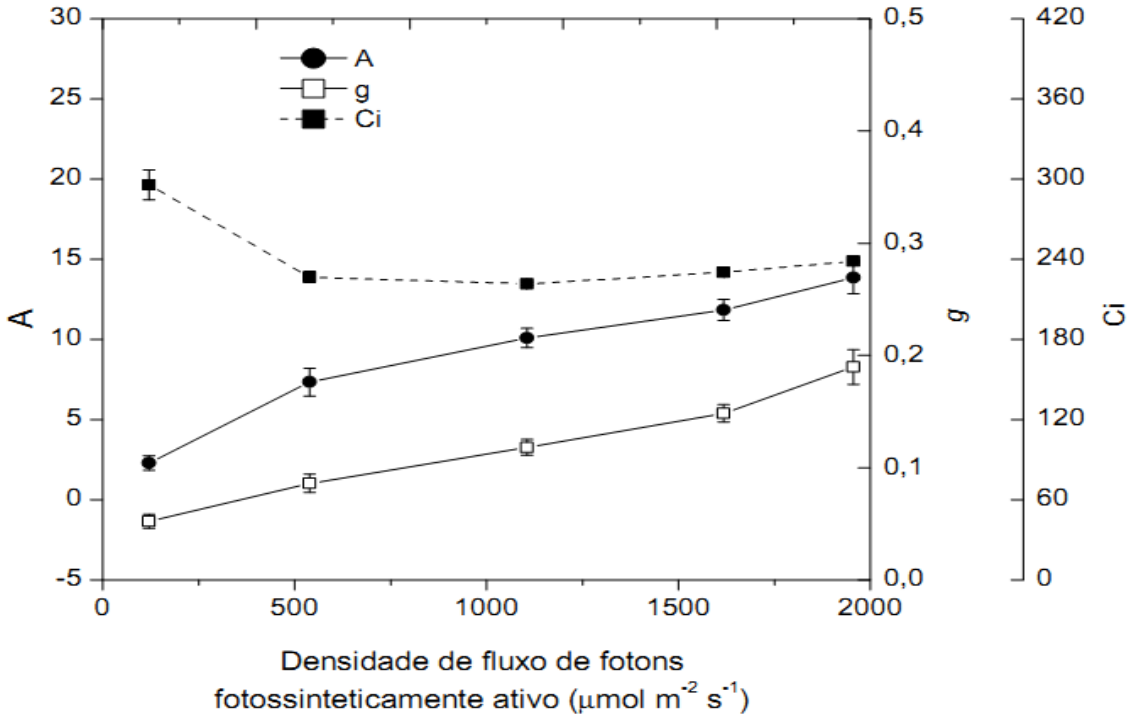

Figura 27. Curva de resposta a luz para os parâmetros trocas gasosas em discos foliares de soja submetidos ao tratamento controle. (A = taxa fotossintética líquida em µmol m^{-2} s^{-1}; g = condutância estomática em mol m^{-2} s^{-1}e Ci = concentração intercelular de CO_2 em µmol mol) (média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos).

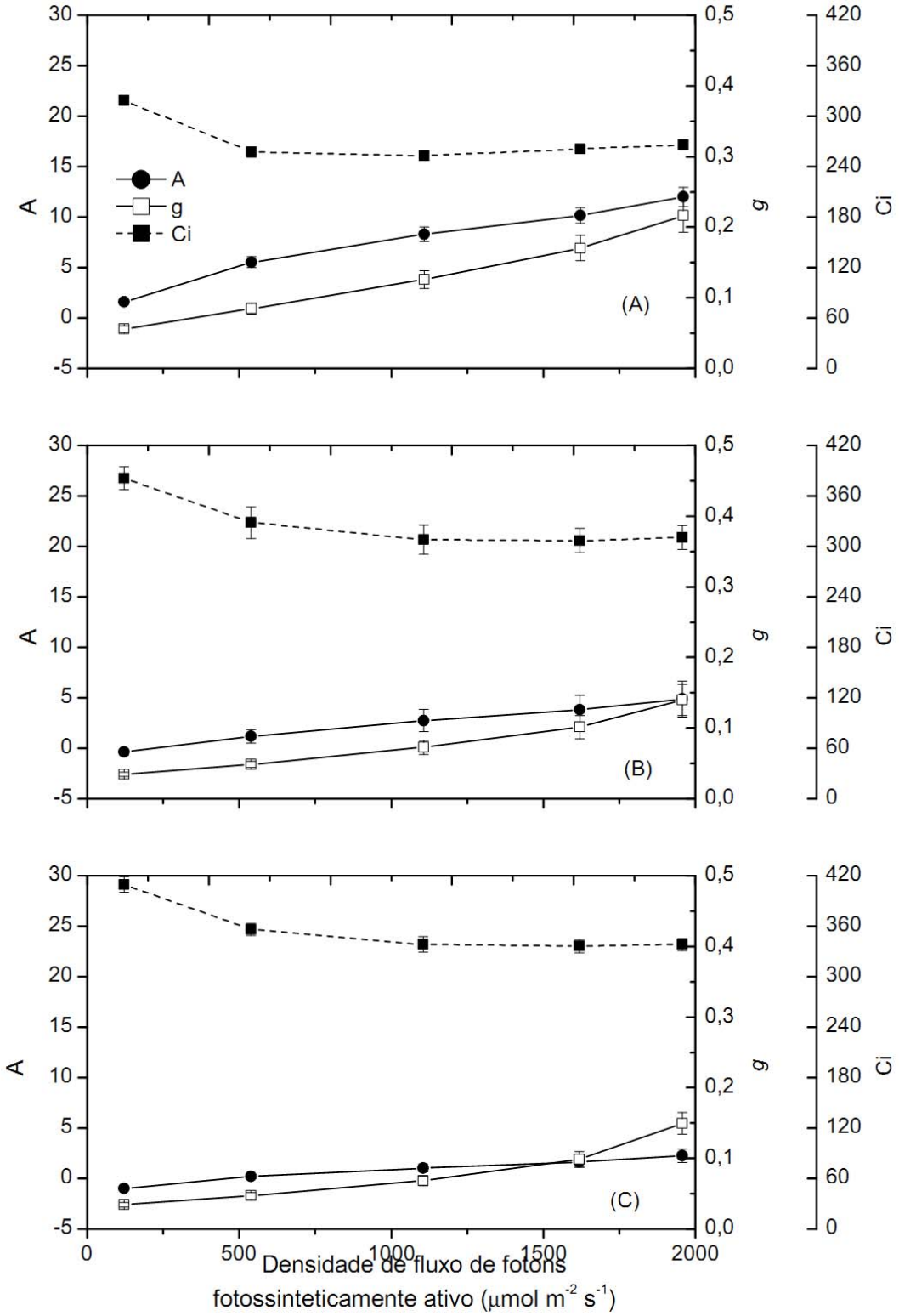

Figura 28. Curva de resposta a luz para os parâmetros trocas gasosas em discos foliares de soja submetidos ao herbicida bentazon em diferentes doses(A) 100µM, (B) 250µM e (C) 500µM. (A = taxa fotossintética líquida em µmol m^{-2} s^{-1}; g = condutância estomática em mol m^{-2} s^{-1}e Ci = concentração intercelular de CO_2 em µmol mol)(média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos).

O impacto do herbicida clomazone (Fig. 29) sobre a taxa fotossintética líquida dos discos foliares de soja foi semelhante ao encontrado para herbicida bentazon, sendo observadas reduções de até 70% na dose de 250μM. A condutividade estomática teve incremento de seus valores em até 75% para as intensidades de luz mais elevadas nas avaliações da dose de 100μM do herbicida clomazone. Em contrapartida, na dose de 250μM do mesmo herbicida, foram observadas reduções de aproximadamente 20% em todas as irradiâncias avaliadas. Os dados de Ci foram semelhantes para as duas doses de clomazone avaliadas, sendo mantidos aproximadamente 20% superiores ao tratamento controle.

A dose de 100μM do herbicida fomesafen (Fig. 30) aplicado nos discos foliares de soja reduziu em até 40 e 50%, respectivamente, os valores de A e g, e elevou em 20% a Ci. Para este mesmo herbicida foram obtidos resultados semelhantes para as doses de 250 e 500μM avaliadas. A ação do herbicida resultou em elevação de 33 e 75% nos valores de Ci e g, respectivamente, sendo para o último parâmetro marcante apenas a partir da intensidade de 1200 μmol m^{-2} s^{-1} de luz. Para estas duas doses de fomesafen foram observadas reduções de até 45% nos valores de A obtidos, quando comparados ao controle.

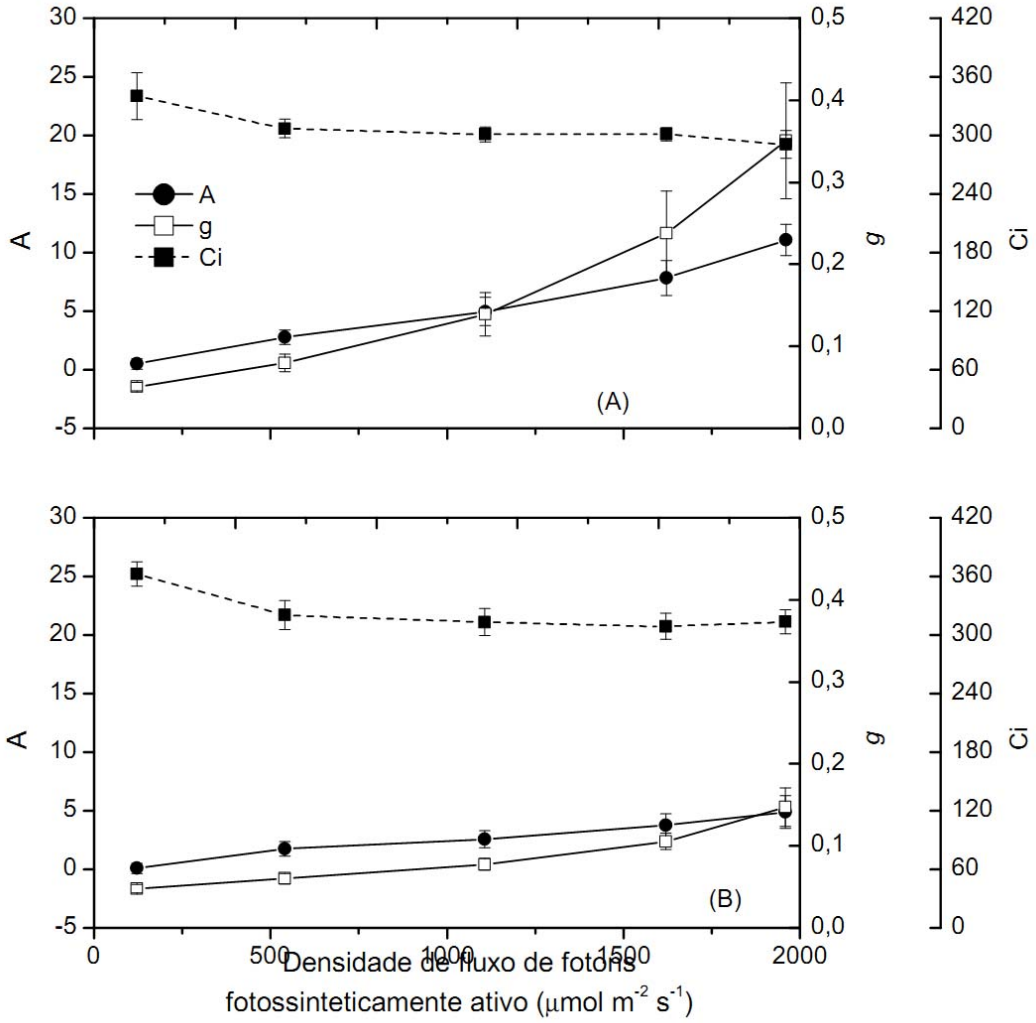

Figura 29. Curva de resposta a luz para os parâmetros trocas gasosas em discos foliares de soja submetidos ao herbicida clomazone em diferentes doses(A) 100µM e (B) 250µM. (A = taxa fotossintética líquida em µmol m^{-2} s^{-1}; g = condutância estomática em mol m^{-2} s^{-1}e Ci = concentração intercelular de CO_2 em µmol mol)(média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos). Obs.: A dose de 500µM foi letal aos discos foliares, não permitindo análise.

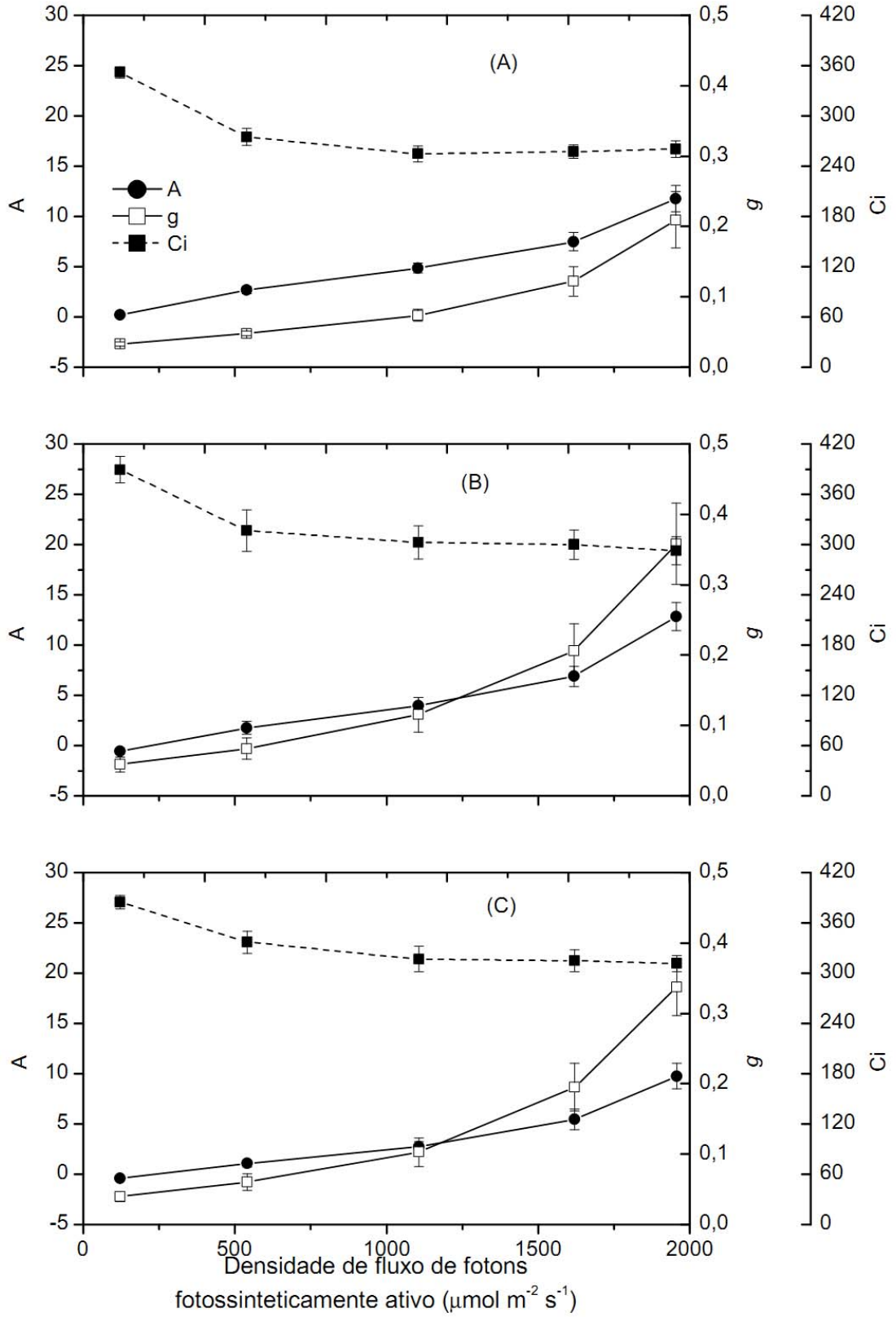

Figura 30. Curva de resposta a luz para os parâmetros trocas gasosas em discos foliares de soja submetidos ao herbicida fomasagfem em diferentes doses(A) 100µM, (B) 250µM e (C) 500µM. (A = taxa fotossintética líquida em µmol m^{-2} s^{-1}; g = condutância estomática em mol m^{-2} s^{-1}e Ci = concentração intercelular de CO_2 em µmol mol)(média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos).

3.2. Milho

3.2.1. Fluorescência transiente

3.2.1.1. Cinética de emissão de fluorescência transiente da clorofila a

Os resultados obtidos para a cinética de emissão de fluorescência transiente da clorofila *a*(curvas OJIP), dos discos foliares de milhotratados com diferentes soluções herbicidas encontram-se na Fig. 31. Assim como na soja, os transientes foram normalizados entre os passos O e P, com o objetivo de obter alterações mais específicas na forma destes entre os dois extremos.

Para o tratamento controle foi obtida uma curva com formato sigmóide característica, com os passosO, J, I e P bem definidos. Foi observado um aumento progressivo, de acordo com a dose, na intensidade de fluorescência no ponto J, quando aplicado o herbicida bentazon (Fig. 31A), porém as curvas OJIP não perderam a forma sigmoidal. Além de F_J, os valores de V_J e S_s também sofreram elevação em relação ao controle, sendo esta mais significativa para a dose de 500μM de bentazon (tab. 5).

As curvas OJIP obtidas para os herbicidas clomazone e fomesafen não demonstraram alteração em relação ao controle para todas as doses avaliadas (Fig. 31B e 31C). Já os parâmetros de fluorescência obtidos a partir dos dados primários mostraram que o herbicida clomazone causou alterações significativas nos valores de F_I, F_M, S_se Vj, sendo os três primeiros reduzidos em aproximadamente 10% e o últimoelevadoem 7%, quando aplicado na dose de 500μM (tab. 5). Para o herbicida fomesafen houve diferença significativa entre os tratamentos herbicidas e o controle, porém as três doses herbicidas avalidas não diferiram entre si. Houve acréscimo de 9 e 6%, respectivamente nos valores de V_J e V_I, e redução de 19% de S_m, sendo este parâmetro o mais afetado pelo herbicida (tab. 5).

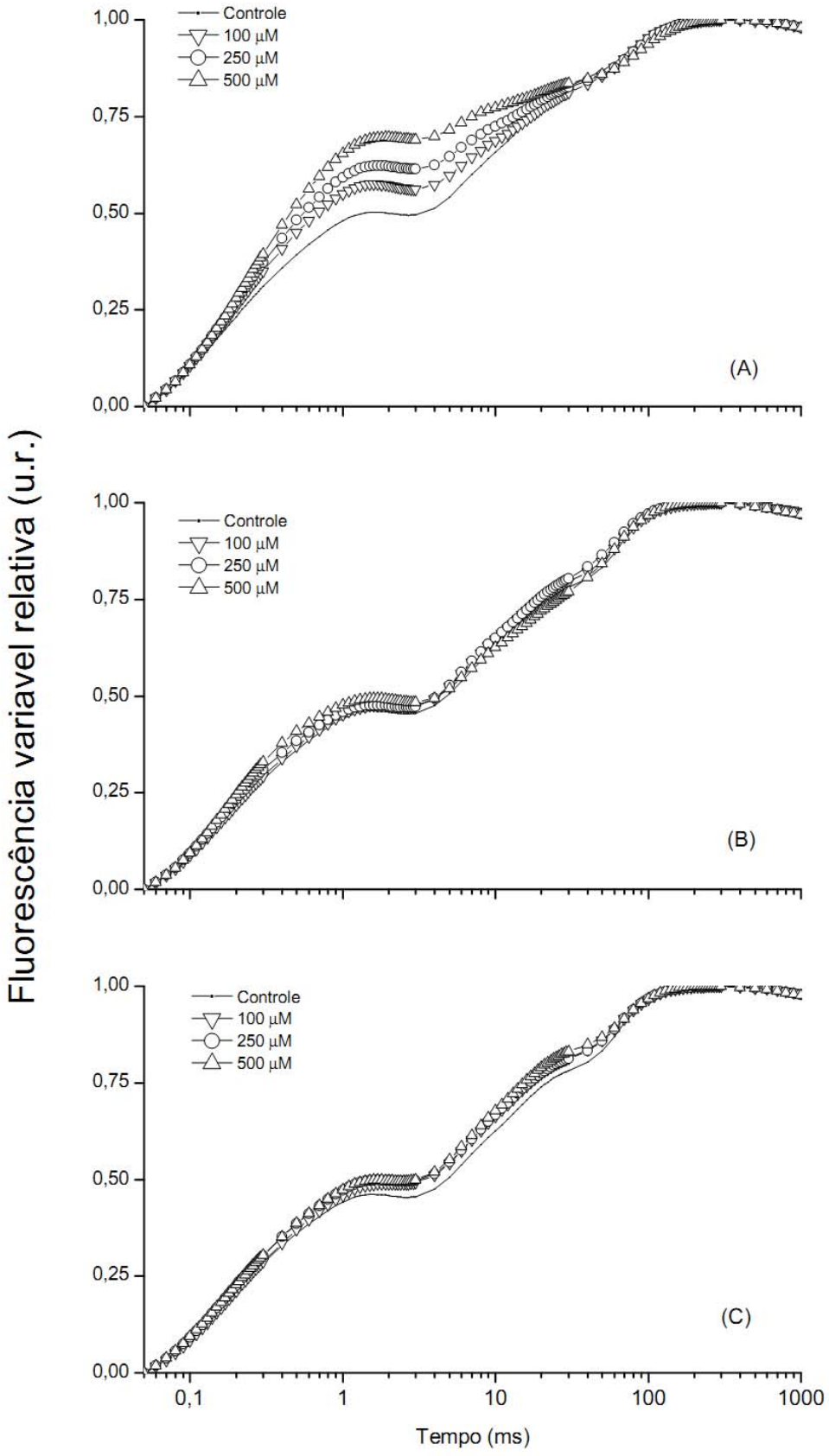

Figura 31. Fluorescência variável relativa (V_t) em discos foliares de milho submetidos a diferentes doses de herbicidas (A) Bentazon, (B) Clomazone e (C) Fomesafen. (n = 15).

Tabela 5.Intensidades de fluorescência da clorofila *a* nos passos O (F_o), J (F_J), I (F_I) e P (F_M), fluorescência variável relativa nos passos J (V_J) e I (V_I), área total normalizada complementar correspondente a fase OJ (S_S), área total normalizada complementar acima da OJIP (S_m) e número total de elétrons transferidos para a cadeia de transporte de elétrons (N), de discos foliares de milho submetidos a diferentes doses de herbicidas

Herbicida	Dose	Intensidade de fluorescência/parâmetros								
		F_0	F_J	F_I	F_M	V_J	V_I	S_S	S_m	N
Bentazon	Controle	710 ^{ns}	1742 b	2418 ^{ns}	2774 ^{ns}	0,503 c	0,830 ^{ns}	0,403 b	17,9 ^{ns}	44,4 ^{ns}
	100 µM	771	1962 ab	2464	2857	0,577 b	0,814	0,408 b	18,6	45,6
	250 µM	736	1906 ab	2290	2621	0,623 a	0,826	0,418 ab	17,9	42,8
	500 µM	759	2073 a	2336	2648	0,699 a	0,837	0,441 a	18,1	41,1
Clomazone	Controle	696 ^{ns}	1712 ^{s}	2430 a	2915 a	0,457 b	0,780 ^{ns}	0,408 a	20,7 ^{ns}	50,5 ^{ns}
	100 µM	703	1745	2443 a	2891 a	0,476 ab	0,795	0,404 ab	18,9	46,8
	250 µM	702	1712	2430 a	2851 a	0,471 ab	0,804	0,385 bc	17,6	45,8
	500 µM	692	1631	2163 b	2603 b	0,493 a	0,769	0,373 c	19,6	52,5
Fomesafen	Controle	696 ^{ns}	1712 ^{ns}	2430 ^{ns}	2915 ^{ns}	0,457 b	0,780 b	0,408 ^{ns}	20,7 a	50,5 a
	100 µM	686	1721	2406	2801	0,491 a	0,815 ab	0,427	17,7 b	41,2 b
	250 µM	689	1740	2405	2801	0,498 a	0,813 ab	0,416	17,6 b	42,3 b
	500 µM	697	1740	2439	2793	0,497 a	0,830 a	0,415	16,8 b	40,4 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p = 0,05) entre as doses dentro de cada herbicida, ns – não significativo; n = 15.

3.2.1.2. Teste JIP

A partir dos resultados obtidos sobre o comportamento polifásico do aumento da fluorescência foi possível se obter uma série de parâmetros matemáticos por meio doTeste JIP (STRASSER; STRASSER, 1995; TSIMILLI; STRASSER, 2008). O uso correto destes parâmetros permitiu a quantificaçãodo fluxo de energia absorvido e aproveitado no sistema fotossintético, proporcionando a avaliaçãodo desempenho fotossintético de plantas. Os dados do tratamento controle foram transformados para "1" (centro do radar), permitindo assim, a visualização da variação dos demais parâmetros em relação a ele (Fig. 32). Para o herbicida bentazon, declínios em torno de 40% nos valores dos parâmetros ET_0/RC, ψ_0 e φE_0 foram verificados para a dose de 500µM. A maior redução observada para o herbicida bentazon foi de 30, 45 e 60% em PI_{ABS}, respectivamente para as doses de 100, 250 e 500 µM. Já $PI_{ABStotal}$ foi

pouco afetado pelo herbicida, sendo reduzido em apenas 13% na maior dose aplicada (Fig. 32A).

O herbicida clomazone (Figura 32B) aplicado nos discos foliares de milho na dose de 500μM resultou no aumento dos níveis dos parâmetros ABS/RC e DI_0/RC respectivamente em 12 e 25%. Quando aplicado na dose de 100μM o herbicida não afetou estes parâmetros. Os índices de desempenho também foram afetados pela ação do herbicida. PI_{ABS} foi reduzido em 10, 15 e 30% repectivamente para as doses de 100, 250 e 500 μM de clomazone. Já $PI_{ABStotal}$ foi reduzido em 12, 25 e 18% nas mesmas doses do herbicida.

A aplicação do herbicida fomesafen afetou os parâmetros fotossintéticos avaliados pelo teste JIP (Fig. 32C). Os dois índices de desempenho foram prejudicados sendo $PI_{ABStotal}$ duas vezes mais afetado que PI_{ABS}, apresentando declínio de 25, 25 e 40%, respectivamente para as doses de 100, 250 e 500 μM do herbicida. Os parâmetros RE/RC e φ_{R0} também foram reduzidos em aproximadamente 15, 17 e 25%, nas mesmas doses de fomesafen, em relação ao tratamento controle.

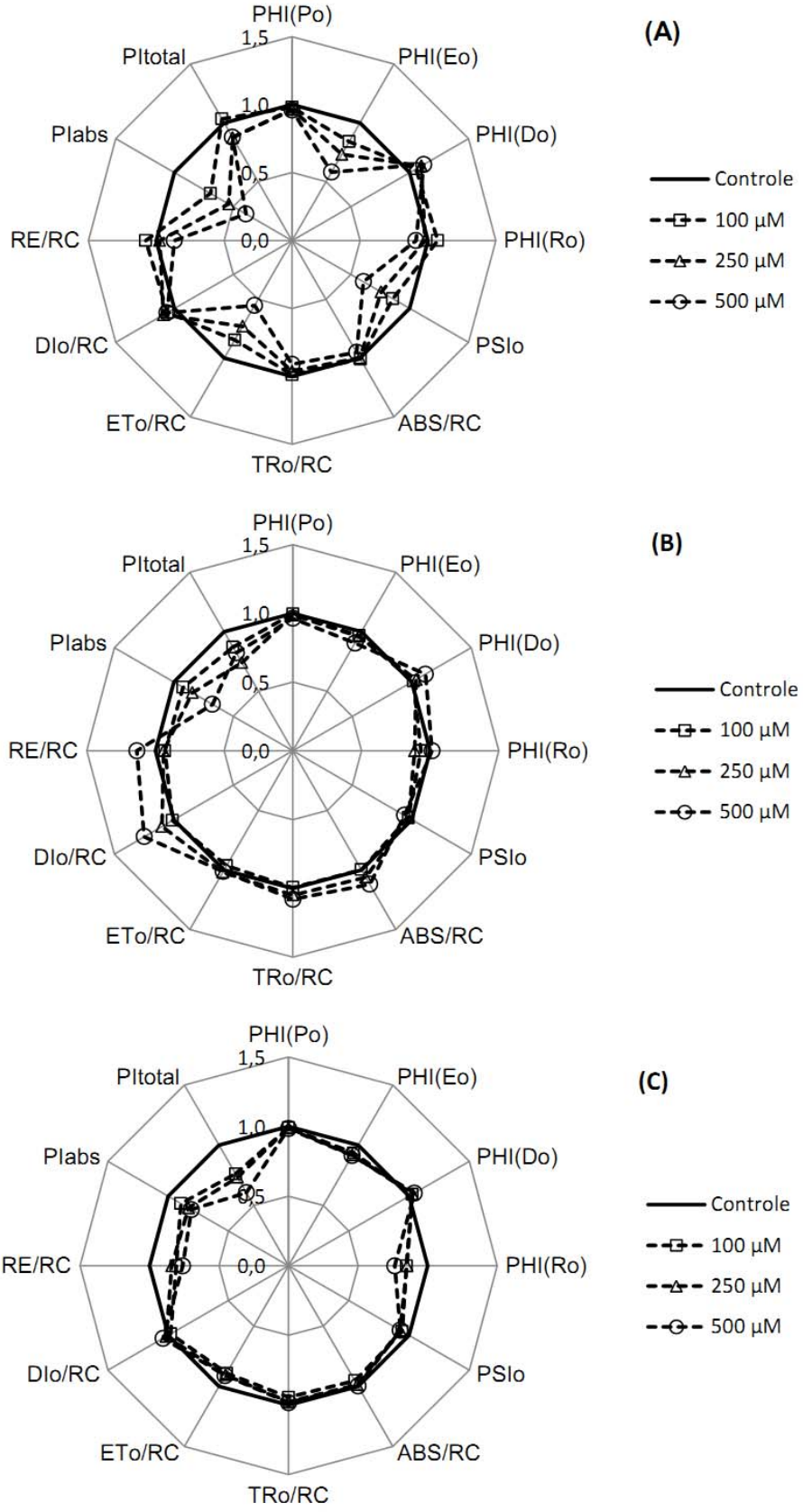

Figura 32. Alguns parâmetros do Teste JIP obtidos em discos foliares de milho submetidos a diferentes doses de herbicidas (A) Bentazon, (B) Clomazone e (C) Fomesafen, expresso em relação aos valores do tratamento controle (valor transformado para 1); (n = 15).

3.2.1.3. Análise de duplo flash

Com base nas propriedadesde transportede elétronsno ladoredutordos centrosde reação doFSII, sabe-se que duas formas distintas de centro de reação são encontradas, ou seja, aquelescapazes de reduzirQ_B e incapazes de realizar esta redução. A distinção entre estas duas formas de centro de reação foi realizada pela emissão de dois pulsos de luz saturante nos discos foliares de milho, submetidos à ação dos diferentes herbicidas, e os resultados encontram-se na Fig. 33.

Os dados referentes ao tratamento controle demonstram o comportamento padrão, onde os valores de F_0* são superiores aos encontrados para F_0 e as intensidades de F_J* são próximas a F_M*, sem a fase JI distinta. Para o herbicida bentazon, os valores encontrados de F_0* para as doses de 250 e 500μM, diferiram significativamente em relação ao controle, sendo reduzidos em 15 e 20%, respectivamente (tab. 6). Essa redução também é demonstrada na curva OJIP do herbicida bentazon (Fig. 33A). Os valores de V_0* também foram reduzidos pela ação do herbicida, sendo esta de 20% para as doses de 100 e 250μM e de 30% para a dose de 500μM.

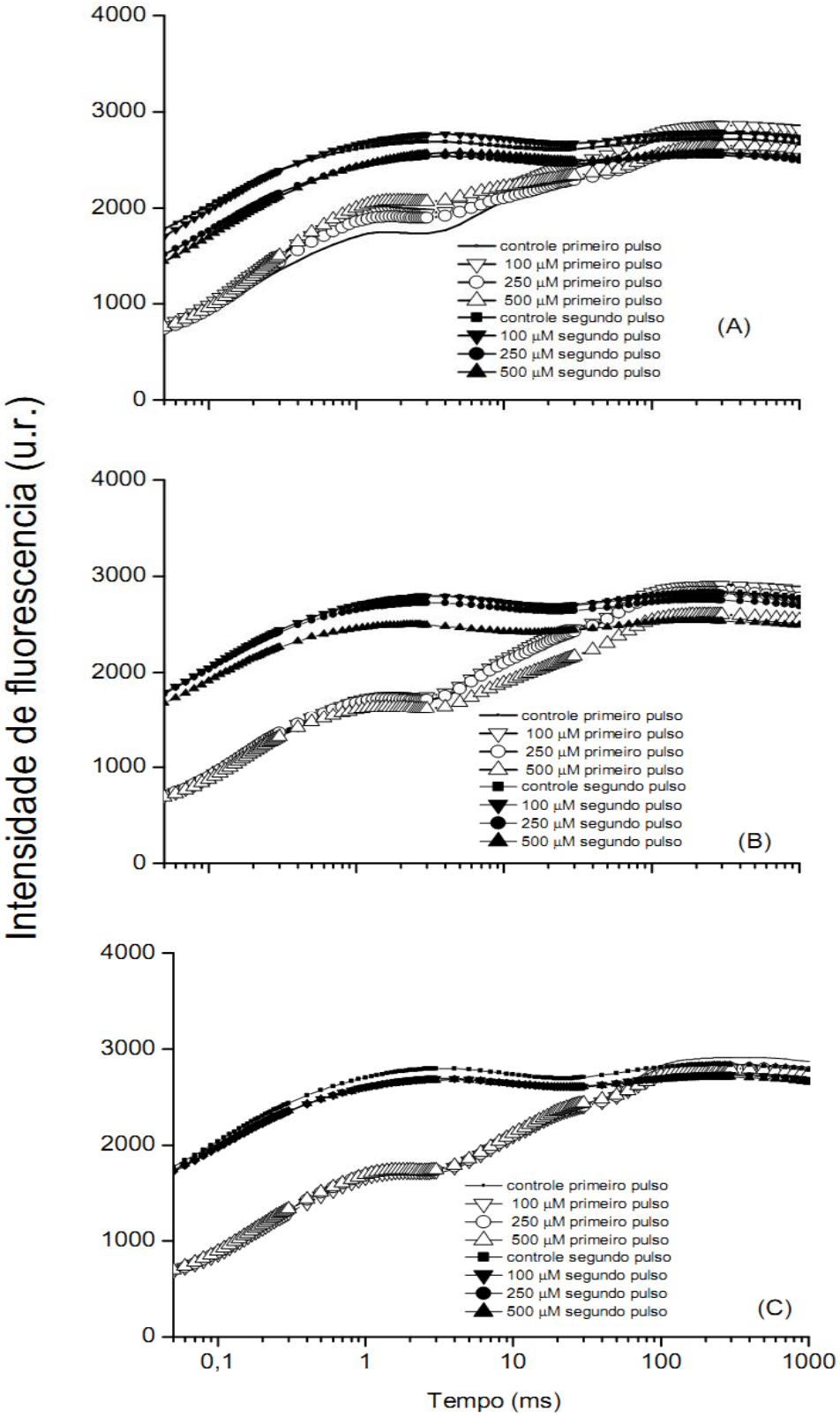

Figura 33.Intensidade de fluorescência da clorofila *a* obtido em discos foliares de milho submetidos a dois pulsos saturante com intervalo de 500ms (A) Bentazon, (B) Clomazone e (C) Fomesafen.

Tabela 6.Intensidades de fluorescência da clorofila *a*, em discos foliares de milho, nos passos O (F_0^*) e P (F_M^*) após o segundo pulso de luz saturante e a estimativa da fração de centro de reação não redutor de Q_B (V_0*)

		Intensidade de fluorescência/parâmetros		
Herbicida	Dose	F_0*	F_M*	V_0*
Bentazon	Controle	1780 a	2719 ^{ns}	0,537 a
	100 µM	1708 a	2790	0,469 b
	250 µM	1519 b	2552	0,436 b
	500 µM	1442 b	2583	0,380 c
Clomazone	Controle	1776 ^{ns}	2841 ^{ns}	0,508 b
	100 µM	1792	2807	0,523 ab
	250 µM	1778	2765	0,525 ab
	500 µM	1676	2539	0,537 a
Fomesafen	Controle	1776 ^{ns}	2841 ^{ns}	0,508 ^{ns}
	100 µM	1731	2773	0,515
	250 µM	1718	2726	0,509
	500 µM	1738	2709	0,522

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p = 0,05) entre as doses dentro de cada herbicida, ns – não significativo; n = 15.

A ação do herbicida clomazone só causou diferença significativa em relação ao controle no parâmetro V_0*, sendo este elevado em 6% na dose de 500µM do herbicida (tab. 6). Além disso, esta mesma dose causou redução dos valores de F_M* (Fig. 33B), quando comparados ao controle, porém esta redução não foi significativa. O herbicida fomesafen aplicado nos discos foliares de milho, não demonstrou diferença significativa em nenhum dos parâmetros, para as três doses avaliadas, em comparação ao tratamento controle (Fig. 33C).

3.2.2. Fluorescência modulada

3.2.2.1. Análise de cinética de relaxamento

Os resultados obtidos na análise da cinética de relaxamento dos discos foliares de milho do tratamento controle encontram-se na Fig. 34. Foram observados valores praticamente constantes ao longo dos pulsos de luz para F_0', F_s, F_M', F_v'/F_M', φ_{FSII} e qP, sendo estes próximos a 500, 500, 1100, 0,62, 0,55 e 0,9, respectivamente. Já qN eNPQ sofreram suave elevação ao longo dos pulsos de luz, apresentando valores finais próximos a 0,5 e 0,6, respectivamente.

Os discos foliares de milho submersos nas doses de 100 e 250μM do herbicida bentazon apresentaram resultados semelhantes aos obtidos para o tratamento controle, para todos os parâmetros avaliados (Fig. 35). Para a dose de 500μM foi observado aumento nas intensidades de F_M' e F_0', em 20 e 70%, respectivamente. A intensidade de Fs nesta dose foi o dobro da encontrada para o tratamento controle. Os valores de F_v'/F_M', φ_{FSII}, qP, qN e NPQ foram reduzidos em 35, 50, 30, 10 e 40%, respectivamente.

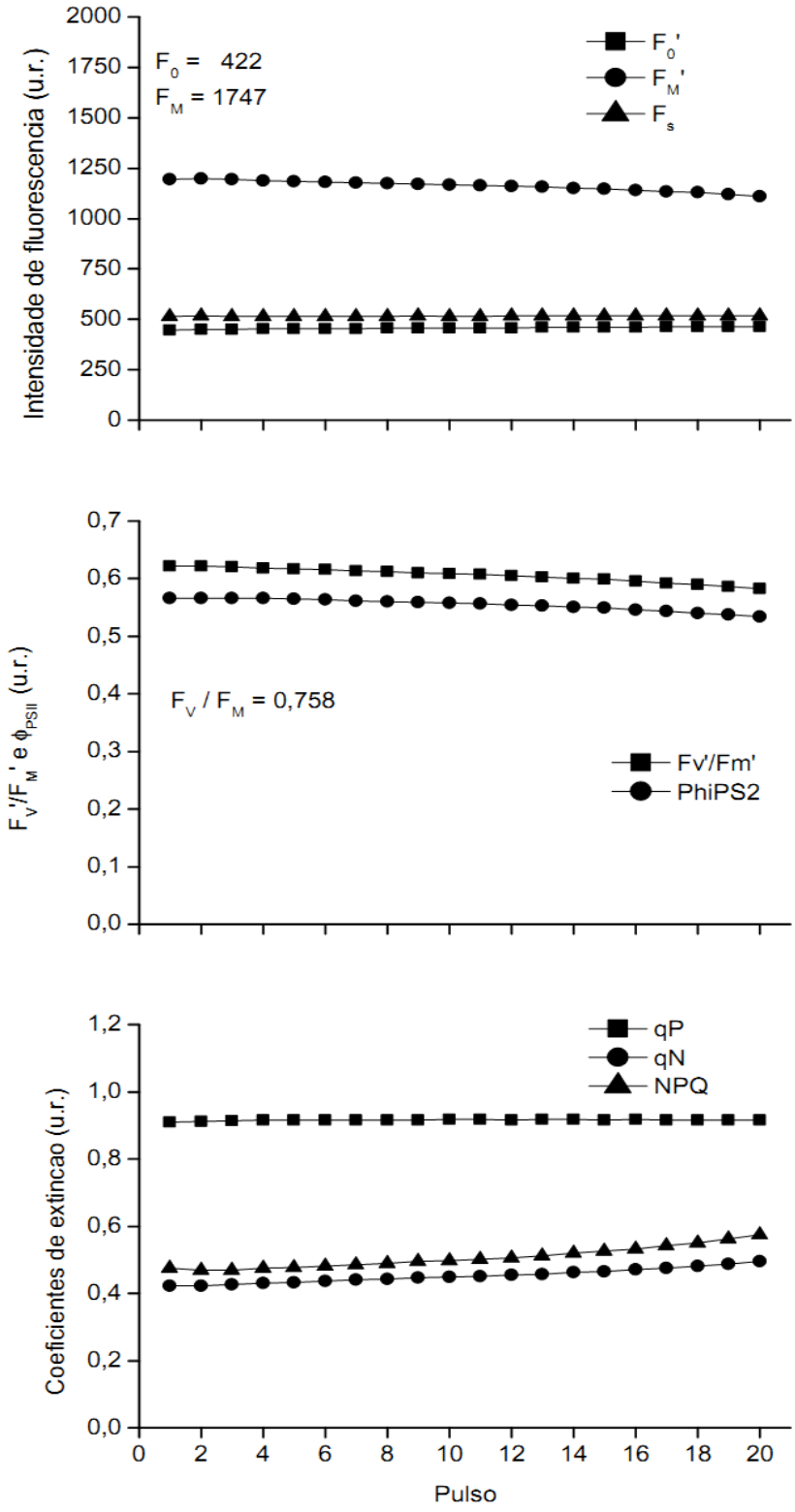

Figura 34. Análise de fluorescência modulada de discos foliares de milho submetidos ao tratamento controle (mais informações veja Figura A). (F_0 = fluorescência inicial, F_M = fluorescência máxima em estado adaptado ao escuro, F_M' = fluorescência máxima em cada pulso saturante, F_s = fluorescência em estado de state-steady, F_V/F_M = eficiência fotoquímica máxima, F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica máxima efetiva, φ_{FSII} = eficiência fotoquímica do fotossistema II, qP = coeficiente de extinção fotoquímico, qN = coeficiente de extinção não fotoquímico e NPQ = coeficiente de extinção não fotoquímico).

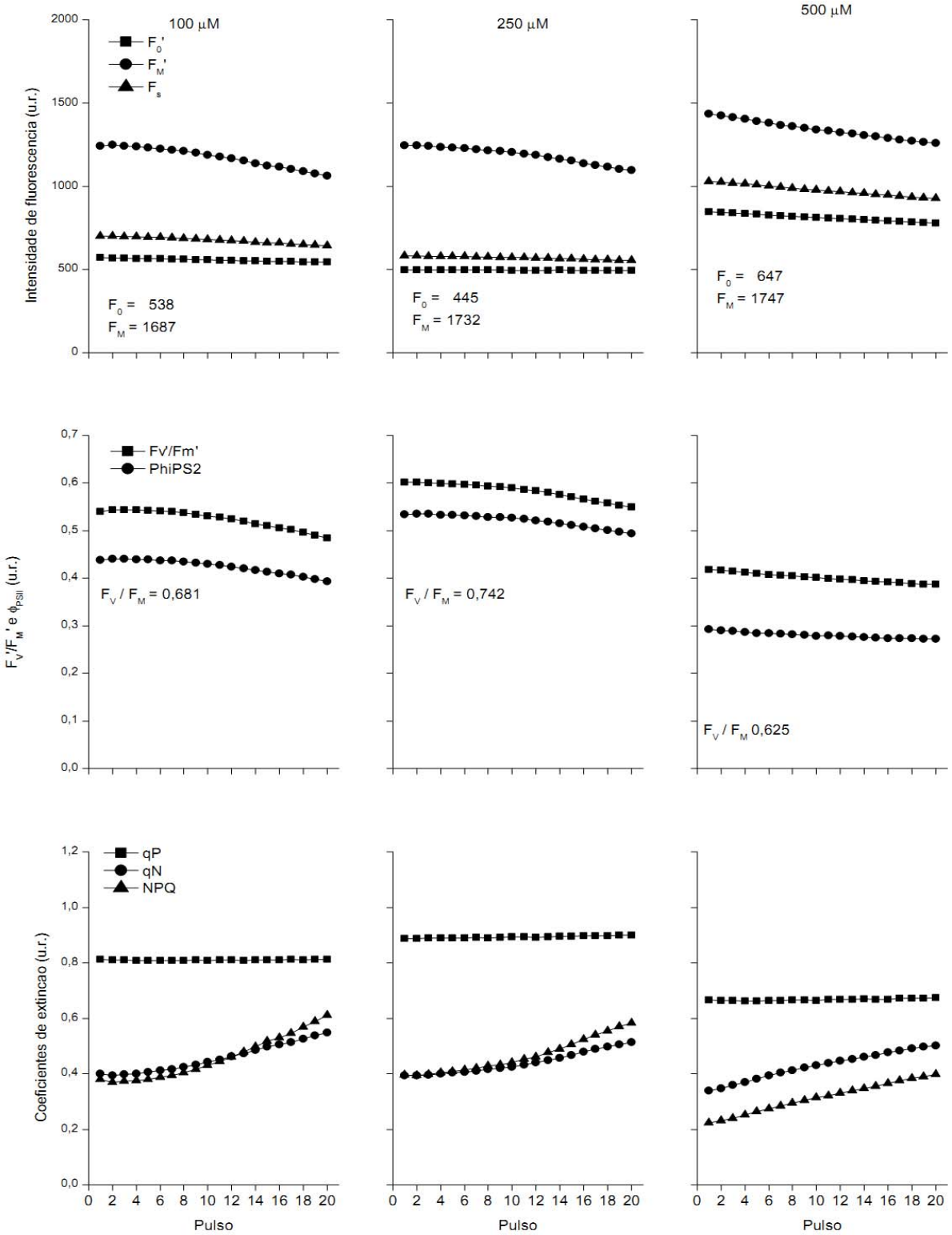

Figura 35. Análise de fluorescência modulada de discos foliares de milho submetidos ao herbicida bentazon em diferentes doses (mais informações veja Figura A). (F_0 = fluorescência inicial, F_M = fluorescência máxima em estado adaptado ao escuro, F_M' = fluorescência máxima em cada pulso saturante, F_s = fluorescência em estado de state-steady, F_V/F_M = eficiência fotoquímica máxima, F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica máxima efetiva, φ_{FSII} = eficiência fotoquímica do fotossistema II, qP = coeficiente de extinção fotoquímico, qN = coeficiente de extinção não fotoquímico e NPQ = coeficiente de extinção não fotoquímico).

Para a dose de 100μM do herbicida clomazone todos os parâmetros foram semelhantes aos encontrados para o controle, com exceção de qN e NPQ que apresentaram valores 25 e 45% superiores (Fig. 36). Para as outras duas doses avaliadas, F_0' e F_s se mantiveram semelhantes aos obtidos para o controle, porém F_M' foi reduzido em 35%. Os valores iniciais de F_v'/F_M' foram reduzidos em 20 e 35%, os de φ_{FSII} em 30 e 65%, e os de qP em 10 e 45%, respectivamente para as doses de 250 e 500μM do herbicida clomazone. Também, os valores de qN e NPq foram fortemente afetados pela ação do clomazone, sendo o primeiro elevado em 50 e 75%, respectivamente para as doses de 250 e 500μM. Do mesmo modo, NPQ teve valores iniciais muito elevados de 120 e 140% superiores aos do controle para as doses de 250 e 500μM de clomazone, sendo estes reduzidos ao longo dos pulsos de luz, chegando a valores próximos a 0,8 e 0,9 para as doses de 250 e 500μM do herbicida.

Os parâmetros obtidos dos discos foliares de milho expostos ao herbicida fomesafen não demonstraram diferença em relação ao controle, em nenhuma das doses avaliadas, com exceção de NPQ que na dose de 100μM sofreu elevação inicial de 20%, chegando esta a 40% nos últimos pulsos de luz aplicados. Entretanto, nas doses de 250 e 500μM, os valores iniciais de NPQ não foram alterados, porém no final da avaliação foram elevados em aproximadamente 10%, quando comparados ao tratamento controle (Fig.37).

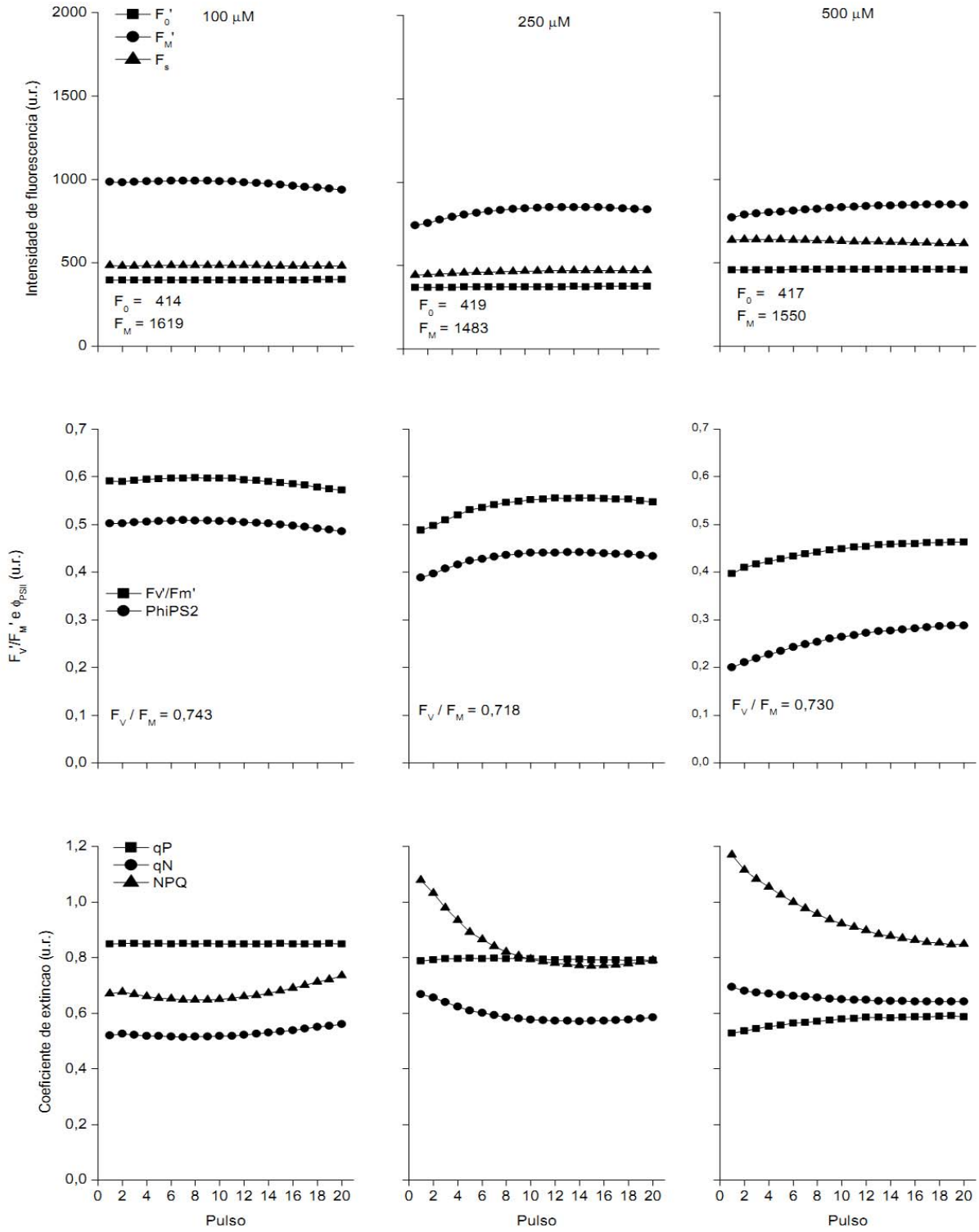

Figura 36. Análise de fluorescência modulada de discos foliares de milho submetidos ao herbicida clomazone em diferentes doses (mais informações veja Figura A). (F_0 = fluorescência inicial, F_M = fluorescência máxima em estado adaptado ao escuro, F_M' = fluorescência máxima em cada pulso saturante, F_s = fluorescência em estado de state-steady, F_V/F_M = eficiência fotoquímica máxima, F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica máxima efetiva, φ_{FSII} = eficiência fotoquímica do fotossistema II, qP = coeficiente de extinção fotoquímico, qN = coeficiente de extinção não fotoquímico e NPQ = coeficiente de extinção não fotoquímico).

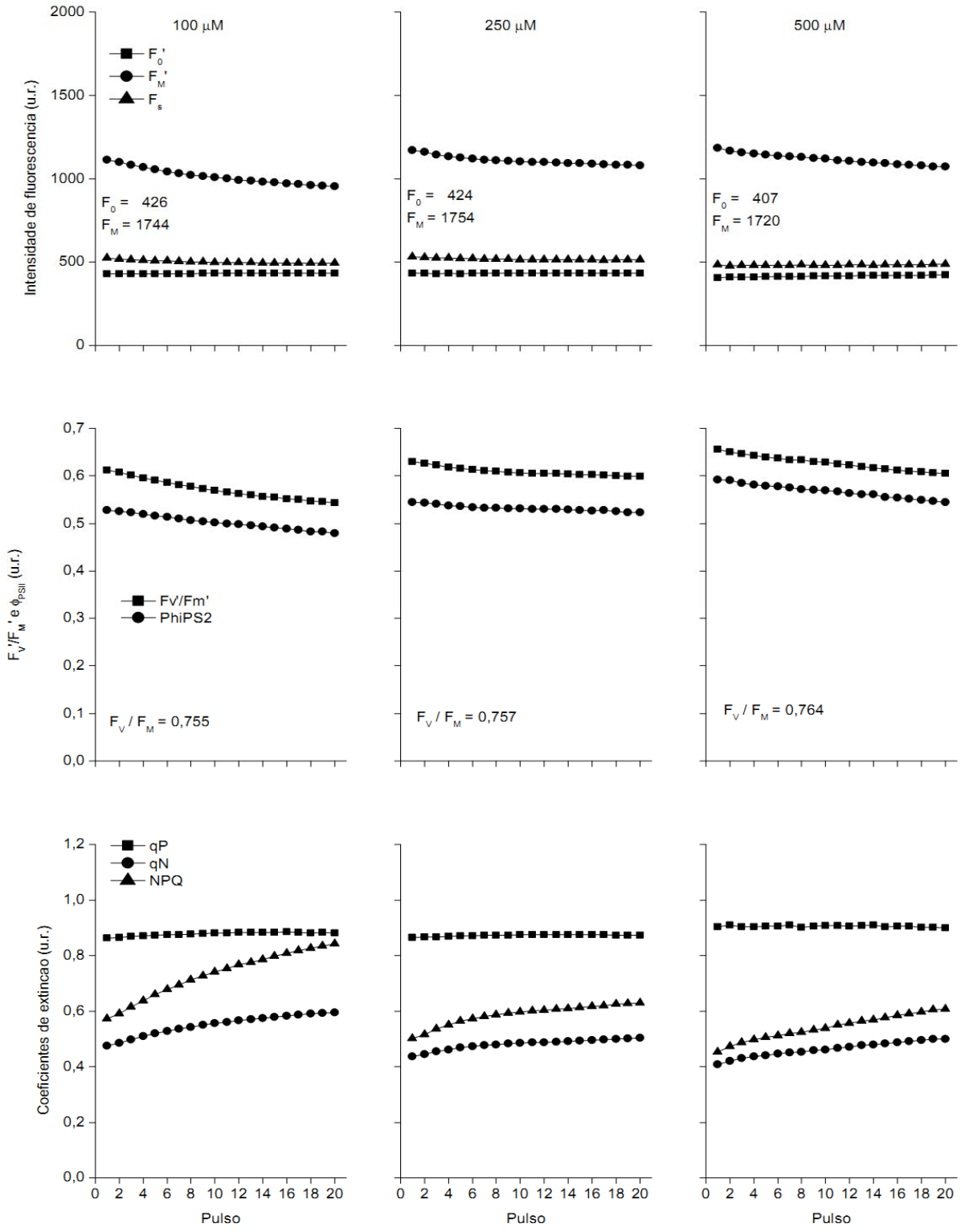

Figura 37. Análise de fluorescência modulada de discos foliares de milho submetidos ao herbicida fomesafen em diferentes doses (mais informações veja Figura A). (F_0 = fluorescência inicial, F_M = fluorescência máxima em estado adaptado ao escuro, F_M' = fluorescência máxima em cada pulso saturante, F_s = fluorescência em estado de state-steady, F_V/F_M = eficiência fotoquímica máxima, F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica máxima efetiva, φ_{FSII} = eficiência fotoquímica do fotossistema II, qP = coeficiente de extinção fotoquímico, qN = coeficiente de extinção não fotoquímico e NPQ = coeficiente de extinção não fotoquímico).

3.2.2.2. Análise de curva de intensidade luminosa vs parâmetros de PAM

A atividade fotossintética dos discos foliares de milho expostos a diferentes intensidades luminosas foi observada através das curvas de luz. Os resultados referentes ao tratamento controle demonstraram altos valores de F_v'/F_M', φ_{FSII} e qP no escuro, em torno de 0,55, 0,45 e 0,85, respectivamente, sendo estes reduzidos exponencialmente com o aumento da radiação, para aproximadamente 0,25, 0,06 e 0,3, respectivamente. Para ETR foram encontrados valores baixos no escuro, em torno de 24, sendo estes elevados para 65 na intensidade de luz de 500μmol m^{-2} s^{-1}, e a partir daí foram mantidos praticamente constantes nas radiações mais elevadas (Fig. 38).

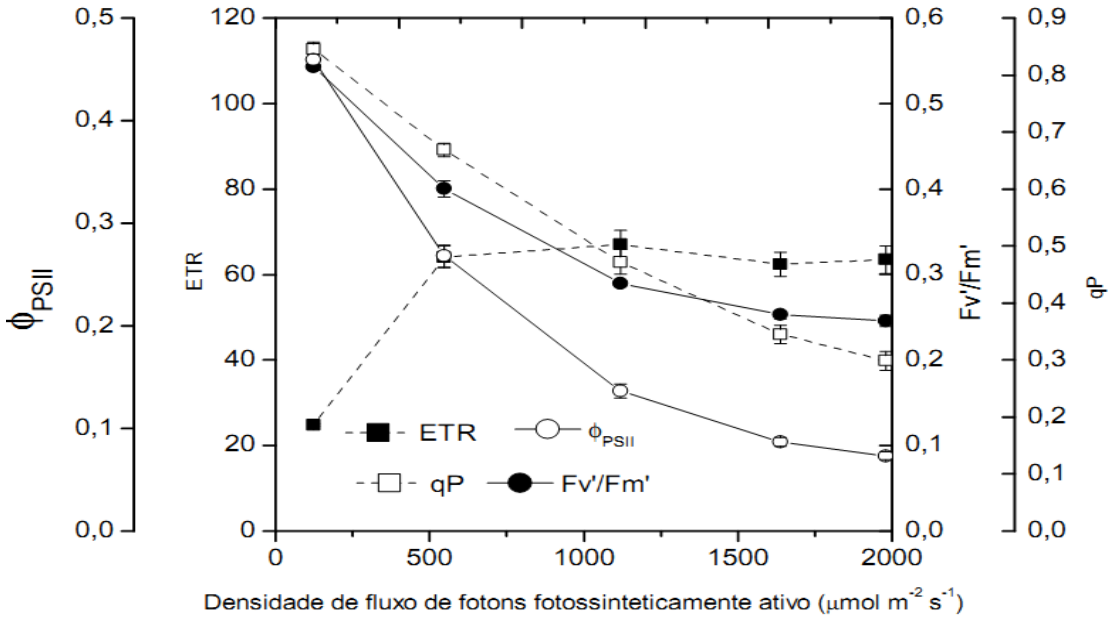

Figura 38. Curva de resposta à luz para os parâmetros de fluorescência modulada em discos foliares de milho submetidos ao tratamento controle. (φ_{FSII} = rendimento quântico do FSII, calculado a partir da fluorescência; ETR = taxa de transporte de elétrons no FSII; F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica efetiva; qP = coeficiente de extinção fotoquímico) (média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos).

Para o herbicida bentazon foram avaliadas apenas as doses de 100 e 250μM (Fig. 39). O efeito da ação do herbicida bentazon nos discos foliares de milho foi semelhante para as duas doses avaliadas, porém mais intenso na dose de 250μM. Nesta dose foram verificadas reduções nos valores iniciais de φ_{FSII}, qP e F_v'/F_M' em 40, 20 e 33%, respectivamente. A intensidade de ETR foi reduzida em aproximadamente 40% na radiação de 500μmol m^{-2} s^{-1}, sendo esta redução mantida nas demais intensidades de luz (Fig. 39B).

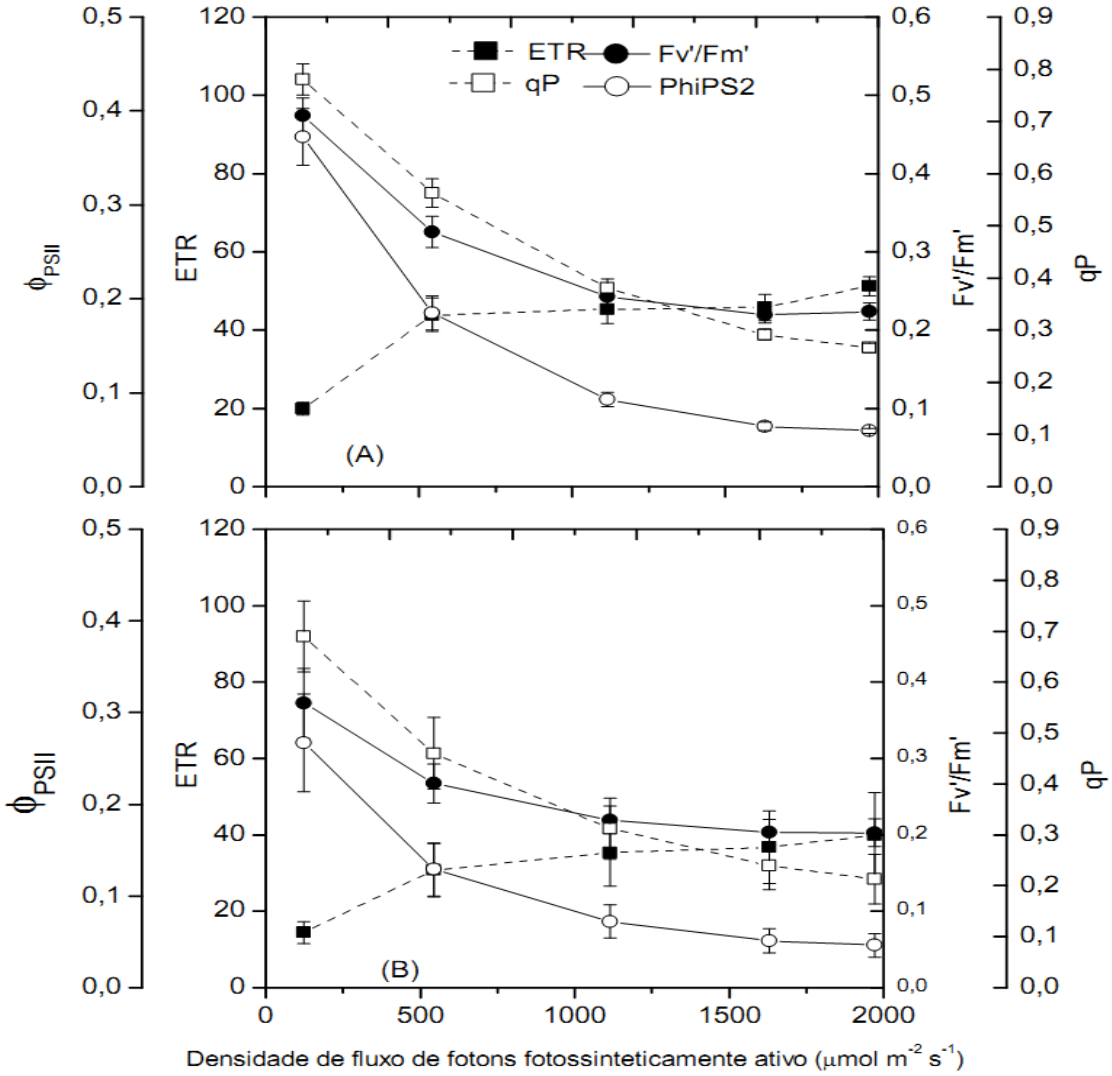

Figura 39. Curva de resposta à luz para os parâmetros de fluorescência modulada em discos foliares de milho submetidos ao herbicida bentazon em diferentes doses (A) 100µM e (B) 250µM. (φ_{FSII} = rendimento quântico do FSII, calculado a partir da fluorescência; ETR = taxa de transporte de elétrons no FSII; F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica efetiva; qP = coeficiente de extinção fotoquímico) (média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos). Obs.: A dose de 500µM foi letal aos discos foliares, não permitindo análise.

Os discos foliares de milho submetidos à ação do herbicida clomazone na dose de 100µM, não apresentaram diferença em seus parâmetros quando comparados ao controle (Fig. 40A). Para a dose de 250µM foi verificadodecréscimode 23% nos valores de ETR nas radiações de 500 e 1000µmol m^{-2} s^{-1}, sendo este ainda mais acentuado (aproximadamente 45%), nas radiações mais elevadas. Para φ_{FSII}, qP e F_v'/F_M foram observadas reduções de 22, 11 e 15%, respectivamente, quando comparados ao tratamento controle (Fig. 40B). A dose de 500µM do herbicida clomazone não foi avaliada.

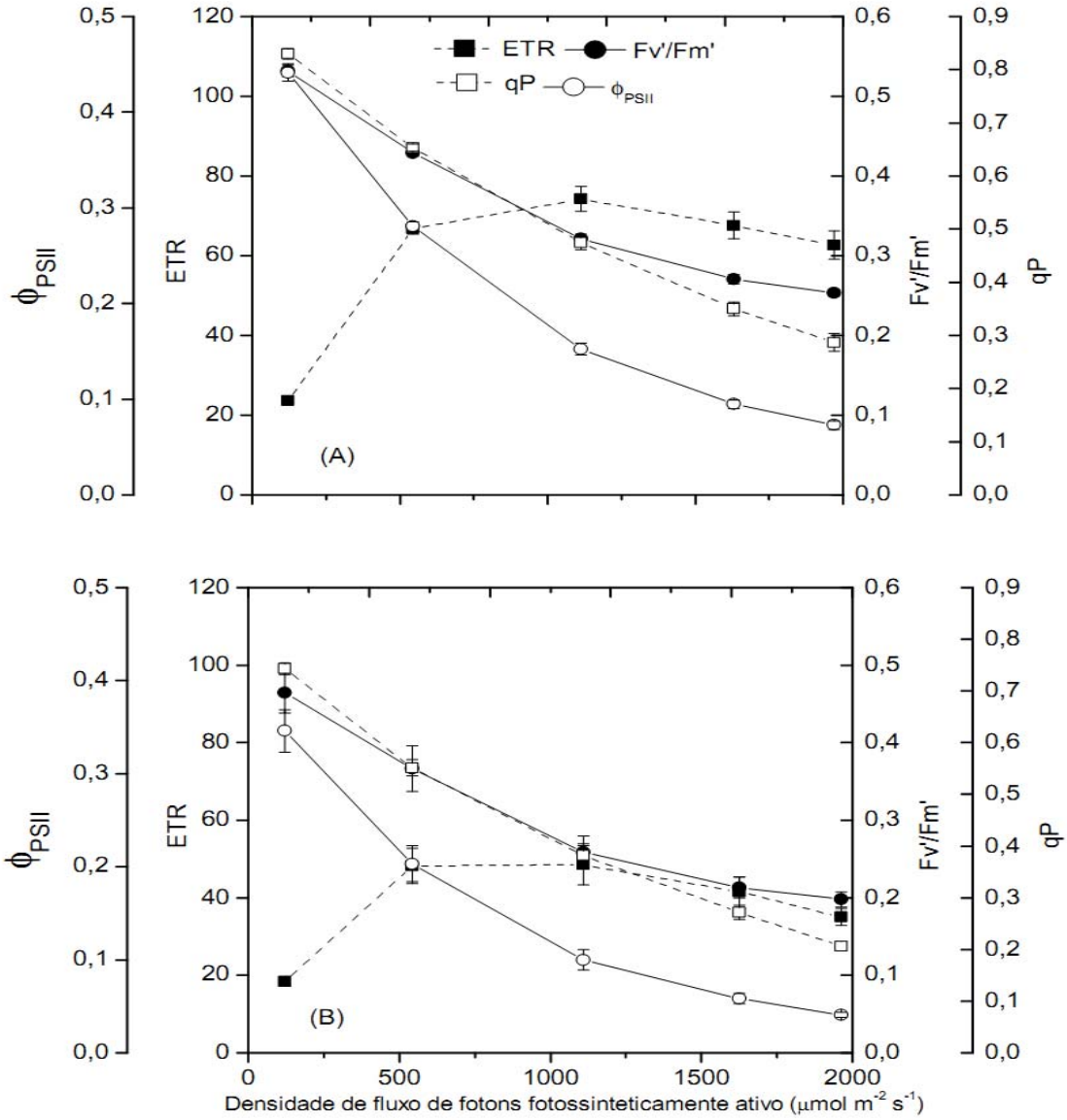

Figura 40. Curva de resposta à luz para os parâmetros de fluorescência modulada em discos foliares de milho submetidos ao herbicida clomazone em diferentes doses(A) 100μM e (B) 250μM. (φ_{FSII} = rendimento quântico do FSII, calculado a partir da fluorescência; ETR = taxa de transporte de elétrons no FSII; F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica efetiva; qP = coeficiente de extinção fotoquímico) (média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos). Obs.: A dose de 500μM foi letal aos discos foliares, não permitindo análise.

A aplicação do herbicida fomesafen nos discos foliares de milho resultou em suave redução dos parâmetros avaliados, quando comparados ao tratamento controle, sendo esta redução mais significativa apenas na dose de 500μM (Fig. 41). Nesta dose o parâmetro mais afetado foi ETR, sofrendo declínio de 40% em seus valores finais. Os parâmetros φ_{FSII}, qP e F_v'/F_M sofreram redução de 23, 12 e 13% respectivamente (Fig. 41C).

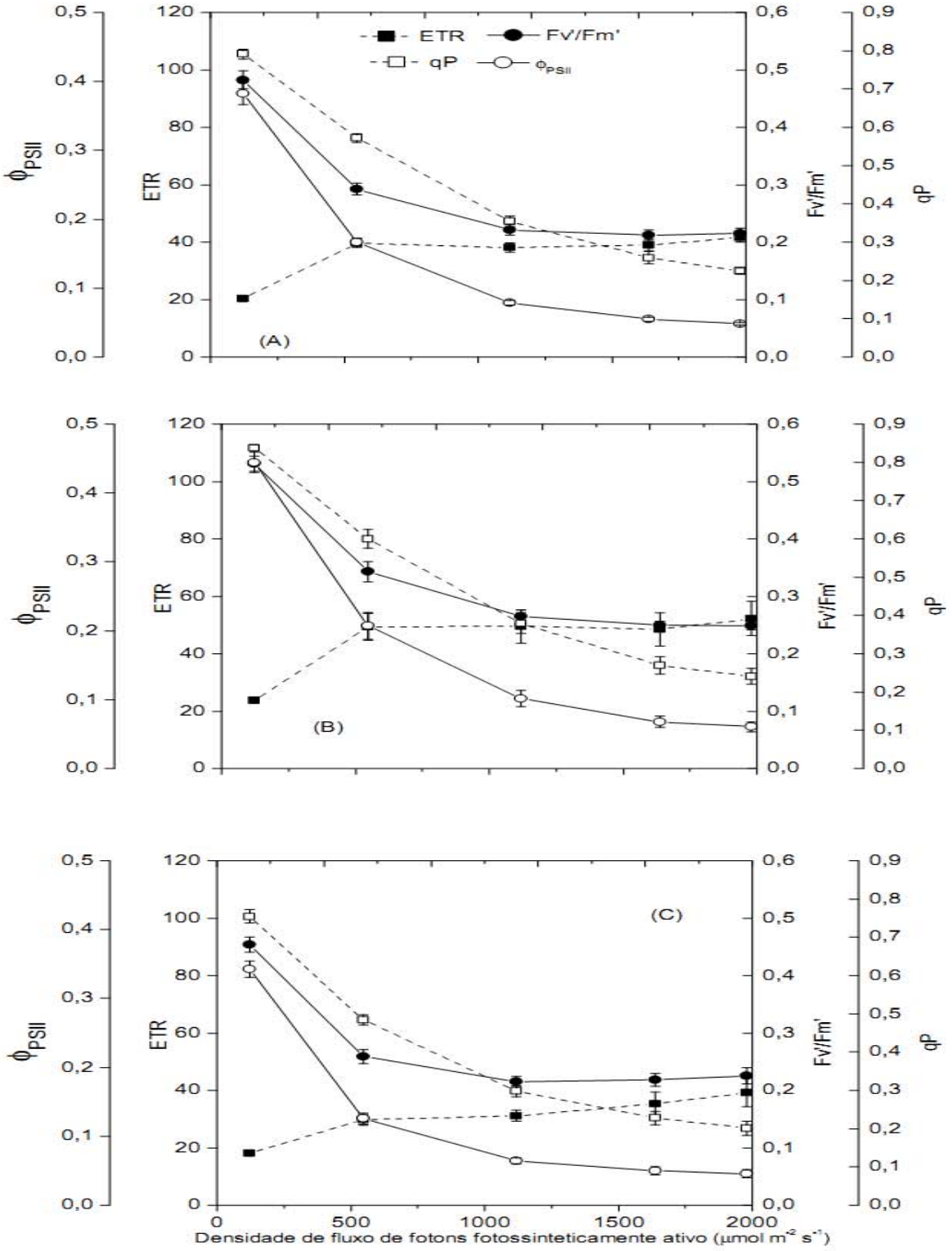

Figura 41.Curva de resposta à luz para os parâmetros de fluorescência modulada em discos foliares de milho submetidos ao herbicida fomesafen em diferentes doses(A) 100µM, (B) 250µM e (C) 500µM. (φ_{FSII} = rendimento quântico do FSII, calculado a partir da fluorescência; ETR = taxa de transporte de elétrons no FSII; F_V'/F_M' = eficiência fotoquímica efetiva; qP = coeficiente de extinção fotoquímico) (média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos).

No intervalo de radiação(de 100 a 2000µmol m^{-2} s^{-1}) utilizada para as avaliações das curvas de luz dos discos foliares de milho, foram determinados os parâmetrosφ_{FSII} e φCO_2. A relação entre estes dois parâmetros é uma forma eficaz deexaminar o transporte de elétronsea assimilação de CO_2. Gráficos demonstrando a relação $\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$ foram gerados, e a partir destes foram obtidas equações para verificar o ajuste dos pontos a reta que equivale à razão $\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$ igual a 12. Os pontos obtidos a partir da relação $\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$ do tratamento controle, demonstraram ajuste de 91% a reta, o que demonstra relação $\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$ próxima a 12 (Fig. 42).

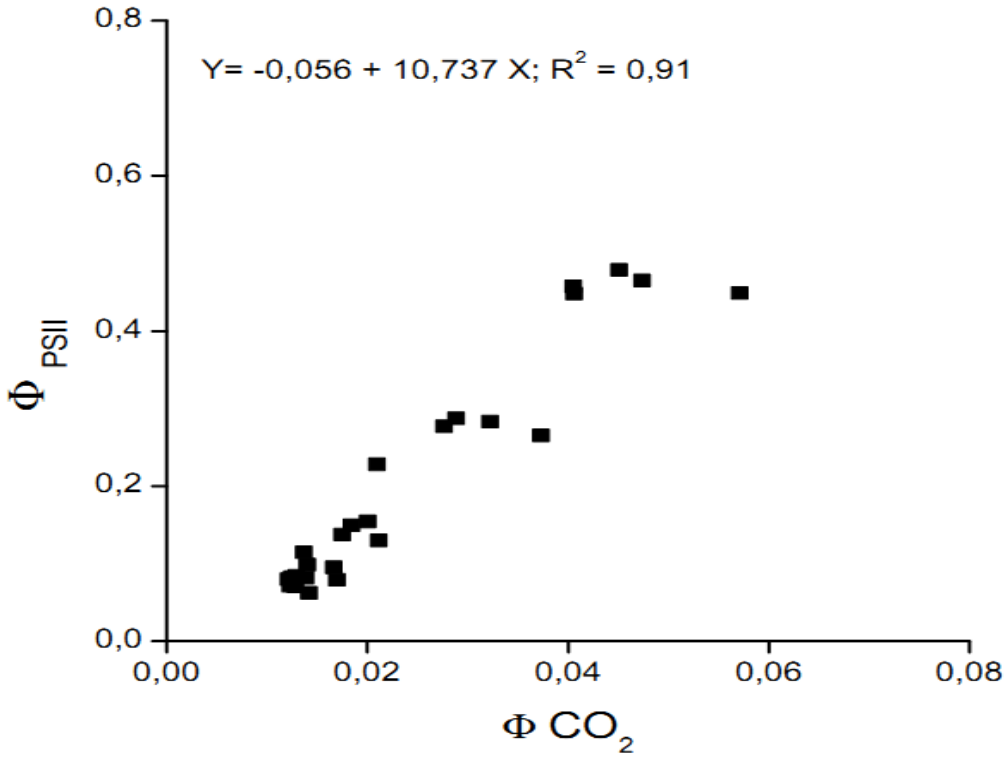

Figura 42.Relação entre Relação entre o rendimento quântico calculado a partir da assimilação de CO_2 (φCO_2) e o rendimento quântico do FSII calculado a partir da fluorescência (φ_{FSII}), para discos foliares de milho submetidos ao tratamento controle.

Os herbicidas bentazon, clomazone e fomesafen, em todas as doses avaliadas, demonstraram através dos gráficos obtidos, ajuste acima de 94% a reta que representa a razão $\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$ igual a 12 (Figura 43). Isto indica que os herbicidas não influenciaram a relação $\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$ dos discos foliares de milho avaliados.

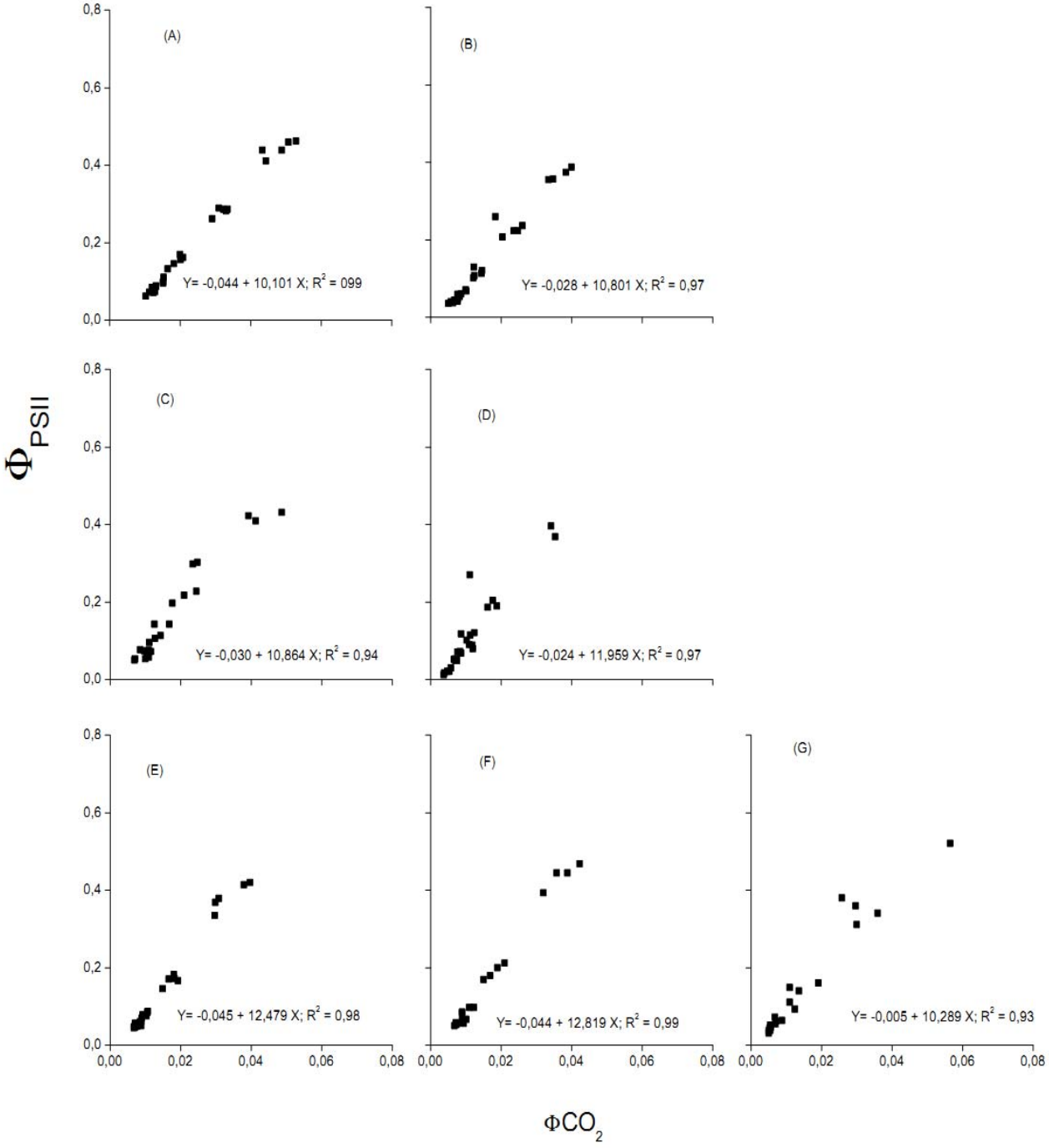

Figura 43.Relação entre Relação entre o rendimento quântico calculado a partir da assimilação de CO_2 (φCO_2) e o rendimento quântico do FSII calculado a partir da fluorescência (φ_{FSII}), para discos foliares de milho submetidos aos tratamentos com herbicidas: bentazon (A-B, doses de 100 e 250μM), clomazone (C-D, doses de 100 e 250μM) e fomesafen (E-G, doses de 100, 250 e 500μM).

3.2.3. Trocas gasosas

Os resultados referentes às trocas gasosas dos discos foliares de milho do tratamento controle estão demonstrados na Fig. 44. O aumento da radiação elevou quase linearmente os valores de A e g, sendo estes 22 e 0,15, respectivamente na intensidade de luz mais elevada (2000µmol m^{-2} s^{-1}). No escuro os valores de A e g se aproximaram a zero. A Ci foi de aproximadamente 220 no escuro, porém este valor foi reduzido para 120 na radiação de 500µmol m^{-2} s^{-1}, sendo este valor mantido para as demais intensidades luminosas.

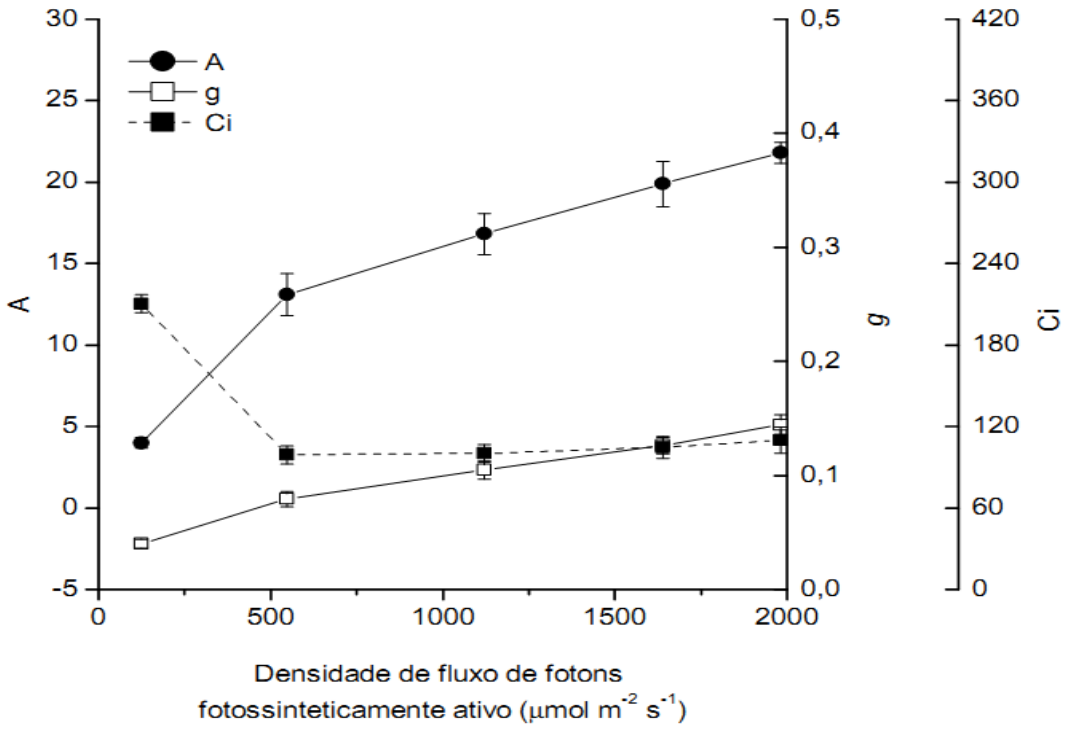

Figura 44**.**Curva de resposta à luz para os parâmetros de trocas gasosas em discos foliares de milho submetidos ao tratamento controle. (A = taxa fotossintética líquida em µmol m^{-2} s^{-1}; g = condutância estomática em mol m^{-2} s^{-1}e Ci = concentração intercelular de CO_2 em µmol mol)(média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos).

A aplicação do herbicida bentazon reduziu, nas duas doses avaliadas, os valores finais de A e g em 30 e 20%, respectivamente. Em contrapartida, a Ci se elevou em 25 e 50%, respectivamente para as doses de 100 e 250μM de bentazon, em todas as intensidades luminosas avaliadas (Fig. 45).

Os resultados encontrados para a dose de 100μM do herbicida clomazone não demonstraram diferença nos parâmetros de trocas gasosas, quando comparados ao controle. Na dose de 250μM os valores da Ci sofreram acréscimo de 40%, enquanto que A e g diminuiram 50 e 40%, respectivamente (Fig. 46).

Para o herbicida fomesafen foram verificados resultados semelhantes para as doses as três doses avaliadas, onde redução de 45 e 25%, respectivamente nos valores de A e g foram encontrados (Fig. 47). Para as doses de 100 e 250μM, a Ci no escuro sofreu pequena elevação de 10%, porém quando os discos foliares de milho foram expostos à luz, a Ci aumentou 35%, quando comparada ao controle. O herbicida fomesafen na dose de 500μMcausou aumentos de 22 e 50%, nos índices de Ci, respectivamente para as avaliações no escuro e na luz.

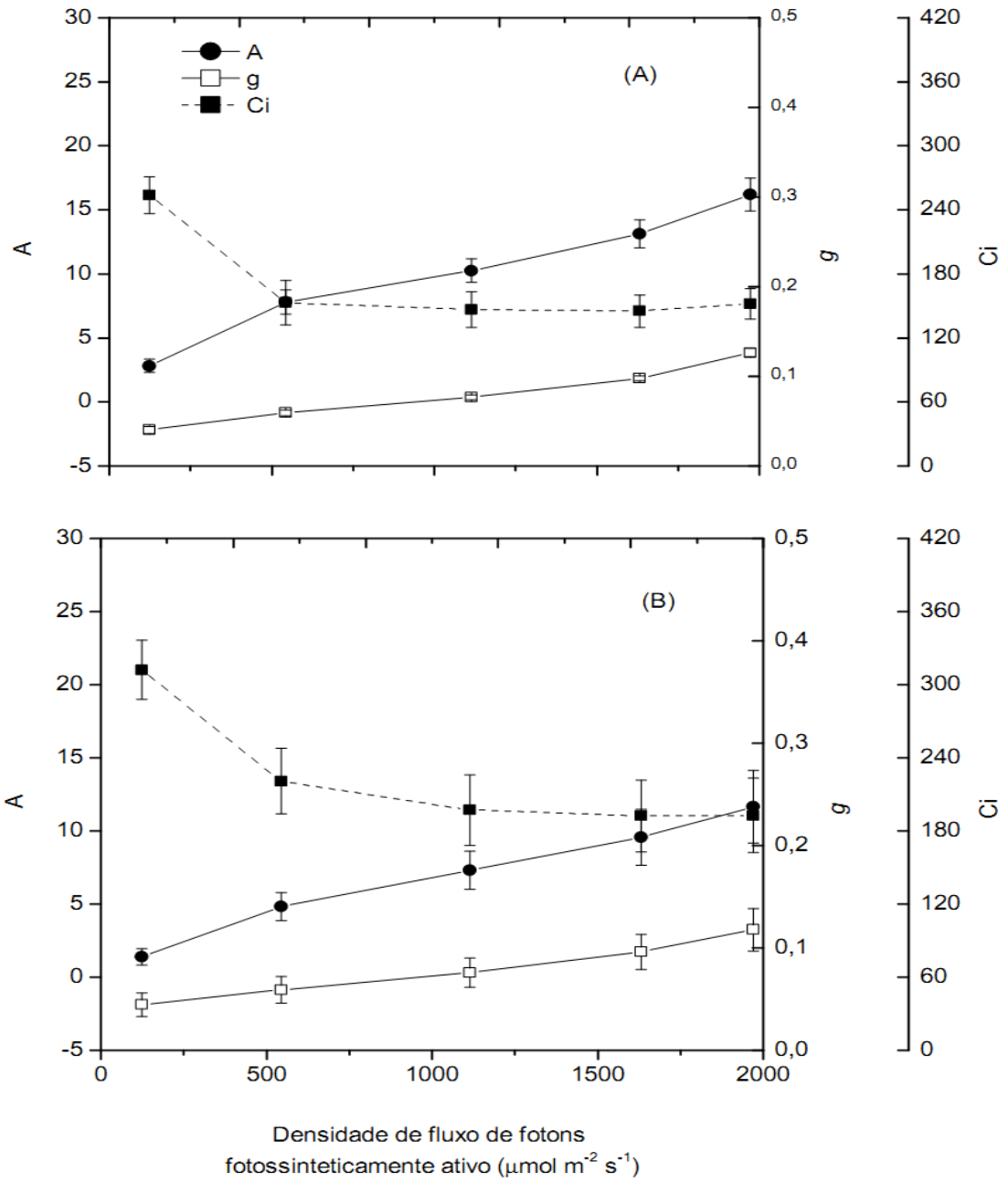

Figura 45. Curva de resposta a luz para os parâmetros trocas gasosas em discos foliares de milho submetidos ao herbicida bentazon em diferentes doses(A) 100µM e (B) 250µM. (A = taxa fotossintética líquida em µmol m^{-2} s^{-1}; g = condutância estomática em mol m^{-2} s^{-1}e Ci = concentração intercelular de CO_2 em µmol mol)(média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos). Obs.: A dose de 500µM foi letal aos discos foliares, não permitindo análise.

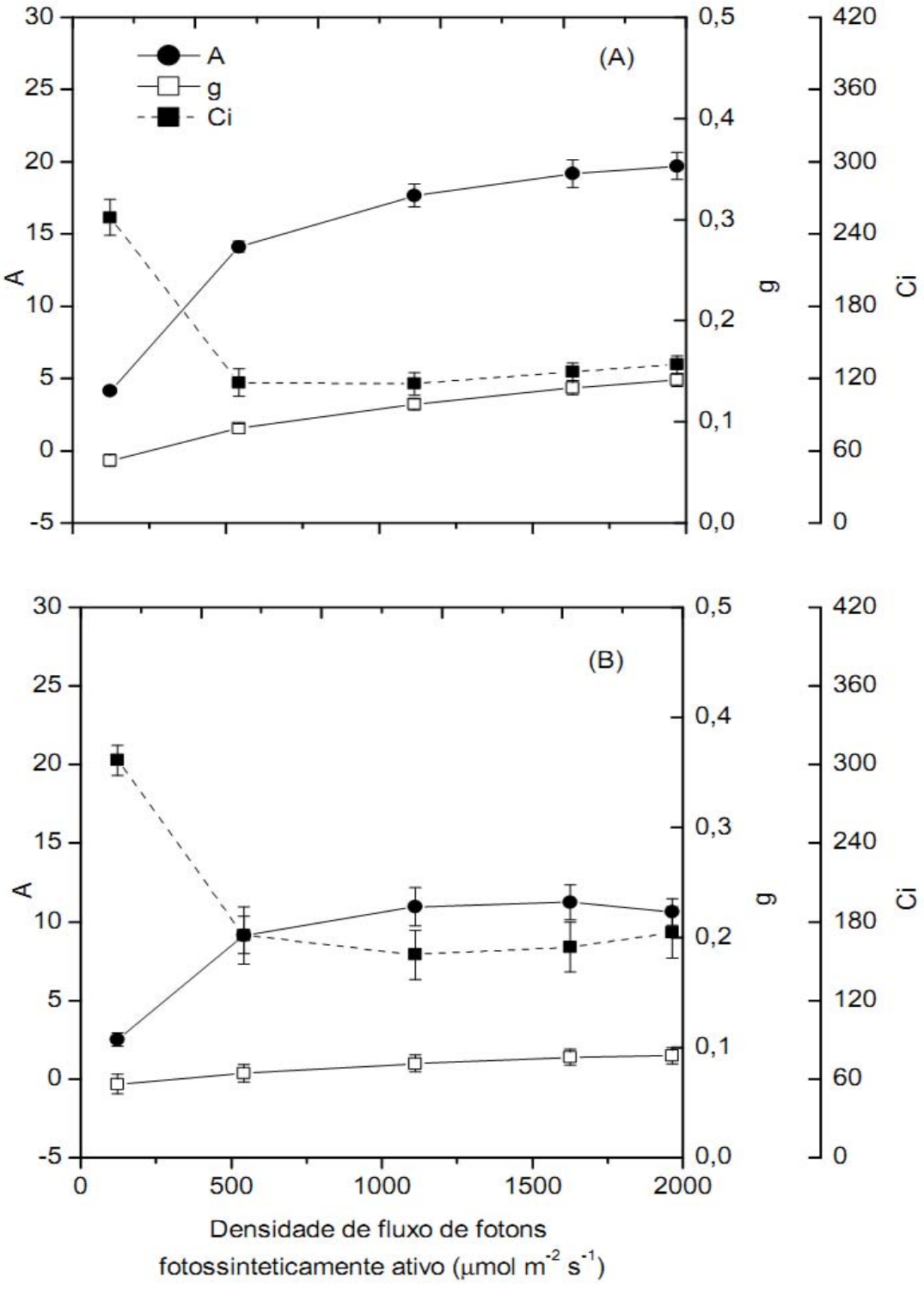

Figura 46.Curva de resposta a luz para os parâmetros trocas gasosas em discos foliares de milho submetidos ao herbicida clomazone em diferentes doses(A) 100µM e (B) 250µM. (A = taxa fotossintética líquida em µmol m^{-2} s^{-1}; g = condutância estomática em mol m^{-2} s^{-1}e Ci = concentração intercelular de CO_2 em µmol mol)(média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos). Obs.: A dose de 500µM foi letal aos discos foliares, não permitindo análise.

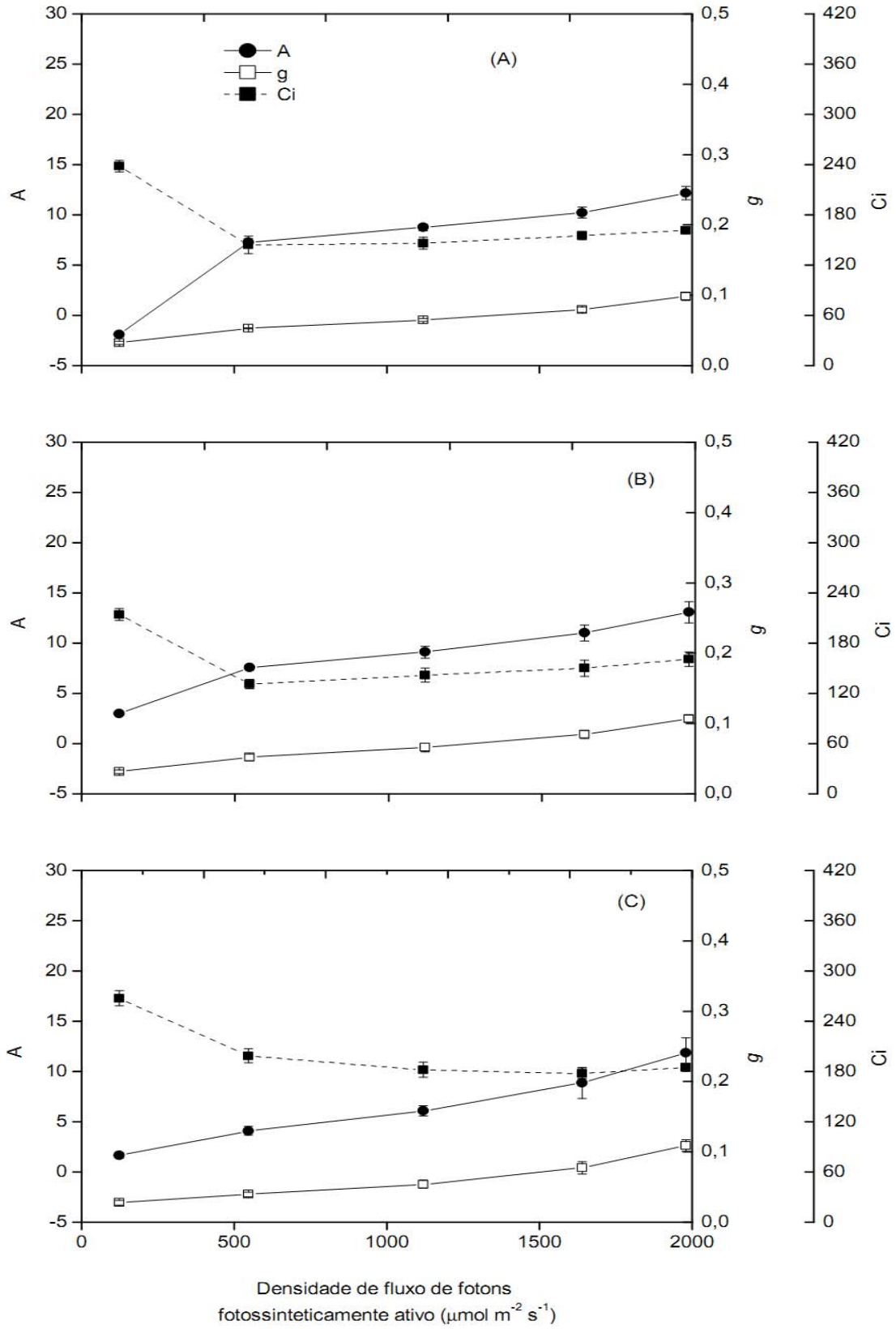

Figura 47. Curva de resposta a luz para os parâmetros trocas gasosas em discos foliares de milho submetidos ao herbicida fomesafen em diferentes doses(A) 100µM, (B) 250µM e (C) 500µM. (A = taxa fotossintética líquida em µmol m^{-2} s^{-1}; g = condutância estomática em mol m^{-2} s^{-1}e Ci = concentração intercelular de CO_2 em µmol mol)(média ± erro padrão, *n* = 5). (Detalhes vide material e métodos).

4. DISCUSSÃO

A aplicação de herbicidas no estudo sobre o comportamento fotossintético das plantas se torna de grande valia pelo fato do local de ação destas substâncias ser previamente conhecido.

A fotossíntese éumdosprocessos de maior importânciapara as plantas, e um considerável número de moléculas herbicidasinterfere em seu metabolismo de maneira direta ou indireta (por exemplo,os inibidores da acetolactato sintase (SOUSA et al., 2012; EULLAFFROY et al., 2009); da mitose e da glutamina sintetase (DAYAN; ZACCARO, 2012). Em circunstâncias normais, os elétrons derivadosa partir da oxidação da águasão canalizados atravésda cadeia de transportede elétronsfotossintética, a fim de produzir ATPe NADPH. Dentre as moléculas envolvidas na etapa fotoquímica da fotossíntese, as plastoquinonas, desempenham um papelchave na transferência deelétrons. Os doisprincipais alvos dos herbicidasinibidores da fotossíntesesãoa interrupçãodo fluxo de elétrons, através da competição pelo sítio de ligação de Q_B no FSII; e o desvio deelétronsnoFSI,através da captura dos elétrons à partir da ferredoxina (DAYAN; ZACCARO, 2012). Porém, diversas moléculas podem interferir indiretamente no metabolismo fotossintético.

O sítiode ligação de$Q_B$noFSIIpode se acoplarfacilmente avárias classes deinibidores deFSII, por exemplo, ureias, as triazinas e as bentazotadionas (ROMAN et al., 2007). Bentazon é um herbicida conhecido porinibir o fluxode elétronsnoFSII, porém de maneira diferente dos inibidorestípicos(BÖGER et al., 1977), causando muitas vezes injúrias mais leves do que aquelas obtidas pela aplicação de diuron.Esta diferença foi relatada por DAYAN e ZACCARO (2012), ondebentazoncausa diminuição inicialde 80% (3h após a aplicação)no fluxode elétronsda fotossíntese, sendo este parcialmente recuperado para 50% (15h após a aplicação), enquanto a redução encontrada para diuron foi de 100% permanentemente. Outros estudos documentama

recuperaçãoparcialdainibiçãodebentazonna fotossínteseao contrário deoutros inibidores deFSII,comprovando que este herbicidanão conduz àalteração substancialna atividade dosfotossistemas(BÖGER et al., 1977; MACEDO et al., 2008). Neste experimento o herbicida bentazon causou injúrias ao aparato fotossintético dos discos foliares de soja e milho, o que pode ser observado pela alteração de diversos parâmetros, porém esta injúria não chegou a 100% nem na dose de 500μM avaliada.

Um dospapéis fundamentaisdos carotenóidesem plantasé a proteção do aparelho fotossintéticodefotodegradaçãoporextinguir oexcesso de energialiberadopela fotossíntesesobalta intensidade de luz ou situações de estresse (SANDMANN, 2009). Diversas classes deherbicidasque afetamvários passosna síntese decarotenóidetêm sido desenvolvidas(DUKE; DAYAN, 2011). Entre eles o clomazone é um herbicida que tem como alvo a 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (DXS), enzima chave navia de fosfatometil-eritritol (MEP), que éresponsável pela síntesedeisoprenóidesplastídicos, como,carotenóides efitol (FERHATOGLU; BARRET, 2006). Uma vez quea inibição daDXSnão afetaos níveis de carotenóides pré-existente,seria de esperar quepouco ou nenhum efeitosobre a fotossíntese das plantas tratadas com clomazone fosse observada durantea duração relativamente curtadesteensaio. Entretanto, diversos parâmetros avaliados foram alterados quando o herbicida clomazone foi aplicado nos discos foliares de soja e milho.

O alvoprimário de herbicidasinibidores da síntese de clorofilaé a formacloroplasmáticadaprotoporfirinogênio oxidase(PROTOX) que catalisa a conversão deprotoporfirinogênioaprotoporfirina(DUKE; DAYAN, 2011).Esta enzimaé inibida porum grande número de classesde herbicidas, como, difeniléteres,oxadiazoles, triazolinonaseftalimidas. Este mecanismo de açãoenvolve o acúmulo não reguladodaprotoporfirina,pigmentoaltamentefotodinâmicoque induz a rápida peroxidaçãodas membranasapós a exposiçãoà luz (DAYAN; ZACCARO, 2012). As injúrias observadas nas plantas tratadas com o herbicida fomesafen não são devidas aumainibição diretada fotossíntese, mas sim àdestruição doaparelho fotossintéticoassociada com aperoxidaçãorápida dasmembranas celulares(DAYAN; DUKE, 1997).

Alterações no metabolismo fotossintéticonormal causadaspela ação de herbicidaspodem ser prontamentemedidas pormonitorizaçãoda fluorescência da clorofila*a*. A fluorescênciadas clorofilas é um reflexo dafixação de carbono, bem

como do estado de estresseglobal de umaplanta(MAXWELL; JOHNSON, 2000). A fluorescência da clorofilaé afetada não apenas pelos herbicidas inibidores da fotossíntese, mas também pordiferentes herbicidas dependentes de luz, tais como os inibidores da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) e da biossíntese de carotenóides(HESS, 2000). O herbicida bentazon por interferir diretamenteno fluxode elétrons, induz a fortes alterações nafluorescência da clorofilade plantas, como foi detectado nesta pesquisa. Nas avaliações das curvas OJIP, a fase OJ, reflete a reduçãode $Q_A$para Q_A^-; JI eIP, a redução do conjunto de PQ(STRASSER et al., 1995).Um aumento naintensidade de fluorescênciaem2ms (passoJ)é geralmente interpretado comoevidência de acumulaçãoda fraçãode $Q_A$reduzida(STRASSER etal, 1995;LAZAR; ILIK, 1997), possivelmente devido a diminuição do transportede elétronspara alémde Q_A(HALDIMANN; STRASSER, 1999). Desse modo, a alta intensidade dos níveis de fluorescência no passo J (próximos aos obtidos para F_M), encontradas neste experimento para o herbicida bentazon aplicado na dose de 500μM nos discos foliares de soja, demonstram que a maioria das Q_A encontram-se completamente reduzidas, pela inibição do transporte de elétrons, sendo assim apenas uma fase de indução única foi observada, já que não ocorre a redução do conjunto de PQ. Na ausência deinibidores de FSII, $Q_A$pode ser totalmentereduzidoapenas quandoQ_B^{-2}está presente, que ocorre somente nopassoI (ZHU et al., 2005).

Outras pesquisas relatam a observação desta fase de indução única quando utilizado o herbicida DCMU em diferentes espécies (STRASSER et al., 1995; PRASIL; YAAKOUBD, 1999; BUSKOV et al., 2004). A redução no número de elétrons tranferidos para a cadeia de transporte foi causada pela redução nos valores de N, observados para a dose de 500μM de bentazon. Porém, esta fase de indução única só foi observada para a dose mais elevada de bentazon utilizada nos discos foliares de soja, visto que as doses abaixo de 500μM para a soja e as três doses avaliadas para milho, não foram capazes de reduzir todas as Q_A, afetando apenas parcialmente o transporte de elétrons. A ação do herbicida clomazone e fomesafen não resultou em grandes alterações nas curvas OJIP, tanto para os discos foliares de soja e de milho, sendo os parâmetros do milho praticamente inalterados.

Apartir do comportamento polifásico do aumento da fluorescência, os parâmetros do Teste JIP foram obtidos (STRASSER; STRASSER, 1995; STRASSER et al., 2000). Estes parâmetros demonstram alterações no aparato fotossintético que não podem ser visualizadas através da curva OJIP. Os índices de desempenho(PI_{ABS} e $PI_{ABStotal}$) tem sido considerados como mais sensíveis para a detecção e quantificação de estresse em plantas do que o rendimento quântico máximo do FSII (F_V/F_M) (CHRISTEN et al., 2007; OUKARROUM et al., 2007), ou seja, mais consistênciapara interpretação dos resultados obtida quando se avalia a resposta do fotossistema II para condições estressantes. Isto ocorre, porque os índices de desempenho relacionam a eficiência de absorção, captura e transferência de energia de excitação pelo fotossistema II proporcionando uma visão maior do grau de efeito do ambiente estressante (GONÇALVES; SANTOS JR., 2005). Neste experimento, os parâmetros mais sensíveis a ação dos três herbicidas avaliados, tanto para soja como para milho, foram PI_{ABS} e $PI_{ABStotal}$. Adiminuição nos índices de desempenho, indicam perda de eficiência fotoquímica pelas plantas (THACH et al., 2007).

Na maioria dasplantas superiores, φ_{Po} (F_V/F_M) está entre0,75 a 0,85 (BÒLHAR-NORDENKAMPF et al., 1989) e sob condições controladaseste parâmetroé frequentemente proporcional àtaxa fotossintética, sendo a redução desta razão um excelente indicador de efeito fotoinibitório quando as plantas estão submetidas ao estresse químico (ARAUS; HOGAN, 1994). Entretanto, neste experimento, mesmo nas doses mais elevadas dos herbicidas o parâmetro φ_{Po} não apresentou alteração em relação aos discos foliares do tratamento controle. Diversosautores também não encontraramvariações emφ_{Po} (F_V/F_M) sob diferentes estresses(SILVA; ARRABAÇA, 2004; KAÑA et al., 2004;OKARROUMA et al., 2007; MEHTA et al., 2010; GIORIO et al., 2012). Além disso, o parâmetro DI_0/RC foi alterado apenas pela aplicação do herbicida clomazone, porém em taxas muito pequenas, provavelmente pela tentativa de dissipação de energia em excesso na forma de calor. Estudo realizado por Kaña e colaboradores (2004) demonstrou que o parâmetroTR_0/RCfoicerca de 30% maior nas plantas de cevadacultivadasna presença de500μM de clomazonedo queasplantas de cevada do tratamento controle, porém esta alteração não foi verificada para os discos foliares de soja e milho neste estudo.

Uma avaliação mais criteriosa sobre a atividade dos centros de reação permite avaliar a heterogeinidade dos centros de reação do FSII, ou seja, diferenciar os centros redutores de Q_B, considerados ativos, dos centros não-redutores deQ_B, conhecidos como inativos. Asunidades comcentros de reação ativosmostramumafluorescênciapolifásicatransiente,com os passos J,I eP distintos e os inactivostemapenas uma fase(semelhante aopassoJ), sendo assim as unidades deinativoscomportam-sede forma semelhanteàs unidadesativas que sãoinibidas cominibidores de FSII (STRASSER; STIRBET, 1998), como pode ser observado nesta pesquisa, para todos os tratamentos avaliados. Nas avaliações do herbicida bentazon foram verificadas reduções nas intensidades de fluorescência do transiente das unidades inativas, o que demonstra que este herbicida afeta a atividade dos centros de reação redutores de Q_B, o que também pode ser observado pela redução nos valores de V_0*, nos discos foliares de soja e de milho. Já para os demais herbicidas avaliados, não foram obtidas variações relevantes nos transientes das unidades inativas, tanto para os discos foliares de soja como de milho, o que demonstra a pouca influência destes herbicidas sobre a heterogeinidade dos centros de reação do FSII. Relatos de que a quantidade de centros de reação não-redutores de Q_B podem ser alterados sobre a ação de estresse já foram realizados, porém algumas vezes o que ocorre é uma elevação no número de unidades inativas (MEHTA et al., 2011).

A energia luminosaabsorvida pelasmoléculas de clorofilanuma folhapode ser submetida atrêsdestinos distintos:ela pode ser usadana fotossíntese (fotoquímica); o excesso de energiapode ser dissipadona forma de calor; ou pode serreemitidocomofluorescência da clorofila.Estestrêsprocessos competem um com o outro,de tal modo quequalquer aumento na eficiênciadeumirá resultar numadiminuição do rendimentodos outros dois(MAXWELL; JOHNSON, 2000). Através dos dados de cinética de relaxamento, foi possível acompanhar a atividade fotossintética das plantas sob pulsos de luz saturante constantes. Análises da cinética de relaxamento fornecemrápida informaçãosobre a cinética datransferência de energiade excitaçãoentre os complexosantenae os aceptores de elétrons do FSII (ROELOFSet al, 1992;RENGERet al, 1995).Nestas avaliações, os discos foliares de soja mostraram-se mais sensíveis que os de milho ao estresse causado pelos três herbicidas avaliados.

Altas intensidades de F_0' foram observadas para a soja e milho tratados com o herbicida bentazon, para os demais herbicidas não foram verificadas alterações em F_0' para nenhuma das espécies avaliadas. Os altos valoresde F_0'observados podem ter várias causas, como o aumento do númerode centros de reaçãoinativosonde os elétronsnãopodem sertransferidos para Q_A que está reduzidae, portanto,maiorF_0' é medido;outra possibilidadeé a baixa transferência de energiadeLHCII para o centro de reaçãodo FSII, o que pode ter sido causadapela dissociação doLHCIIdo núcleoFSII (HAVAUX, 1993). No caso do herbicida bentazon, o motivo do aumento de F_0', provavelmente tenha sido devido ao aumento dos centros de reação inativos, pelo fato das Q_A estarem reduzidas e indisponíveis para receber elétrons, corroborando com os dados de fluorescência transiente encontrados para o bentazon neste estudo. Para os demais hebicidas foi verificada insensibilidade de F_0', provavelmente pelo fato destes não inibirem diretamente o fluxo de elétrons, ou seja, não ocorre a inativação dos centros de reação e sim alteração no metabolismo fotossintético como reação a ação destas moléculas. Neste trabalho, também foi observado para o herbicida bentazon valores iniciais mais elevados para F_M', entretanto estes valores decresceram durante a aplicação dos pulsos de luz saturante, o que também pode indicar a inativação dos centros de reação do FSII, confirmando o que foi encontrado para F_0'.

É sugerido que a acumulação decentros de reaçãoinativosestá associado com oaumento da eficiênciade dissipaçãode luz absorvidana forma de calor (KALAJI et al., 2011), porém isto deveria ser refletido em valoressignificativamente mais elevadosdos parâmetrosque indicama eficácia dos processosnão-fotoquímicos de excitação, como por exemplo DI_0/RC e φ_{Do}, o que não foi verificado no Teste JIP avaliado neste estudo.

Outra intensidade de fluorescência fortemente elevada pela ação do herbicida bentazon foi F_S. Diversos autores relatam que F_S é um parâmetro sensível ao estresse em plantas C_3,C_4e CAM(CEROVIC etal.,1996; FLEXASet al.,2000). A intensidadede fluorescência no estado estacionário (F_S), é uma função da competição entre a energia de excitaçãofotoquímicae não-fotoquímica absorvida pelos complexosde colheita de luz(SCHREIBER et al., 1998). O aumento desta competição, causado pela ação do herbicida, é demonstrado pela elevação de F_S, aqui mencionada, provavelmente devido ao não-aproveitamento de parte da energia que chegava ao complexo-antena, uma vez que estes bloquearam o fluxo de

elétrons no FSII no nível da proteína D_1. Frankart e colaboradores (2003) já haviam observado elevação de F_S em plantas submetidas à ação de atrazina (herbicida inibidor de FSII). Esta elevação nos valores de F_S também foi observada para as duas doses mais elevadas de clomazone aplicado nos discos foliares de soja, só que neste caso o motivo provável tenha sido a redução na quantidade de energia aproveitada pela planta para realização dos processos fotoquímicos, como fixação de CO_2 e redução de $NADP^+$. Para os discos foliares de milho este parâmetro foi insensível à ação do herbicida bentazon.

Normalmente, a quantidade total defluorescência da clorofilaé muito pequena,egrandes porçõesda luz absorvidasão usadas para conduzira fotossíntese, que é referido comoqP, ou são dissipadasna forma de calor, em extinção de fluorescência,que é denominadoNPQ ou qN(RALPH;GADEMANN, 2005).Logo quea energia absorvida pelospigmentos vegetaisexcede o requisitopara a atividadefotoquímica, ou que por algum estresse ocorra excesso de energia acumulada nos centros de reação do FSII, mecanismo rápidode dissipação de caloré acionado,a fim de impedira produção deespécies reativas de oxigênio (SZABOet al., 2005;. EBERHARDet al., 2008). Este mecanismoé conhecido comonão fotoquímico(NPQ ou qN) de fluorescência da clorofilaporque competecom afotoquímicapara extinguir apouca energiaque a clorofilaexcitadapodereemitircomo fluorescência(DEMMIG-ADAMS, 2003;KRAUSE; JAHNS, 2003; HOLTetal., 2004;BAKER,2008). NPQ e qN representam a dissipação daenergia dos fótonsem excesso, evitando danos à viafotoquímica,antes que a energiaseja acumuladacomo intermediários reativosna cadeiafotossintética(RALPHetal., 2002).

Nas duas espécies tratadas com o herbicida clomazone houve um grande aumento nos valores de NPQ e qN, o que representa maior dissipação não-fotoquímica da energia absorvida pelos fótons. Nos discos foliares de soja, o herbicida bentazon também causou elevação nos índices de qN e NPQ, porém inferiores as encontradas para o clomazone. Kim e colaboradores (1999), não verificaram alteração em qN para tecidos tratados com o herbicida diuron. No entanto, nos discos foliares de milho ocorreu decréscimo principalmente nos valores de NPQ quando submetidos à ação de bentazon. Este decréscimo de NPQ também foi observado em estudos realizados com *Lemma minor* exposta ao herbicida atrazina (FRANKART et al., 2003). Geralmente,a sobre-regulaçãodeNPQé pelo menosbifásica comumcomponente rápidoque reageem segundos,e um

componentelento comcinética deativação completana escalade minutos (MÜLLERetal, 2001;. GROUNEVAetal., 2009).

Ocomponente rápidoé controlado porumgradiente de pHna membrana dos tilacóides, enquanto que a epoxidaçãodepigmentosdo ciclodas xantofilaé responsável pelafase mais lentadeqE(LAVAUD, 2007). Casoa absorção da luzexceda a capacidadeparaa fixação de CO_2, umaΔpHnos tilacóidesé construídapelotransporte de elétronsda fotossíntese.Aacidificaçãodo lúmenativaa conversão enzimática deum carotenóide, violaxantina azeaxantina, que é um supressordos estadosde clorofila“triplet”s(MÜLLER et al., 2001).Esta variação na regulação de NPQ pode ser o fator responsável pela forma como as duas espécies responderam diferentemente a ação do herbicida bentazon. Para o herbicida fomesafen, alterações pouco significativas de qN e NPQ foram verificadas para as duas espécies.

Valores de rendimento quântico fotoquímico efetivo (F_V'/F_M') muito inferiores aqueles encontrados para rendimento quântico fotoquímico máximo (F_V/F_M) demonstram que os discos foliares de soja e milho não foram capazes de manter sua atividade fotossintética próxima ao potencial das folhas, quando submetidos a ação de bentazon e clomazone. Esta redução na atividade fotossintética se deve a acentuada redução da eficiência fotoquímica (φ_{FSII}), demonstrada também pelo coeficiente de extinção fotoquímico (qP), observados nestas avaliações. Redução destes parâmetros em situações de estresse foram observadas em diversos estudos (CALATAYUD;BARRENO, 2004; PEI; BIÉ, 2007). Estes efeitos foram mais intensos nas doses mais elevadas de bentazon e clomazone. Para fomesafen ocorreu suave declínio na eficiência fotoquímica, porém sem causar redução no rendimento quântico fotoquímico efetivo dos discos foliares de soja e milho.

Curvas de resposta à luzsão amplamente utilizadaspara a caracterizaçãoquantitativa daluz-dependência da atividadefotossintéticade organismosfotoautotróficos(HENLEY, 1993).Tradicionalmente, as curvas de luz sãobaseados na mediçãodo estado estacionário detaxas de fotossíntesesob uma gama deníveis de irradiânciarelevantes, informando assim sobre a atividadefotossintéticaque pode ser esperadasobumairradiânciadeterminada, sob condições constantes (CRUZ; SERÔDIO, 2008).

Asinformaçõescontidas nascurvas de resposta àluzsão geralmenteresumidas porumpequeno número deparâmetrosfisiologicamentesignificativos. φ_{FSII}mede a

proporçãode luz absorvidapela clorofilaassociada ao FSIIusadana fotoquímica. Como tal, pode dar umamedida da taxadetransporte de elétronslinear (ETR) eumaindicaçãoda fotossínteseglobal (FU et al., 2012).Os resultados de qPe dá uma indicaçãoda proporção decentros de reação abertos noFSII, e φ_{FSII}é a proporção deenergia absorvidausadana fotoquímica(MAXWELL; JOHNSON, 2000). No entanto,existe uma correlaçãoestreita entre osdois parâmetros. Esta correlação foi verificada em todas as avaliações realizadas nesta pesquisa. A ação dos herbicidas causou redução semelhante em φ_{FSII} e qP, sendo esta mais acentuada para o primeiro parâmetro. Os discos foliares de soja foram mais sensíveis à ação das três moléculas herbicida do que os discos foliares de milho, e para as duas espécies o herbicida bentazon foi o que resultou em danos mais significativos. Além disso, para todas as avaliações, foi observado um declínio gradual em φ_{FSII} e qP à medida que intensidadede luz foi aumentada. Em geral, isto ocorre devido à fotoinibição, causada pelo excesso de energia (FU et al., 2012).

O parâmetro mais sensível aos herbicidas nas avaliações das curvas de luz foi a taxa de transporte de elétrons (ETR). Como ETR é função de φ_{FSII}, reduções deste parâmetro foram observadas, o que indica redução no transporte de elétrons linear da fotossíntese quando os discos foliares de soja e milho foram submetidos aos tratamentos com bentazon, clomazone e fomesafen. Entretanto, diferentemente de φ_{FSII} e qP, ETR em função dairradiânciamostroua formaclássicade uma curva deluz, com um aumentolinearonde a luzfoi limitanteseguido porum patamar,onde avia fotossintéticaficoulimitada (RALPH; GADEMANN, 2005). Isto ocorre, porque nas primeiras emissões de luz, os processos de transportede elétrons estão sendo estabelecidos (IHNKEN et al., 2010), ocasionando um aumento significativo em relação ao ETR no escuro. DAYAN e ZACCARO (2012) verificaram forte efeito de bentazon e sulfentrazone (inibidor de PROTOX) na redução de ETR de plantas de pepino na presença de luz, porém para clomazone nenhum efeito foi observado. Em contrapartida, a aplicação deherbicidaclomazoneafetou afotossíntese de plantas de cevada(*Hordeumvulgare*L.), reduzindo os níveis declorofilase carotenóides, que diminuiram a taxade transporte de elétrons(KAÑA et al., 2004).

A relação $\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$, forneceu informações importantes sobre a ação das moléculas de herbicidasnas duas espécies avaliadas. N soja, embora o herbicida bentazon tenha reduzido consideravelmente os valores de φ_{FSII}, a proporção de

equivalentes de elétrons resultantes da atividade fotoquímica do FSII que são usados para a assimilação de CO_2 em folhas é consideravelmente a mesma do tratamento controle. Já para os herbicidas clomazone e fomesafen a taxa de transporte de elétrons através de FSII foi considerada excessiva em relação às taxas observadas de assimilação de CO_2. Rotas alternativas para os elétronsalém da assimilação de CO_2 devem estar operandopara manterasaltas relações $\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$encontradas.

A dissipação doexcesso de energiapode continuaratravés de processosde transporte de elétrons, mesmo quando, por qualquer razão, a assimilação líquida de CO_2é reduzida.Estesprocessos incluem afotorespiração(WUet al.,1991), a reação de Mehler(ASADA, 1999) eo fluxode elétronscíclicoem tornoFSI (KATONA et al.,1992) e FSII(ALLAKHVERDIEV etal., 1997). Para os discos foliares de milho a razão $\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$foi mantida, para todos os herbicidas avaliados, próxima a 12, ou seja, sem alterações em relação ao controle. Isto sugere que o mecanismo que ocorre nos discos foliares de soja submetidos à ação de clomazone e fomesafen (para manter as altas relações$\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$) seja a fotorrespiração. Isto justificaria a manutenção da relação $\varphi_{FSII}/\varphi CO_2$,próxima a 12, encontrada para as plantas demilho tratadas com os herbicidasclomazone e fomesafen, visto que o milho possui metabolismo fotossintético C_4, apresentando típica anatomiaKranz, que proporciona assimilação primária de carbono nas células do mesofilo eredução̧odo carbono pela fotossíntesenas células da bainha (HATTERSLEY, 1984), resultando em altas concentraçõesde CO_2nas células, o que reduz a níveis insignificativos as taxas de fotorrespiração, em comparação as espécies C_3, justificando assim os resultados encontrados neste trabalho.

O emprego de caracteres fisiológicos referentes às trocas gasosas é de grande importância na avaliação da atividade fotossintética das plantas expostas a diferentes estresses. Todos os tratamentos avaliados nesta pesquisa resultaram em declínio nos valores da taxa assimilação líquida (*A*) dos discos foliares de soja e milho, em relação aos obtidos para o tratamento controle. Além disso, ao longo do aumento das intensidades luminosas avaliadas também houve redução de *A*. Embora a luz seja a fonte de energia para o processo fotossintético e, obviamente, o pré-requisito essencial para a vida na Terra, o excesso desse recurso pode ter como

consequência a redução ou mesmo a inibição da assimilação fotossintética de CO_2 (LONG et al., 1994).

O excesso de luz pode causar destruição fotooxidativa do aparato fotossintético, ou seja, nessa condição, a energia luminosa não é utilizada no processo fotossintético. Este processo de diminuição da eficiência na incorporação do carbono pela elevada energia luminosa é denominado fotoinibição (LONG et al., 1994) e pode ocorrer mesmo na ausência de qualquer outro tipo de estresse (ÖGREEN, 1988). Isto foi verificado nesta pesquisa, onde inclusive as plantas do tratamento controle de soja e milho demonstraram redução de A com o aumento da radiação.

A condutância estomática (*g*) apresentou padrões similares ao da taxa de fotossíntese, na maioria dos tratamentos avaliados, sugerindo que a queda da assimilação líquida de CO_2 esteja relacionada com o fechamento parcial dos estômatos. As correlações entre a assimilação de CO_2 e a condutância estomática podem ser explicadas como uma função da restrição da fixação de CO_2 por alterações no metabolismo fotossintético das plantas (SILVA et al., 2010). Em conjunto com a redução de *A* e *g* gerada pela ação dos herbicidas nos discos foliares de soja e milho, a concentração intracelular de CO_2 foi elevada em todos os tratamentos avaliados, provavelmente devido ao fechamento estomático e redução na taxa de assimilação líquida causada pela situação de estresse.

5. CONCLUSÃO

As avaliações de fluorescência transiente e modulada, embora sejam técnicas distintas, fornecem informações complementares sobre a atividade fotossintética dos discos foliares de soja e milho expostas a ação de bentazon, clomazone e fomesafen.

O herbicida bentazon é o que mais afeta as intensidades defluorescência da clorofila e os demais parâmetros obtidos através das duas técnicas utilizadas, por agirdiretamente na fotossíntese, bloqueando o transporte de elétrons.

Os herbicidas clomazone e fomesafenpouco alteraram os dados referentes à fluorescência transiente, sendo os parâmetros de fluorescência modulada e trocas gasosas mais sensíveis à sua ação. Os resultados obtidos para o herbicida clomazone fornecem informações importantes sobre o diferente efeito da fotoinibição em plantas com metabolismo C_3 e C_4.

Os índices de desempenhoPI_{ABS} e $PI_{ABStotal}$foram os parâmetros de fluorescência transiente mais sensíveis a ação de bentazon, clomazone e fomesafen. O rendimento quântico máximo do FSII (F_V/F_M) foi insensível à ação dos herbicidas, não sendo um bom indicador do estresse causado por estas moléculas.

Nas análises de fluorescência modulada, os parâmetros mais sensíveis à ação de bentazon, clomazone e fomesafen foram F_S, F_M', ETR e φ_{PSII}, sendo bons indicadores de sensibilidade à ação de herbicidas.

O milho é menos sensível que a soja aos herbicidas bentazon, clomazone e fomesafen, sugerindo que plantas com metabolismo C_4, embora sofram com a ação dos herbicidas, possuem maior capacidade de tolerância que as espécies com metabolismo C_3.

6. REFERÊNCIAS

ADAMSKI, J. M.; PETERS, J. A.; DANIELOSKIC, R.; BACARIN, M. A. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristicsof sweet potato. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 2056– 2062, 2011.

ALLAKHVERDIEV, S. I.; KLIMOV, V. V.; CARPENTIER, R. Evidence for the involvement of cyclic electron transport in the protection of photosystem II against photoinhibition: Influence of a new phenolic compound. **Biochemistry**, v. 36, p. 4149-4154, 1997.

ALLAKHVERDIEV, S. I. Recent progress in the studies of structure and function of photosystem II.**Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104, p. 1–8, 2011.

ARAUS, J. L.; HOGAN, K. P. Comparative leaf structure and patterns of photoinhibition of the neotropical palms. *Scheelea zonensis* and *Socratea durissima* growing in clearing and forest understory during the dry season in Panama. **American Journal of Botany**, v. 81, p. 726-738, 1994.

ARMEL, G.R.; RARDON, P. L.; McCORMICK, M.C.; FERRY, N.M. Differential response of several carotenoid biosynthesis inhibitors in mixture with atrazine. **Weed Technology**, v. 21, p. 947–953, 2007.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review *of* Plant Physiology *and* Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 601-639, 1999.

BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annual Review Plant Biology**, v. 59, p. 89–113, 2008.

BARBER, J.The structure of photosystem I. **Nature Structural Biology**, v.8, p. 77-579,2001.

BASSHAM, J.A. Mapping the carbon reduction cycle: a personal retrospective. **Photosynthesis Research**, v. 76, p. 35–52, 2003.

BEALE, S. I.; WEINSTEIN, J. D. Tetrapyrrole metabolism in photosynthetic organisms. In: DAILEY, H. A. (Ed.), **Biosynthesis of Heme and Chlorophylls**, McGraw-Hill, New York, p. 287-391, 1990.

BECERRIL, J. M.; DUKE, S.O. Protoporphyrin IX correlates with activityof photobleaching herbicides. **Plant Physiology**, v. 90, p. 1175–1181, 1989.

BÖGER, P.; BEESE, B.; MILLER, R. Long-term effects of herbicides on the photosynthetic apparatus II: Investigation on bentazone inhibition. **Weed Research**, v. 17, p. 61–67, 1977.

BOLHAR-NORDENKAMPF, 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. **Functional Ecology**, v. 3, p. 497–514, 1989.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**.Maryland: American society of Plant Physiologists, 2000.1367p.

BUKHOV, N.G.; EGOROVA, E.A.; GOVINDACHARY, S.; CARPENTIER, R. Changes in polyphasic chlorophyll a fluorescence induction curve upon inhibition of donor or acceptor side of photosystem II in isolated thylakoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1657, p. 121–130, 2004.

BUONASERA, K; LAMBREVA,M; REA, G; TOULOUPAKIS, E.; GIARDI,M. T. Technological applications of chlorophyll a fluorescencefor the assessment of environmental pollutants **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 1139–1151,2011.

CAEMMERER, S.; FARQUHAR, G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas-exchange of leaves, **Planta**, v. 153, p. 376–387, 1981.

CAKMAK, I.; DRAGANA, S.; HORST, M. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, p. 127–132, 1993.

CALATAYUD, A.; BARRENO, E. Response to ozone in two lettuce varieties on chlorophyll a fluorescence, photosynthetic pigments and lipid peroxidation. **Plant PhysiologyandBiochemistry**, v. 42, p. 549-555, 2004.

CALATAYUD, A.; ROCA, D.; MARTÍNEZ, P. F. Spatial-temporal variations in rose leaves under water stress conditions studied by chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 564–573,2006.

CATUNDA, M. G.; FREITAS, S. P.; OLIVEIRA, J. G.; SILVA, C. M. M. Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de abacaxi (*Ananas comossus*)**. Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 23, p. 115-121, 2005.

CEROVIC, Z. G.; GOULAS, Y.; GORBUNOV, M.; BRIANTAIS J. M.; CAMENEN, L.; MOYA, I. Fluorosensing of water stress in plants: diurnal changes of the mean lifetime and yield of chlorophyll fluorescence, measured simultaneously and at distance with t-LID-AR and modified PAM fluorometer in maize, sugar beet and kalanchoe. **Remote Sensingof Environment**, v. 58, p. 311–321, 1996.

CHALIFOUR, A.; SPEAR, P. A.; BOILY, M.H.; DEBLOIS, C.; GIROUX, I.; DASSILVA, N.; JUNEAU, P. Assessment of toxic effects of pesticide extracts on different green algal species by using chlorophyll a fluorescence. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 91, p. 1315-1329,2009

CHEN, S.; YIN, C.; DAI, X.; QIANG, S.; XU, X. Action of tenuazonic acid, a natural phytotoxin,on photosystem II of spinach.**Environmental and Experimental Botany**, v. 62, p. 279–289, 2008.

CHRISTEN, D.; SCHÖNMANN, S.; JERMINI, M.; STRASSER, R.J.; DÉFAGO, G. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 504-514, 2007.

CRUZ, S.; SERÔDIO, J. Relationship of rapid light curves of variable fluorescence to photoacclimation and non-photochemical quenching in a benthic diatom. **Aquatic Botany**, v. 88, p. 256–264, 2008.

DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Phytotoxicity of protoporphyrinogen oxidase inhibitors: phenomenology, mode of action, mechanisms of resistance. In: ROE, R. M.; BURTON, J. D.; KUHR, R. J. (Eds.), **Herbicide Activity**: Toxicology, Biochemistry, Molecular Biology, IOS Press, Washington, DC, p. 11–35, 1997.

DAYAN, F. E.; ZACCARO, M. L. M. Chlorophyll fluorescence as a marker for herbicide mechanisms of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102 p. 189–197, 2012.

DEMMIG-ADAMS, B. Linking the xanthophyll cycle with thermal energy dissipation. **Photosynthesis Research**, v. 76, p. 73–80, 2003.

DE RONDE, J. A.; CRESS, W. A.; KRÜGER, G. H. J.; STRASSER, R. J.; VAN STADEN, J. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing na Arabidopsis P5CR gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1211–1224, 2004.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. Bioactivity of herbicides. In: MURRAY, M. Y. (Ed.), **Comprehensive Biotechnology**, New York: Elsevier, 2º ed., v. 04, p. 23–35, 2011.

EARL, H. J.; TOLLENAAR, M. Relationship between thylakoid electrontransport and photosynthetic uptake in leaves of three maize (*Zea mays*L.) hybrids. **Photosynthesis Research**, v. 58, p. 245-257, 1998.

EBERHARD, S.; FINAZZI, G.; WOLLMAN, F. A. The dynamics of photosynthesis. **Annual Review of Genetics**, v. 42, p. 463–515, 2008.

EDWARDS, G.E.; BAKER, N. R. Can CO2 assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis? **Photosynthesis Research**, v. 37, p. 89–102, 1993.

EULLAFFROY, P.; FRANKART, C.; AZIZ, A.; COUDERCHET, M.; BLAISE, C. Energy fluxes and driving forces for photosynthesis in *Lemna minor* exposed to herbicides. **Aquatic Botany**, v. 90, p. 172–178, 2009.

FARALONI, C.; CUTINO, I.; PETRUCCELLI, R.; LEVA, A. R.; LAZZERI, S.; TORZILLO,G. Chlorophyll fluorescence technique as a rapid tool for in vitro screening of olivecultivars (*Olea europaea* L.) tolerant to drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 73, p. 49–56,2011.

FARQUHAR, G.D.; CAEMMERER, S.; BERRY, J.A. A biochemical model of photosynthetic CO_2 assimilation in leaves of C3 species. **Planta**, v. 149, p. 78-90, 1980.

FERHATOGLU, Y.; BARRET, M. Studies of clomazone mode of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, p. 7-14, 2006.

FLEXAS, J.; BRIANTAIS, J, M.; CEROVIC, Z.; MEDRANO, H.; MOYA, I. Steady-state and maximum chlorophyll fluorescence responses to water stress in grapevine leaves: a new remote sensing system. **Remote Sensing *of* Environment**, v. 73, p. 283–297, 2000.

FORCE, L.; CRITCHLEY, C.; VAN RENSEN, J.J.S. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants**. Photosynthesis Research** v.78, p. 17–33, 2003.

FORMAGGIO, E.; CINQUE, G.; BASSI, R.Functional architecture of the major light-harvesting complex from higher plants. **Journal of Molecular Biology**,v.314, p. 1157–1166, 2001.

FRANKART, C.; EULLAFFROY, P.; VERNET, G. Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 159-168, 2003.

FRIDLYAND, L.E.; SCHEIBE,R. Controlled distribution of electrons between acceptors in chloroplasts: a theoretical consideration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1413, p. 31-42, 1999.

FU, W.; LI, P.; WU, Y. Effects of different light intensities on chlorophyll fluorescence characteristics and yield in lettuce. **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 45–51, 2012.

FUKUYAMA, K. Structure and function of plant-type ferredoxins. **Photosyntesis Research**, v.81, p. 289–301, 2004.

FURBANK, R.T.; HATCH, M.D. Mechanism of C4 photosynthesis: the size and composition of the inorganic carbon conjunto in bundle sheath cells. **Plant Physiology**, v. 85, p. 958–964, 1987

GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 990, p. 87-92, 1989.

GIORIO, P.; GIORIO, G.; GUADAGNO, C. R.; CELLINI, F.; STIGLIANI, L. A.; D'AMBROSIO, C. Carotenoid content, leaf gas-exchange, and non-photochemical

quenching in transgenic tomato overexpressing the carotene hydroxylase 2 gene (CrtR-b2). **Environmental and Experimental Botany**, v. 75, p. 1-8, 2012.

GOLTSEV, V.; YORDANOV, I., Mathematical model of prompt and delayed chlorophyllfluorescence induction kinetics. **Photosynthetica**, v. 33, p. 571–586, 1997.

GONÇALVES, J. F. C.; SANTOS JR., U. M. Utilization of the chlorophyll a fluorescence technique as a tool for selecting tolerant species to environments of high irradiance. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 17, p. 307-313, 2005.

GONÇALVES, J. F. C.; SILVA, C. E.; GUIMARÃES, D. G.; BERNARDES, R. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila a de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 89 – 98, 2010.

GORBE, E.; CALATAYUD, A. Applications of chlorophyll fluorescence imaging technique in horticultural research: A review. **Scientia Horticulturae**, v. 138, p. 24–35, 2012.

GOSS, R.; JAKOB, T. Regulation and function of xanthophylls cycle-dependent photoprotection in algae. **Photosynthesis Research**, v. 106, p. 103–122, 2010.

GOVINDJEE; KERN, J. F.; MESSINGER, J.; WHITMARSH, J. **Photosystem II**. eLS. 2010. URL: www.els.net

GROUNEVA, I.; JAKOB, T.; WILHELM, C.; GOSS, R. The regulation of xanthophyll cycle activity and of non-photochemical fluorescence quenching by two alternative electron flows in the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Cyclotella meneghiniana*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1787, p. 929-938, 2009.

GUO, Y.; TAN, J. Modeling and simulation of the initial phases of chlorophyll fluorescence fromPhotosystem II. **BioSystems**, v. 103, p. 152–157, 2011.

GUSKOV, A.; KERN, J.; GABDULKHAKOV, A.; BROSER, M.; ZOUNI, A.; SAENGER, W. Cyanobacterial photosystem II at 2.9-angstrom resolutionand the role of quinones, lipids, channels and chloride. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, p. 334–342, 2009.

HALDIMANN, P.; STRASSER, R. J. Effects of anaerobiosis as probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence rise kinetic in pea (*Pisum sativum* L.). **Photosynthesis Research**, v. 62, p. 67–83, 1999.

HATTERSLEY, P.W. Characterization of C_4 type leaf anatomy in grasses (Poaceae). Mesophyll: Bundle sheath area ratios. **Annals of Botany**, v. 53, p. 163–179, 1984.

HAUPT-HERTING, S.; FOCK, H.P. Oxygen exchange in relation to carbon assimilation in water-stressed leaves during photosynthesis. **Annals of Botany**, v. 89, p. 851–859, 2002.

HAVAUX, M. Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. **Plant Cell and Environment**, v. 16, p. 461-467, 1993.

HENLEY, W. J. Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. **Journal of Phycology**, v. 29, p. 729–739, 1993.

HERBICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE [HRAC]. **Classification of Herbicides According to Mode of Action**. Disponível em: www.plantprotection.org/hrac/. Acessado em: 15/06/2012.

HESS, F. D. Light-dependent herbicides: an overview.**Weed Science**, v. 48, p. 160–170, 2000.

HOLT, N. E.; FLEMING, G. R.; NIYOGI, K. K. Toward an understanding of the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants. **Biochemistry**, v. 43, p. 8281–8289, 2004.

HUGIE, J. A.; BOLLERO, G. A.; TRANEL, P.J.; RIECHERS, D. E. Defining therate requirements for synergism between mesotrione and atrazine in redrootpigweed (*Amaranthus retroflexus*). **Weed Science**, v. 56, p.265–270, 2008.

IHNKEN, S.; EGGERT, A.; BEARDALL, J. Exposure times in rapid light curves affect photosynthetic parameters in algae. **Aquatic Botany**, v. 93, p. 185–194, 2010.

JACOBS, J. M.; JACOBS, N. J. Porphyrin accumulation and export byisolated barley (*Hordeum vulgare*) plastids. **Plant Physiology**, v. 101, p. 1181–1187, 1993.

JOLY, D.; CARPENTIER, R. Sigmoidal reduction kinetics of the photosystem II acceptor side in intact photosynthetic materials during fluorescence induction. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, p. 167–173, 2009.

JUNEAU, P.; LAWRENCE, J.E.; SUTTLE, C.A.; HARRISON, P.J. Effects of viral infection on photosynthetic processes in the bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo*. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 3, p. 9-17, 2003.

JUNEAU, P.; GREEN, B. R.; HARRISON, P. J. Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. **Photosynthetica**, v. 43, p. 75-83, 2005.

KAÑA, R.; SPUNDOV, M.; ÍLIK, P.; LAZÁR, D; KLEM, K; TOMEK, P.; NAUS, J.; PRASIL, O. Effect of herbicide clomazone on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. **Pesticide Biochemistry & Physiology**, v. 78, p. 161-170, 2004.

KALAJI, H. M.; GOVINDJEE; BOSAC, K.; KOSCIELNIAK, J.; ZUK-GOŁASZEWSKA, K.Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO_2 assimilation of twoSyrian barley landraces. **Environmental and Experimental Botany**, v. 73, p. 64–72, 2011.

KARPLUS, P.A.; DANIELS, M.J.; HERRIOT, J.R. Atomic structure of ferredoxina-NADP reductase: Prototype for a structurally novel flavoenzyme family. **Science**, v. 251,p. 60-66, 1991.

KATONA, E.; NEIMANIS, S.; SCHÖNKNECHT, G.; HEBER, U. Photosystem I - dependent cyclic electron transport is important in controlling photosystem II activity in leaves under conditions of water stress. **Photosynthesis Research**, v. 34, p. 449–464, 1992.

KAUTSKY, H.; HIRSCH, A.Neue versuche zur kohlensaureassimilation. **Naturwissenschaften**, v.19, p. 964–1964, 1931.

KERN, J.; GUSKOV,A. Lipids in photosystem II: Multifunctional cofactors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104, p. 19–34, 2011.

KIM, J. S.; JUNG, S.; HWANG, I. T.; CHO, K. Y. Characteristics of chlorophyll a fluorescence induction in cucumber cotyledons treated with diuron, norflurazon, and sulcotrione. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 65, p. 73-81, 1999.

KRAUSE, G. H.; JAHNS, P. Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science. In: GREEN, B. R.; PARSON, W. W. (Eds.), **Light - Harvesting Antennas in Photosynthesis**, Dordecht, Kluwer Academic Publishers, Kluwer, p. 373–399, 2003.

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

KRIEGER-LISZKAY, A.; FUFEZAN, C.; TREBST, A. Singlet oxygen production in photosystemII and related protection mechanism.**Photosynthesis Research**, v. 98, p. 551–564, 2008.

KÜLHEIM, C.; AGREN, J.; JANSSON, S. Rapid regulation of light harvesting and plant fitnessin the field.**Science**, v. 297, p. 91–93, 2002.

LAIBLE, P. D.; ZIPFEL, W.; OWENS, T. G. Excited state dynamics in chlorophyll-basedantennae: the role of transfer equilibrium. **Biophysical Journal**, v. 66, p. 844-860, 1994.

LAVAUD, J. Fast regulation of photosynthesis in diatoms:mechanisms, evolution and ecophysiology. **Functional Plant Science & Biotechnology**, v. 1, p. 267–287, 2007.

LAZÁR, D.; ILÍK, P. High-temperature induced chlorophyll fluorescence changes in barley leaves: comparison of the critical temperatures determined from fluorescence induction and from fluorescence temperature curve. **Plant Science**, v. 124, p. 159–164, 1997.

LEEGOOD, R.C. C4 photosynthesis: principles of CO_2 concentration and prospects for introduction into C3 plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 581–590, 2002.

LOLL, B.; KERN, J.; SAENGER, W.; ZOUNI, A.; BIESIADKA, J. Towardscomplete cofactor arrangement in the 3.0 angstrom resolutionstructure of photosystem II. **Nature**, v. 438, p.1040–1044, 2005.

LONG, S. P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWSKI, P. G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p.633-662, 1994.

MACEDO, R. S.; LOMBARDI, A. T.; OMACHI, C. Y.; RORIG, L.R. Effects of the herbicide bentazon on growth and photosystem II maximum quantum yield of the marine diatom *Skeletonema costatum*. **Toxicology In Vitro**, v. 22, p. 716–722, 2008.

MARTINAZZO, E. G.; PERBONI, A. T.; FARIAS, M. E.; BIANCHI, V. J.; BACARIN, M. A. Photosynthetic activity in the rootstock of hybrid peach trees submitted to water restriction and flooding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 3, p. 231-236, 2011.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MCCURDY, J.D.; MCELROY, J.S.; KOPSELL, D.A.; SAMS, C.E.; SOROCHAN, J.C. Effects of mesotrione on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) carotenoid concentrations under varying environmental conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9133–9139, 2008.

MEHLER, A.H. Studies on the reactions of illuminated chloroplasts II - Stimulation on inhibition of the reaction with molecularoxygen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 34, p. 339-351, 1951.

MEHTA, P.; JAJOO, A.; MATHUR, S.; BHARTI, S. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on PS II in wheat leaves.**Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 16–20, 2010.

MEHTA, P.; KRASLAVSKY,V.; BHARTI, S.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; JAJOO, A. Analysis of salt stress induced changes in Photosystem II heterogeneity by prompt fluorescence and delayed fluorescence in wheat (*Triticum aestivum*) leaves. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.104, p.308–313, 2011.

MELIS, A. Functional properties of FSIIb in spinach chloroplasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 808, p. 334–342, 1985.

MELIS, A. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: Whatmodulates the rate of photodamage in vivo? **Trends in Plant Science**, v.4, p. 130–135, 1999.

MINAGAWA, J. Fluorescence quenching analysis. In:STERN, D.; WITMAN, G. (Ed). **The Chlamydomonas Sourcebook**, 2° ed., v. 3.2008. 2000p

MIYAKE, C.; HORIGUCHI, S.; MAKINO, A.; SHINZAKI, Y.; YAMAMOTO, H.; TOMIZAWA, K. I. Effects of light intensity on cyclic electron flow around FSI and itsrelationship to non-photochemical quenching of Chl fluorescence intobacco leaves. **Plant Cell Physiology**, v. 46, p. 1819–1830, 2005.

MIYAKE, C., SHINZAKI, Y., MIYATA, M. AND TOMIZAWA, K. Enhancement ofcyclic electron flow around FSI at high light and its contribution to the inductionof non-photochemical quenching (NPQ) of Chl fluorescence in intactleaves of tobacco plants. **Plant Cell Physiology**, v. 45, p. 1426–1433, 2004.

MOZZO, M.; DALL'OSTO, L.; HIENERWADEL, R.; BASSI, R.; CROCE, R. Photoprotection in the antenna complexes of photosystem II.**The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 6184–6192, 2008.

MULLER, R.; SCHREIBER, U.; ESCHER, B. I.; QUAYLE, P.; NASHA, S. M. B.; MUELLER, J. F. Rapid exposure assessment of FSII herbicides in surface water using a novel chlorophyll a fluorescence imaging assay. **Science of the total environment**, v. 401, p. 51-59, 2008.

MÜLLER, P.; LI, X. P.; NIYOGI, K.K. Non-photochemical quenching. Aresponse to excess light energy. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1558–1566, 2001.

MUNEKAGE, Y.; SHINAKAI, T. Cyclic electron transport though photosystem I. **Plant Biotechnology**, v. 22, p. 361–69, 2005.

MUSTÁRDY L.; GARAB, G. Granum revisited. A three-dimensional model-where thingsfall into place. **Trends in Plant Science**, v. 8, p.117-122, 2003

NIYOGI, K.K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches.**Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 333–359,1999.

NIYOGI, K.K. Safety valves for photosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 455–460, 2000.

ÖGREEN, E. Photoinhibition of photosynthesis in willow leaves under field conditions. **Planta**, v. 175, p. 229-236, 1988.

OKAMURA, M.Y.; PADDOCK, M.L.; GRAIGE, M.S.; FEHER, G. Proton and electron transfer in bacterial reaction centers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1458, p. 148-163, 2000.

OUKARROUM, A.; MADIDI, S. E.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering.**Environmental and Experimental Botany,** v. 60, p. 438–446, 2007.

PAPAGEORGIOU, G.; GOVINDJEE. Light induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll a in vivo. I. Anacystis nidulans, **Biophysical Journal**, v. 8, p. 299–1315, 1968.

PAPAGEORGIOU, G.; GOVINDJEE (Eds.).**Chlorophyll a Fluorescence: A Signatureof Photosynthesis**, Advances in Photosynthesis and Respiration, Dordrecht: Springer – Verlag, v. 19. 2004, 818p

PAPAGEORGIOU, G.; GOVINDJEE. Photosystem II fluorescence: Slow changes – Scaling from the past q. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104, p. 258–270, 2011.

PEI, Y.; BIE, Z. l. Effects of different irrigation minima on the growth and physiological characteristics of lettuce under plastic greenhouse. **Transactionsof the Chinese Societyof Agricultural Engineering**, v. 23, p. 176-180, 2007.

PERBONI, A. T.; CASSOL, D.; SILVA, F. S. P.; SILVA, D. M.; BACARIN, M. A. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of flooding in canola hybrids. **Biologia**, v. 67, p. 338-346, 2012.

POWLES, S.B.; YU, Q. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, p. 317–47, 2010.

RALPH, P. J.; GADEMANN, R. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. **Aquatic Botany**, v. 82, p. 222–237, 2005.

RALPH, P. J.; POLK, S.; MOORE, K. A.; ORTH, R. J.; SMITH, W. A. Operation of the xanthophyll cycle in the seagrass *Zostera marina* in response to variable light. **Journalof Experimental Marine Biology andEcology**, v. 271, p. 189–207, 2002.

RENGER, G.; ECKERT, H. J.; BERGMANN, A.; BERNARDING, J.; LIU, B.; NAPIWOTZKI, A.; REIFARTH, F.; EICHLER, H. J. Fluorescence and spectroscopic studies on exciton trapping and electron transfer in photosystem II of higher plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 22, p. 167–181, 1995.

ROELOFS, T. A.; LEE, C. H.; HOLZWARTH, A. R. Global target analysis of picosecond chlorophyll fluorescence kinetic from pea chloroplasts. **Biophysical Journal**, v. 61, p. 1147–1163, 1992.

ROHÁČEK, K Method for resolution and quantification of componentsof the non-photochemical quenching (qN). **Photosynthesis Research**, v. 105, p. 101–113, 2010.

ROHÁČEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. **Photosynthetica**, v. 40, p. 13-29, 2002.

ROMAN, E.S. et al. **Como funcionam os herbicidas**: da biologia à aplicação. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2007. 160p.

SABATE, S.; GRACIA, C.A.; SANCHEZ, A. Likely effects of climate change on growth of *Quercus ilex*, *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster*, *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica* forests in the Mediterranean region. **Forest Ecology and Management**,v. 162, p. 23–37, 2002.

SAGE, R.F. The evolution of C4 photosynthesis. **The New Phytologist**, v. 161, p. 341–370, 2004.

SANDMANN, G. Evolution of carotenoid desaturation: The complication of a simple pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 483, p. 169–174, 2009.

SCHANSKER, G.; TÓTH, S. Z.; STRASSER, R. J. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP.**Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1706, p. 250 – 261, 2005.

SCHREIBER, U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: Papageorgiou, C., Govindjee, (Eds.), **Chlorophyll Fluorescence**: A Signature of Photosynthesis. Dordrecht: Springer - Verlag, p. 279–319, 2004.

SCHREIBER, U.; BILGER, W.; HORMANN, H.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool. Basics and some aspects of practical relevance. In: Raghavendra, A. S. (Ed.) **Photosynthesis:A Comprehensive Treatise**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 320–336, 1998.

SCHREIBER, U.; KLUGHAMMER, C. Non-photochemical fluorescence quenching and quantum yields in PS I and PS II: Analysis of heat-induced limitations using Maxi-Imaging-PAM and Dual-PAM-100. **PAM Application Notes**, v. 1, p. 15–18, 2008.

SCHREIBER, U.; KIAHL, M; KLIMANT, I.; REISING, H. Measurement of chlorophyll fluorescence within leaves using a modified PAM fluorometer with a fiber-optic microprobe. **Photosynthesis Research**, v. 47, n. 1, p. 103-109, 1996.

SCHULTZ, H.R. Extension of a Farquhar model for limitations of leaf photosynthesis induced by light environment, phenology and leaf age in grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. White Riesling and Zinfandel). **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 673–687, 2003.

SENSEMAN, S. A. (Ed.). **Herbicide handbook**. 9 ed. Lawrence: Weed Science Society of America, 2007. 458p.

SERÔDIO, J.; LAVAUD, J. A model for describing the light response of the nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. **Photosynthesis Research,** v. 108, p. 61-76, 2011.

SHIKANAI, T. Cyclic Electron Transport Around Photosystem I: Genetic Approaches. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 199–217, 2007.

SIEFERMANN-HARMS, D. Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 811, p. 325-355, 1985.

SILVA, J. M.; ARRABAÇA, M.C. Photosynthesis in the water-stressed C_4 grass *Setaria sphacelata* is mainly limited by stomata with both rapidly and slowly imposed water déficits. **Physiology Plantarum**, v. 121, p. 409–420, 2004.

SILVA,A. C.; LEONEL, S.; SOUZA, A. P.; DOMINGOS, J. R.; DUCATTI, C. Trocas gasosas e ciclo fotossintético da figueira 'Roxo de Valinhos'. **Ciência Rural**, v.40, p.1270-1276, 2010.

SMIT, M. F.; VAN HEERDEN, P. D. R.; PIENAAR, J. J.; WEISSflOG, L.; STRASSER, R. J.; KRÜGER, G. H. J. Effect of trifluoroacetate, a persistent degradation product of fluorinated hydrocarbons, on *Phaseolus vulgaris* and *Zea mays*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 623–634, 2009.

SOUSA, C. P.; BACARIN, M. A.; PINTO, J. J. O.Crescimento de espécies bioindicadoras do residual do herbicida (imazethapyr+imazapic), semeadas em rotação com arroz Clearfield®. **Planta Daninha**, v. 30, p. 105-111, 2012.

STIRBET, A.; GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction)and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104, p. 236–257,2011.

STRASSER, R. J. The grouping model of plant photosynthesis. In: AKOYUNOGLOU,G. (Ed) **Chloroplast Development**. North Holland: Elsevier, p. 513-524,1978.

STRASSER, R.J.; EGGENBERG, P.; PFITER, K.; GOVINDJEE. An equilibrium model for electron transfer in photosystem II acceptor complex: An application to *Chlamydomonas reinhardtii* cells of D1 mutants and those treated with Formate. **Archives Des Science**, v. 45, p. 207–224, 1992.

STRASSER, R.J.; GOVINDJEE. The F_0 and the O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae. In: ARGYROUDI-AKOYUNOGLOU, J.H. (Ed.),**Regulation of Chloroplast Biogenesis**.New York: Plenum Press, p. 423-426,1992.

STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; GOVINDJEE.Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v. 61, p. 32-42, 1995.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: YUNUS, M.; PATHRE, U.; MOHANTY, P. (Eds.), **Probing Photosynthesis**: **Mechanisms, Regulation and Adaptation**.London: Taylor and Francis Press, p. 445–483, 2000.

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

STRASSER, R.J.; STIRBET, A. D.Estimation of the energetic connectivity of PS IIcentres in plants using the fluorescence rise O–J–I–P; fitting of experimentaldata to three different PS II models, **Mathematics and Computers in Simulation**, v. 56, p. 451–461, 2001.

STRASSER, B.J.; STRASSER, R.J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental question: The JIP test. In: MATHIS, P. (Ed.),

Photosynthesis: **From Light to Biosphere**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, vol. V, p. 977–980, 1995.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the Chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou, C., Govindjee, (Eds.), **Chlorophyll Fluorescence**: **A Signature of Photosynthesis**. Dordrecht: Springer - Verlag,p. 321–362, 2004.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Activity and heterogeneity of FSII probed in vivo by the chlorophyll a fluorescence rise O–(K)–J–I–P.In: GARAB, G. (Ed.), **Photosynthesis: Mechanisms and Effects**, Proceedings of the XIthInternational Congress on Photosynthesis, Budapest, Hungary.Kluwer Academic Publishers, v. 05, p. 4321–4324,1998.

STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, p. 748-755, 2005.

SZABO, I.; BERGANTINO, E.; GIACOMETTI, G. M. Light and oxygenic photosynthesis: Energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxydation. **EMBO Reports**, v. 6, p. 629–634, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. São Pulo: Artmed, 2009. 819p

THACH, L. B.; SHAPCOTT, A.; SCHMIDT, S.; CRITCHLEY, C. The OJIP fast fluorescence rise characterizes *Graptophyllum* species and their stress responses. **Photosynthesis Research**, v. 94, p. 423-436, 2007.

TING, C. S.; OWENS, T. G. Limitations of the Pulse-Modulated Technique for Measuring the Fluorescence Characteristics of Algae. Plant Physiology, v. 100, p. 367-373, 1992.

TRIANTAPHYLIDE`S, C.; HAVAUX, M. Singlet oxygen in plants: Production, detoxification and signaling. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 219–228, 2009.

TÓTH, S. Z.; SCHANSKER, G.; GARAB, G; STRASSER, R. J. Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barley leaves: The role of internal alternative electron donors to photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1767, p. 295–305, 2007.

vanKOOTEN, O.; SNEL, J. F. H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v. 25, p. 147-150, 1990.

WARREN, C.R. The photosynthetic limitation posed by internal conductance to CO_2 movement is increased by nutrient supply. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2313–2321, 2004.

WETTSTEIN, D.V.; GOUGH, S.; KANNANGARA, C.G. Chlorophyll Biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1039-1057, 1995.

WILLIAMSON, A.; CONLAN, B.; HILLIER, W.; WYDRZYNSKI, T. The evolution of Photosystem II: Insights into the past and future. **Photosynthesis Research**, v.107, p. 71–86, 2011.

WILSON, K.B.; BALDOCCHI, D.D.; HANSON, P.J. Quantifyingstomatal and non-stomatal limitations to carbon assimilationresulting from leaf aging and drought in mature deciduous tree species. **Tree Physiology**, v. 20, p. 787–797, 2000.

WU, J.; NEIMANIS, S.; HEBER, U. Photorespiration is more effective than the Mehler reaction in protecting the photosynthetic apparatus against photoinhibition. **Botanica Acta**, v. 104, p. 283–281, 1991.

XIONG, J.; SUBRAMANIAM, S., GOVINDJEE.Modeling of the D1/D2 proteins and cofactors of the photosystem II reaction center: Implications forherbicide and bicarbonate binding. **Protein Science**, v. 5, p. 2054–2073, 1996.

YUSUF, M.A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N.B. Overexpression of γ-tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and

chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1428-1438, 2010.

ZHU, X.G.; GOVINDJEE; BAKER, N.R.; STURLER, E.; ORT, D.R.; LONG, S.P. Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with photosystem II. **Planta**, v. 223, p. 114–133, 2005.

ZHU, X.G.; SHAN, L.; WANG, Y.; QUICK, W.P.C_4 Rice – an ideal arena for systems biology research. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.52, p. 762–770, 2010.