

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



Dissertação

**Estudo da cadeia de transporte de elétrons fotossintético em folhas
destacadas de ervilha**

Márcio Espinosa de Farias

Pelotas, 2014

Márcio Espinosa de Farias

**Estudo da cadeia de transporte de elétrons fotossintético em folhas
destacadas de ervilha**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para receber o título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Dr. Marcos Antonio Bacarin
Co-orientadores: Dr^a. Emanuela Garbin Martinazzo
Dr. Dario Munt de Moraes

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

F224e

Farias, Márcio Espinosa de

Estudo da cadeia de transporte de elétrons fotossintético em folhas destacadas de ervilha / Márcio Espinosa de Farias. – 60f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orientador Marcos Antonio Bacarin ; co-orientador Emanuela Garbin Martinazzo, Dario Munt de Moraes.

1.Fisiologia vegetal. 2.Ervilha. 3.*Pisum sativum* L.. 4.Fluorescência da clorofila. 5.Fotossíntese. I.Bacarin, Marcos Antonio.II.Martinazzo, Emanuela Garbin. III.Moraes, Dario, Munt de. IV.Título.

CDD: 572.46

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcos Antonio Bacarin (presidente)

Prof. Dr. Luciano do Amarante

Prof. Ph.D. Luis Antonio de Avila

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

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar sempre presente me dando forças durante toda caminhada da vida e permitir que eu conquistasse mais essa etapa.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Bacarin pela disponibilidade de orientação, pela sua paciência ao passar o seu conhecimento durante todo esse período e também pela convivência e amizade nesse tempo que passei.

Aos meus pais Mario e Fernanda, por me darem toda ajuda e suporte para chegar até o fim dessa etapa, mas também pela educação para me tornar a pessoa que sou hoje.

Aos meus irmãos, Beatriz e Luis Fernando, pela companhia, amizade e apoio que sempre me deram nos momentos difíceis, que souberam me escutar e aconselhar.

Aos meus colegas de jornada, Anelise, Camila, Marília, Emanuela, Anderson, Cristina e o Davi, assim como os estagiários Douglas, Monica e Ana, por terem me acompanhado por toda essa etapa do mestrado, pela ajuda nos meus experimentos e nas trocas de conhecimento, mas a cima de tudo, pela amizade que se criou.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela disponibilidade de bolsa de estudo concedida no decorrer do mestrado.

A todos do Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, que de alguma maneira contribuíram para que eu chegasse ao fim dessa etapa, assim como nos momentos de descontração em grupo, mas principalmente pelas amizades conquistadas nesse período.

Por fim, todas as pessoas e amigos que de alguma maneira contribuíram, com algum gesto de conforto, para que esse projeto tenha sido concluído.

RESUMO

Farias, Marcio Espinosa. **Estudo da cadeia de transporte de elétrons fotossintético em folhas destacadas de ervilha**. Universidade Federal de Pelotas. 2014. 60f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A fotossíntese exerce um papel fundamental para os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas. Ela ocorre nos cloroplastos das células do mesófilo foliar e consiste de duas etapas, uma fase fotoquímica, que converte energia luminosa em energia química e outra fase bioquímica, que utiliza a energia da primeira etapa para a fixação do CO₂. O trabalho teve como objetivo avaliar, em folhas destacadas de ervilha (*Pisum sativum* L.), o comportamento da cadeia de transporte de elétrons na presença de inibidores de pontos específicos. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação. Duas a quatro semanas após semeadura, quando as folhas apresentavam-se completamente expandidas, elas foram destacadas e os pecíolos foram imersos em soluções contendo 0, 25, 50, 100, 250 e 500 µM de DCMU, atrazina, DBMIB e metil viologênio. Para DCMU, atrazina e metil viologênio as folhas permaneceram por 2h em contato com as soluções, para o DBMIB foi de 5h. As medidas da fluorescência transiente da clorofila, da decaída de fluorescência e da reflexão modulada à 820nm, foram feitas utilizando fluorômetro M-PEA. As folhas foram adaptadas ao escuro por 30 minutos, antes da emissão de um pulso saturante, e as intensidades de fluorescência foram medidas por 60 segundos. As folhas de ervilha tratadas com a concentração de 500 µM de DCMU e atrazina demonstraram ser sensíveis a essa dose dos inibidores, ao analisar os resultados da fluorescência transiente, decaída de fluorescência e da reflexão modulada a 820 nm. As folhas tratadas com 500 µM de metil viologênio apresentaram diferenças nos parâmetros relacionados com o mecanismo de ação do inibidor. A mesma concentração utilizada para DBMIB, não teve diferença em muitos resultados em relação ao controle, apenas naqueles envolvidos com a redução dos aceptores finais do fotossistema I. Dessa maneira, uma análise detalhada da fluorescência transiente, da decaída da fluorescência e da reflexão modulada a 820 nm, permite coletar e correlacionar uma série de informações sobre toda a cadeia de transporte de elétrons.

Palavras chave: *Pisum sativum* L., fluorescência da clorofila, fotossíntese.

ABSTRACT

Farias, Marcio Espinosa. Study of the photosynthetic electron transport chain in detached leaves of pea. Universidade Federal de Pelotas. 2014. 60f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Photosynthesis plays a fundamental role in the processes of growth and development of plants. It occurs in the chloroplasts of leaf mesophyll cells and consists of two steps, a photochemical phase that converts light energy into chemical energy, and other biochemical phase, which uses the energy of the first step for fixing CO₂. The study aimed to evaluate, in detached leaves of pea (*Pisum sativum* L.), the behavior of the electron transport chain in the presence of inhibitors of specific points. The plants were grown in a greenhouse. Two to four weeks after sowing, when the leaves had become fully expanded, they were detached and the petioles were immersed in solutions containing 0, 25, 50, 100, 250, and 500 µM of DCMU, atrazine, DBMIB and methyl viologen. To DCMU, atrazine and methyl viologen the leaves remained for 2 h in contact with the solutions, to DBMIB was 5h. Measurements of transient fluorescence of chlorophyll, delayed fluorescence and modulated reflection at 820nm were made using M-PEA fluorometer. The leaves were dark adapted for 30 minutes, before a saturating pulse emission, and the fluorescence intensities were measured for 60 seconds. Pea leaves treated with 500 µM concentration of DCMU and atrazine showed to be sensitive to this dose of inhibitors, in analyzing the results of transient fluorescence, delayed fluorescence and modulated reflection at 820 nm. The leaves treated with 500 µM of methyl viologen showed differences in parameters related to the mechanism of action of the inhibitor. The same concentration used to DBMIB, had no significant difference in many results compared to the control, only in those involved in the reduction of end acceptors of photosystem I. Therefore, a detailed analysis of the transient fluorescence, delayed fluorescence and modulated reflection at 820nm, allows us to collect and correlate a series of information about the whole electron transport chain.

Keywords: *Pisum sativum* L., chlorophyll fluorescence; photosynthesis.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 2.1 Material Vegetal e Tratamentos..... | 17 |
| 2.2 Medições simultâneas da cinética da fluorescência transiente, decaída da fluorescência (DF) e a reflexão modulada a 820 nm (MR_{820})..... | 20 |
| 3. RESULTADOS..... | 22 |
| 3.1. Análise da cinética da fluorescência transiente OJIP e Teste-JIP..... | 22 |
| 3.2. Análise da cinética de reflexão modulada a 820 nm (MR/MR_0)..... | 33 |
| 3.3. Análise da cinética da decaída de fluorescência (DF)..... | 37 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 47 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 53 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 54 |

1. INTRODUÇÃO

Embora o crescimento das plantas seja controlado por uma multiplicidade de processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, a fotossíntese é um fenômeno fundamental, pois contribui significativamente para o crescimento e o desenvolvimento da planta. É um processo essencial para atividade de organismos fotossintéticos, como plantas, algas e muitas espécies de bactérias. Em plantas superiores a fotossíntese ocorre, principalmente, nas folhas, mais especificamente em organelas especializadas chamadas cloroplasto. Eles são formados por uma dupla membrana, sendo sua parte aquosa chamada de estroma, onde se encontra os tilacóides, que são um conjunto de membranas organizadas em grana (empilhados). Existe ainda no interior da membrana dos tilacóides, uma fase aquosa, denominada lúmen (TAIZ e ZEIGER 2013)

O processo fotossintético consiste em duas etapas interdependentes e concomitantes, uma fase fotoquímica, que ocorre nos tilacóides, onde há conversão da energia luminosa em energia química (ATP e NADPH) e o oxigênio é liberado, e outra fase bioquímica, que ocorre no estroma, onde o dióxido de carbono (CO₂) é fixado em carboidratos pela utilização dos produtos da etapa fotoquímica (ATP e NADPH) (LAWLOR, 2009; DULAI et al., 2011).

Clorofila e carotenoides são pigmentos fotossintéticos encontrado nos cloroplastos. A clorofila é um macrociclo tetrapirrol, com um íon magnésio (Mg), uma cadeia fitol e um quinto anel característico. Ela exerce um papel essencial na fotossíntese por absorver a energia luminosa e transferir essa energia ou elétrons para outras moléculas. Em plantas superiores há dois tipos de clorofila, a clorofila *a* e *b*. O grupamento metil do C7 da clorofila *a* é substituído por um aldeído na clorofila *b* (TANAKA et al., 2007).

A cadeia de transporte de elétron (CTE) fotossintético é formada por complexos proteicos, que estão embebidos na membrana do tilacóide. Os principais componentes são os dois fotossistema (FSII e FSI), conectados em série através do complexo citocromo *b₆f* (cyt_{*b₆f*}) e plastocianina. Sendo que a enzima ATP sintase, que está acoplada a esse sistema, é relacionada com a síntese de ATP a partir do gradiente eletroquímico formado pelo fluxo de elétrons na CTE. A interligação entre os complexos envolvidos no fluxo de elétrons é mediada por moléculas carreadoras móveis, a plastoquinona que se localiza na região hidrofóbica da membrana do

tilacoide, e a plastocianina, uma proteína cúprica, que se encontra no lúmem do tilacoide.

As reações fotossintéticas iniciam com a absorção simultânea de energia luminosa pelos complexos de captura de luz (LHC) e suas subunidades antena, constituídas pelas clorofilas, carotenoides e proteínas, que estão associados ao FSI e FSII. Essa energia capturada é transferida via mecanismos de excitação para os centros de reação (RC) (RENGER, 2009), a qual causa a excitação de um par de clorofilas especial, que desencadeia o transporte de elétrons através da membrana do tilacoide por diversos cofatores redox.

No FSII a separação de carga ocorre na proteína D1, levando a formação de um par iônico [P_{680}^+ Phe $^-$], onde P_{680} (dímero de clorofila *a*) e Phe (feofitina) são denominados como doadores e aceptores primários de elétrons, respectivamente (BANIULIS, et al., 2008). P_{680}^+ recebe um elétron, via um resíduo de tirosina (Y_z), que foi extraído pela oxidação de uma molécula de água no complexo de evolução de oxigênio (CEO), liberando H^+ e O_2 no lúmem do tilacoide. No lado acceptor de elétrons do FSII, Phe $^-$ doa elétrons para Q_A (uma quinona com capacidade de receber apenas um elétron) e esta para Q_B . Uma vez que recebe dois elétrons, Q_B^{2-} é liberado do FSII para um *pool* de plastoquinona, que toma dois prótons do lado do estroma, se reduzindo a plastoquinol (PQH_2) (ROCHAIX, 2011). Assim o PQH_2 é reoxidada no complexo citocromo b_6f (Cyt_{b_6f}), liberando mais prótons no lado do lúmem e transferindo parte dos elétrons para plastocianina e os outros entram no ciclo Q (JOLIOT et al., 2006), reduzindo novamente PQ e promovendo assim mais translocação de prótons para o lúmem.

No FSI, a primeira separação de carga leva a formação de um par de radical [P_{700}^+ e A_0^-], onde P_{700} (par especial de clorofila *a*) é o primeiro doador de elétrons e A_0 (uma molécula clorofila *a*) é o primeiro acceptor de elétrons (STIRBET et al., 2012). P_{700}^+ é reduzida pela plastocianina, que transfere elétrons do complexo cyt_{b_6f} para o FSI. No lado acceptor do FSI, A_0^- doa elétrons para A_1 (uma filoquinona), que em seguida transfere para um grupo de proteínas ferro-enxofre (Fe-S) e finalmente para uma molécula solúvel em água situada no lado do estroma, a ferredoxina (Fd). Esta, através da flavoproteína solúvel ferredoxina-NADP $^+$ redutase (FNR), reduz NADP $^+$ (nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato oxidada) a NADPH (forma reduzida), que de acordo com Fan et al. (2009), completa o transporte acíclico de elétrons da fotossíntese.

Além do transporte de elétrons acíclico, o sistema pode também realizar transporte de elétrons cíclico e pseudocíclico. No primeiro, a ferredoxina reduzida transfere seus elétrons de volta para o *pool* de plastoquinona ou diretamente para o $\text{cyt}_{b6/f}$ (JOLIOT et al., 2006), originando uma circulação de elétrons ao redor do FSI, sendo assim independente do FSII. Esse processo causa um bombeamento de prótons para lúmem, gerando um gradiente eletroquímico, o qual é útil para síntese extra de ATP (FAN et al., 2009). Já no segundo, em condições de super-redução da cadeia de transporte de elétrons, a ferredoxina doa elétrons para o oxigênio molecular, não reduzindo NADP^+ (ROCHAIX, 2011). Esse processo é chamado reação de Mehler ou ciclo água-água.

O bombeamento de prótons para o lúmem do tilacoide, proveniente da oxidação da água no CEO, do ciclo redox PQ/PQH₂ e do transporte de elétrons cíclico, cria uma força motriz de prótons (*pmf*), que é constituída de um potencial elétrico ($\Delta\Psi$) e um gradiente de prótons (ΔpH) transmembrana. Dessa maneira, a energia que é armazenada no gradiente de potencial eletroquímico é utilizada para produzir ATP (adenosina trifosfato), pela enzima F-ATP sintase, a partir de uma adenosina difosfato e um fosfato inorgânico (NELSON, 2011). Assim ambos os produtos resultantes das reações da cadeia de transporte de elétrons, ATP e NADPH, servem para síntese de carboidratos, através da fixação de CO_2 atmosférico no ciclo de Calvin-Benson.

As moléculas de clorofila da antena dos fotossistemas ao capturarem a energia luminosa passam de um estado fundamental para um estado excitado. Essa energia de excitação pode ser utilizada pela via fotoquímica, que ocorre nos centros de reação pela cadeia de transporte de elétrons. Porém, nem toda energia absorvida segue esse caminho, parte dela pode ser dissipada na forma de calor ou re-emitida como fluorescência (GOVINDJEE, 2004; STIRBET et al., 2011). Estes três processos não ocorrem isoladamente, mas sim em constante competição um com os outros. Como consequência, o rendimento da fluorescência é influenciado pela proporção da energia luminosa usada pelos outros dois processos. Dessa maneira, análise da fluorescência pode fornecer informações sobre a quantidade de energia luminosa usada pela fotoquímica e dissipada na forma de calor (MAXWELL et al., 2000; PAPAGEORGIOU et al., 2011).

Existem várias metodologias para o estudo da fotossíntese, sendo que a análise da emissão da fluorescência da clorofila permite estudar detalhes da

fotosíntese sem destruir nenhum tecido fotossintético (HOLUB et al., 2007). Em pesquisas de fotossíntese a fluorescência da clorofila *a* é um dos métodos utilizados, tanto em estudos básicos como ecofisiológicos. Este é um método indireto, rápido, não destrutivo, de fácil reprodutibilidade, praticidade para processar os dados e reportar os resultados, também permite a obtenção de informações qualitativas e quantitativas sobre as condições fisiológicas do aparato fotossintético (BAKER et al., 2008).

As técnicas utilizadas para medir a cinética de indução da fluorescência evoluíram nos últimos anos, devido ao desenvolvimento de tecnologias fotométricas e detecção eletrônica, bem como análises do sistema operacionalizadas por computador. Desse modo, de acordo com Rottgers (2007), os fluorômetros que são atualmente usados para estudos da cinética da fluorescência, são baseados em diferentes abordagens para medir a fluorescência da clorofila *a*, diferindo nas características de detecção dos sinais de fluorescência.

O espectro de emissão da fluorescência da clorofila *a*, em temperatura ambiente, é caracterizada por um pico principal ao redor do comprimento de onda de 685 nm e um pico menor entre 700 – 750 nm, atribuída pela absorção de luz da antena do FSII e FSI, respectivamente (STIRBET et al., 2012). Segundo Byrdin et al. (2000), a fluorescência emitida pelo FSI é praticamente constante, contribuindo aproximadamente de 5-30% para o sinal de fluorescência total em plantas C3 (GILMORE et al. 2000; RAPPAPORT et al. 2007). Devido a isso, o sinal de fluorescência é relacionado principalmente pela emissão da antena do FSII, sendo muito útil para analisar diferentes aspectos relacionados com a fotossíntese (ZHU et al., 2005), em particular a estrutura e a função do FSII. Porém, atualmente existem muitos estudos para analisar a fluorescência emitida pelo FSI.

A fluorescência emitida pelo FSII varia com o tempo quando as amostras fotossintéticas adaptadas ao escuro, após são iluminadas. Isso causa mudanças características na intensidade de fluorescência, de uma fase rápida (até 1 segundo) para uma fase lenta (até alguns minutos). Isso é chamado de indução de fluorescência, fluorescência transiente ou simplesmente efeito Kautzky (KAUTSKY e HIRSCH, 1931). A fase rápida da fluorescência é conhecida como OJIP, onde O é a origem (a 20 ou 50 μ s), J (a 2 ms) e I (30 ms), são passos intermediários, e P é o pico máximo (a cerca de 300 ms) (STRASSER et al., 2000; TSIMILLI-MICHAEL et al., 2008). Já a fase lenta é chamada de PSMT, onde S representa um estado semi-

estável, M para um máximo e T para um nível de estado estável terminal (PAPAGEORGIU et al., 1968).

Na fase rápida da fluorescência transiente (OJIP) duas intensidades tem uma grande importância e estão relacionados ao estado redox do lado acceptor do FSII, que são a fluorescência mínima (F_0) e a máxima (F_M). O rápido aumento de F_0 para F_M é a reflexão da progressiva redução de Q_A (STIRBET et al., 2012). Segundo Minagawa (2008), no passo F_0 é dito que o lado acceptor do FSII está aberto (Q_A oxidado), já quando atinge F_M , é dito que o mesmo está fechado (Q_A completamente reduzido), devido à redução de toda a cadeia de transporte de elétrons linear, resultado de um acúmulo de elétrons no lado acceptor do FSI. A elevação da intensidade de fluorescência entre os passos O e J, conhecida como a fase fotoquímica, é muito rápida e depende em grande parte da intensidade da luz de excitação, ao passo que partes da curva de fluorescência J-I e I-P são conhecidas como fases térmicas (sensíveis à temperatura) (MORIN, 1964).

A fase OI da fluorescência esta relacionado com a redução da primeira quinona do lado acceptor de elétrons do FSII (Q_A). A fase JI esta envolvida com a redução dos transportadores de elétrons do inter-sistema, como a quinona secundaria (Q_B), *pool* de plastoquinona (PQ), o citocromo b_6f e a plastocianina, enquanto que a fase IP reflete a redução dos receptores finais de elétrons no lado acceptor do FSI, ou seja, ferredoxina, outros intermediários e $NADP^+$ (YUSUF et al., 2010).

O estudo da cinética da fluorescência transiente da clorofila *a* pode ser avaliado através de análises multiparamétricas, chamado de Teste-JIP que foi desenvolvido por Strasser e Strasser (1995). Esses parâmetros calculados caracterizam a estrutura e a atividade fotoquímica de amostras fotossintéticas. Muitos dos parâmetros definidos pelo Teste-JIP estão relacionados com a fase térmica da fluorescência, uma vez que se correlaciona o acceptor do FSI com o passo I (TSIMILLI-MICHAEL et al., 2008). Segundo os mesmos autores, esse teste descreve as diferentes etapas e fases do transiente refletindo o estado redox do FSII concomitantemente com as eficiências e fluxos de transferência de elétrons (ET) no intersistema da cadeia entre o FSII e FSI e a redução dos aceptores finais de elétrons (RE) do lado acceptor do FSI.

Toda reação redox do transporte de elétrons entre o FSII e FSI e também as de transferências de elétrons no RC do FSII (lado doador e acceptor) são reversíveis. Com um acúmulo de elétrons na cadeia de transporte entre os fotossistemas ocorre

uma volta da transferência de elétrons e mudanças na recombinação no RC do FSII, resultando na re-excitação do RC e a repopulação, pela rápida transferência de energia, do estado excitado da clorofila do FSII. A emissão da luz a partir da repopulação excitada da clorofila é chamada de decaída da fluorescência (DF) (STRASSER et al., 2010), em comparação com a fluorescência transiente OJIP, que é emitida antes da utilização da energia de excitação na reação fotoquímica primária (GOLTSEV et al., 2009). Assim como a fluorescência transiente, a DF também é emitida por organismos fotossintéticos na região infravermelha do espectro por um curto tempo após eles serem exposto à luz.

De acordo com Grabolle et al. (2005), a similaridade entre a emissão espectral da fluorescência transiente e da DF mostra que, em ambos os casos, o fóton emitido é um resultado da desativação radioativa do estado excitado da clorofila do FSII. A emissão da fluorescência polifásica OJIP é praticamente extinguida a cerca de 5 ns após luz ser desligada e sua intensidade decai polifasicamente com uma duração característica que variam de vários picosegundos (ps) até 2 nanosegundos (ns) (MILOSLAVINA, 2006). Ao contrário, a DF tem componentes que decai diferentes intervalos de tempo que pode variar de milisegundos (ms) em até alguns minutos (STREHLER et al., 1951)

Em estudos da cinética da DF, as amostras fotossintéticas passam por uma transição de luz e escuro. Assim a fluorescência transiente é emitida quando ocorre absorção direta da luz pela clorofila do FSII, já durante essa transição, a emissão da DF é detectada (KALAJI et al., 2012; STIRBET et al., 2012). Além disso, tanto a fluorescência polifásica quanto a DF, ambas são irradiadas durante o mesmo estado de transição de excitação da clorofila (P680) do FSII. A diferença é que, para a fluorescência, o estado excitado de P680 é criado diretamente pela excitação da luz, enquanto para DF, este mesmo estado é resultado da recombinação dos produtos formados na reação da fotoquímica primária (WANG et al., 2004). A emissão de DF, igualmente como a emissão da fluorescência transiente, é principalmente a partir do FSII, pois a contribuição da emissão pelo FSI é muito pouca (JURSINIC, 1986).

Além da fluorescência transiente e da DF, que são estudadas para refletir a estrutura e funcionamento do FSII, a cinética de reflexão modulada à 820nm (MR_{820}) pode refletir a atividade do FSI (LI et al., 2012; YAN et al., 2012). A intensidade da MR_{820} indica as mudanças do estado redox do RC do FSI (P_{700}) e da plastocianina (PC) (HARBINSON et al., 1989; KLUGHAMMER et al., 1991, YAN et al., 2013). A

reação de recombinação que promove o sinal de DF depende do estado redox da quinona primária (Q_A) do RC do FSII, que é analisada pela fluorescência transiente. O estado redox de Q_A é dependente do estado redox dos carreadores da cadeia de transporte de elétrons, que por sua vez depende do estado redox do RC do FSI (P_{700}) que é avaliada pela cinética da MR_{820} . Dessa maneira, medidas simultâneas da fluorescência transiente, DF e MR_{820} , permitem a coleta e a correlação de informações complementares para todos os três domínios da cadeia de transporte de elétrons (STRASSER et al., 2010).

Muitos pesquisadores tem interesse em estudar o metabolismo da planta, desenvolvendo pesquisas envolvendo os mecanismos da cadeia de transporte fotossintético, por exemplo, como medidas da fluorescência transiente da clorofila *a*, decaída da fluorescência da clorofila e reflexão modulada a 820 nm. Para isso alguns usam compostos químicos artificiais que são capazes de aceitar ou doar elétrons em pontos específicos da cadeia de transporte de elétron, que causam alterações nas fases O-J-I-P na curva de indução assim como na cinética da fluorescência transiente. Um exemplo desses químicos é o DCMU (3-(3',4'-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia) e atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilano-s triazina), que são considerados inibidores do FSII. Os dois inibidores se ligam na proteína D1 no sítio onde se prende a quinona Q_B , bloqueando a transferência de elétrons no FSII entre as quinonas, impedindo a reoxidação de Q_A e a saída de Q_B , interrompendo o fluxo de elétrons entre os fotossistemas, ocasionando uma redução drástica no acúmulo de NADPH e conseqüentemente na síntese de carboidratos (BREITNBACH et al., 2001).

Além desses inibidores, outros também têm grande importância para esses estudos. Um deles é o DBMIB (2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-1,4-benzoquinona), que é uma quinona artificial que atua como inibidor no complexo citocromo B_6f . Essa semiquinona doa um elétron para o complexo Cyt_{b_6f} e permanece firmemente ligada, impedindo a reoxidação do *pool* de plastoquinona (PQH_2) (RICH et al., 1991). Além disso, segundo Schansker et al. (2005), alguns estudos tem demonstrado que o DBMIB pode atuar como doador de elétrons para P_{700} , quando oxidado, e outros carreadores do lado doador de elétrons do FSI.

Outro inibidor de grande importância para o estudo da cadeia de transporte de elétrons fotossintético é o metil viologênio – MV (1,1-dimetil-4,4-dicloreto de dipiridílio), herbicida conhecido como paraquat, que tem a capacidade de capturar os

elétrons na transição entre as proteínas Fe-S (FeS_A e FeS_B) do FSI, não deixando a ferredoxina receber elétrons. Em consequência disso, há um impedimento na formação de NADPH e o radical formado reage diretamente com o oxigênio produzindo as espécies reativas de oxigênio. Essas espécies reativas, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas, são responsáveis pela degradação das proteínas do FSII, levando assim à morte celular (HESS, 2000; WONG, 2000; LIN et al., 2007).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o comportamento da cadeia de transporte de elétrons na presença de inibidores de pontos específicos, em folhas destacadas de ervilha (*Pisum sativum* L.) através de medidas simultâneas das cinéticas da fluorescência transiente, decaída da fluorescência da clorofila *a* e da reflexão modulada a 820 nm.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal e Tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e no Laboratório de Metabolismo Vegetal, pertencentes ao Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, localizado no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul (RS).

Sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.) foram colocadas para germinar em vasos de polietileno, com capacidade de dois litros, contendo solo como substrato, os quais foram mantidos em casa de vegetação (Figura 1) com irrigação por microaspersão. Uma semana após a emergência, iniciou-se a aplicação de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), sendo repetida uma vez por semana.



Figura 1: Visão geral da casa de vegetação (a esquerda) onde as plantas foram cultivada (a direita).

Duas a quatro semanas após a semeadura, quando as plantas apresentaram folhas jovens e completamente expandidas, essas foram levadas para o Laboratório de Metabolismo Vegetal, onde foram destacadas com o pecíolo, com auxílio de uma tesoura, e imediatamente colocadas em recipientes de vidro com capacidade de 10 mL (Figura 2), contendo a solução controle (água destilada ou etanol 1%, que foi o solvente utilizado para diluição dos inibidores) e as soluções de inibidores. Os inibidores utilizados foram: DCMU (3-(3',4'-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia), atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilano-s triazina), metil viologênio (1,1-dimetil-4,4-dicloreto de dipiridílio) e DBMIB (2,5-dibromo-3-metil-5-isopropil-*p*-benzoquinona) (Figura 3).

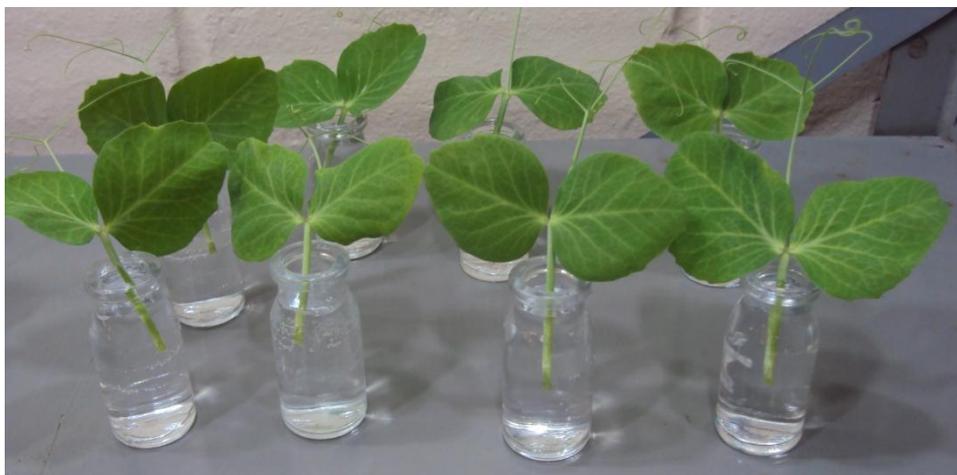


Figura 2: Folhas de ervilhas destacadas com pecíolo, embebidas em solução controle e com os inibidores.

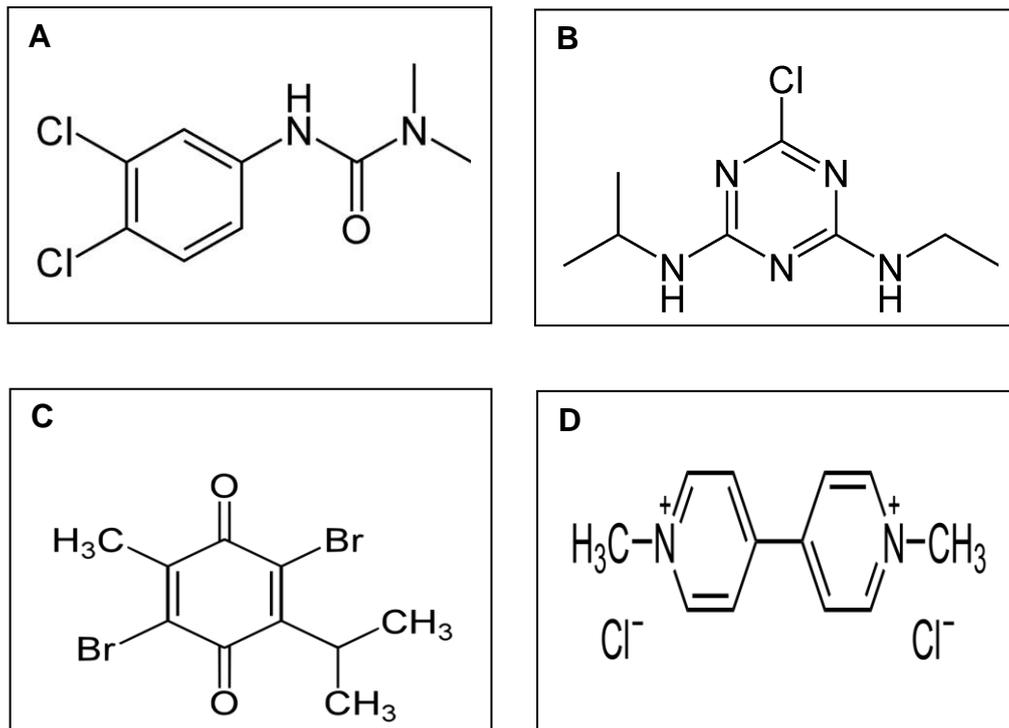


Figura 3: Estrutura química dos inibidores: DCMU, (3-(3',4'-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia) (A), atrazina, (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilano-s triazina) (B), DBMIB, (2,5-dibromo-3-metil-5-isopropil-*p*-benzoquinona) (C), metil viologênio, (1,1-dimetil-4,4-dicloreto de dipiridílio) (D).

O tempo de imersão dos pecíolos e as concentrações dos inibidores foram definidos em ensaios preliminares, nos quais foram feitas leituras durante 24 h, para determinar o tempo de embebição que teria efeito do inibidor, através da observação do comportamento da curva OJIP. Para o DCMU, atrazina e metil viologênio, o tempo de imersão foi de duas horas, utilizando as concentrações de 25, 50, 100, 250 e 500 μM ; para o DBMIB, as concentrações foram iguais, porém o tempo de imersão foi de cinco horas. O período de contato do pecíolo com as soluções dos tratamentos foram mantidos em condição de luz baixa (5 a $10 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para induzir o processo fotossint\u00e9tico, a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Assim sendo, ap\u00f3s a exposi\u00e7\u00e3o das folhas aos tratamentos, foram feitas as avalia\u00e7\u00f5es, sendo representados por oito repeti\u00e7\u00f5es por tratamento.

2.2 Medições simultâneas da cinética da fluorescência transiente, decaída da fluorescência (DF) e a reflexão modulada a 820 nm (MR₈₂₀)

Durante o período de imersão, as folhas de ervilha foram adaptadas ao escuro por 30 min, tempo suficiente para oxidação completa de todos os centros de reações da cadeia de transporte de elétrons. As medidas da cinética da fluorescência transiente, da decaída da fluorescência e a reflexão modulada à 820 nm foram gravadas simultaneamente com o fluorômetro *Multifunctional Plant Efficiency Analyser* – M-PEA (Hansatech Instrument Ltd. King's Lynn, Norkolk, PE30 40NE, UK).

No instrumento M-PEA existe emissores de comprimento de onda nas faixas de: $627 \pm 10\text{nm}$ para a luz actínica, $820 \pm 25\text{nm}$ para a luz modulada e $735 \pm 15\text{nm}$ para luz vermelho distante, sendo que este último usa um filtro (RG9) para remover alguns componentes da luz visível. Filtros de alta qualidade óptica foram usados para proteção dos detectores de fluorescência transiente e DF ($730 \pm 15\text{nm}$) e reflexão modulada ($820 \pm 20\text{nm}$) (STRASSER et al, 2010). O pulso de luz saturante, com intensidade de $5.000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, foi emitido pelo aparelho durante 60s em uma \u00e1rea com 4 mm de di\u00e2metro.

A aquisi\u00e7\u00e3o dos dados para os tr\u00eas sinais, fluoresc\u00eancia polif\u00e1sica OJIP e MR na luz e DF no escuro, \u00e9 a cada 0,01 ms no intervalo 1 (0,01-0,3 ms), a cada 0,1 ms no intervalo 2 (0,3-3 ms), a cada 1 ms no intervalo 3 (3-30 ms) e diminui de acordo at\u00e9 o intervalo 7 (30-300 s), onde a aquisi\u00e7\u00e3o dos dados \u00e9 a cada 10 s. As medidas simult\u00e2neas da fluoresc\u00eancia polif\u00e1sica e DF requer um ciclo com per\u00edodos de luz e escuro. Durante o ciclo, a fluoresc\u00eancia transiente \u00e9 medida quando a luz act\u00ednica \u00e9 ligada e DF \u00e9 registrado quando essa luz \u00e9 desligada.

Cada curva da cin\u00e9tica da fluoresc\u00eancia transiente \u00e9 obtida a partir de folhas adaptadas ao escuro e foi analisada de acordo com o Teste-JIP (STRASSER e STRASSER, 1995), utilizando os dados originais: fluoresc\u00eancia m\u00ednima (F_0), registrada a 20 μs ap\u00f3s a ilumina\u00e7\u00e3o act\u00ednica, intensidades de fluoresc\u00eancia a 2 ms ($F_{2\text{ms}}$ – ponto J), 30ms ($F_{30\text{ms}}$ – ponto I) e a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima (F_M). Usando esses dados, alguns par\u00e2metros podem ser calculados para quantificar o comportamento do FSII. Os principais par\u00e2metros analisados podem ser verificados na Tabela 1.

A partir do sinal de reflexão modulada à 820 nm (MR_{820} ou simplesmente MR), a razão MR/MR_0 , onde MR_0 é o valor do início da iluminação actínica (feita em 0,7 ms, a primeira medida confiável de MR), foi calculada. Essa razão reflete as mudanças no estado redox do centro de reação do FSI (P_{700}^+) e da plastocianina (PC^+). Assim sendo, o declínio da amplitude da intensidade da reflexão modulada 820nm representa um acúmulo desses cofatores no estado oxidado, já o aumento dessa amplitude indica a redução de P_{700}^+ e PC^+ (STRASSER et. al, 2010).

A curva de indução de DF apresenta um aumento rápido para um pico I_1 (a 7 ms), um subsequente declínio até um pico I_2 (em torno de 100 ms) e um período de longa duração (entre 0,5 a 10 s) onde o nível I_3 é localizado.

Tabela 1. Definição de termos e fórmulas dos principais parâmetros do Teste-JIP, usados para analisar a fluorescência transiente emitida por folhas adaptadas ao escuro.

| Parâmetros da fluorescência | Descrição |
|--|--|
| Parâmetros Derivados e Parâmetros OJIP | |
| $F_o \cong F_{50 \mu s}$ | Fluorescência mínima quando todos os centros de reação do FSII estão abertos |
| $F_m = F_P$ | Fluorescência máxima quando todos os centros de reação do FSII estão fechados |
| Rendimentos quânticos, eficiências e probabilidades | |
| $\Phi_{P_0} = TR_o/ABS = 1 - F_o/F_m = F_v/F_m$ | Rendimento quântico máximo fotoquímico primário em $t = 0$ |
| $\Phi_{E_0} = \Phi_{P_0} \cdot \psi_o = 1 - (F_J/F_m) = ET_o/ABS$ | Rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons |
| $\Psi_{E_0} = ET_o/TR_o = 1 - V_J$ | Probabilidade (no tempo 0) que um exciton capturado em mover um elétron na cadeia de transporte de elétrons após Q_A^- |
| $\delta_{R_0} = RE_o/ET_o = (1 - V_I)/(1 - V_J)$ | Eficiência com que um elétron pode mover dos aceptores de elétrons do intersistema reduzidos para os aceptores finais do FSI |
| $\Phi_{R_0} = RE_o/ABS = \Phi_{P_0} \times \Psi_{E_0} \times \delta_{R_0}$ | Rendimento quântico de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI por fóton absorvido |
| RC/ABS | centro de reação ativo – Q_A reduzida- por clorofilas da antena do FSII |
| Fluxos específicos ou atividades expressas por centro de reação (RC) | |
| $ABS/RC = M_o \times (1/V_J) \times (1/\Phi_{P_0})$ | Fluxo de absorção por RC |
| $TR_o/RC = M_o/V_J$ | Fluxo de energia capturado por RC em $t = 0$ |
| $ET_o/RC = (M_o/V_J) \times \Psi_{E_0} = (M_o/V_J) \times (1 - V_J)$ | Fluxo de transporte de elétrons por RC em $t = 0$ |
| $RE_o/RC = (RE_o/ET_o) \times (ET_o/RC)$ | Redução dos aceptores finais do lado acceptor de elétrons do FSI por RC em $t = 0$ |
| Índice de Performance | |
| $PI_{abs} = (RC/ABS) \times (\Phi_{P_0}/(1 - \Phi_{P_0})) \times (\Psi_{E_0}/(1 - \Psi_{E_0}))$ | Índice de performance fotossintético |
| $PI_{total} = (RC/ABS) \times (\Phi_{P_0}/(1 - \Phi_{P_0})) \times (\Psi_{E_0}/(1 - \Psi_{E_0})) \times (\delta_{R_0}/(1 - \delta_{R_0}))$ | Índice de performance total , medindo a performance ate os aceptores finais de elétrons do FSI |

3. RESULTADOS

3.1. Análise da cinética da fluorescência transiente OJIP e Teste-JIP

A fluorescência transiente de folhas de ervilha destacadas tratadas com diferentes concentrações de diferentes inibidores está representada nas Figuras 4 a 7. A transiente está apresentada em escala de tempo logarítmica a partir de 50 μ s. A fluorescência transiente da clorofila *a* de folhas destacadas de ervilha tratadas com diferentes concentrações de DCMU ou etanol 1% (foi usado para diluição do inibidor), mostra que houve um aumento no nível J à medida que aumentava a concentração de DCMU (Figura 4). O mesmo foi observado nos valores de F_0 , sendo mais expressivo na concentração de 500 μ M quando comparados com as plantas tratadas e não tratadas com etanol 1%, porém os tratamentos não mudaram significativamente os valores de F_M . Na concentração de 500 μ M de DCMU a curva de indução perdeu sua característica sigmoide entre os passos J-I, visto que a intensidade de fluorescência na fase J foi similar a de F_M , sugerindo que houve uma completa inibição na transferência de elétrons de Q_A para Q_B , uma vez que o DCMU tem função de inibição nesse ponto do RC do FSII, ocasionando então um acúmulo de Q_A reduzido. Nas outras concentrações as curvas apresentam as fases J-I e I-P definidas, mas com intensidades de fluorescência superiores ao controle. Na figura 5, as curvas de indução da fluorescência de folhas tratadas com diferentes concentrações de atrazina teve o mesmo comportamento das curvas das folhas tratadas com diferentes concentrações de DCMU, já que a atrazina também é um bloqueador de elétrons entre Q_A e Q_B ,

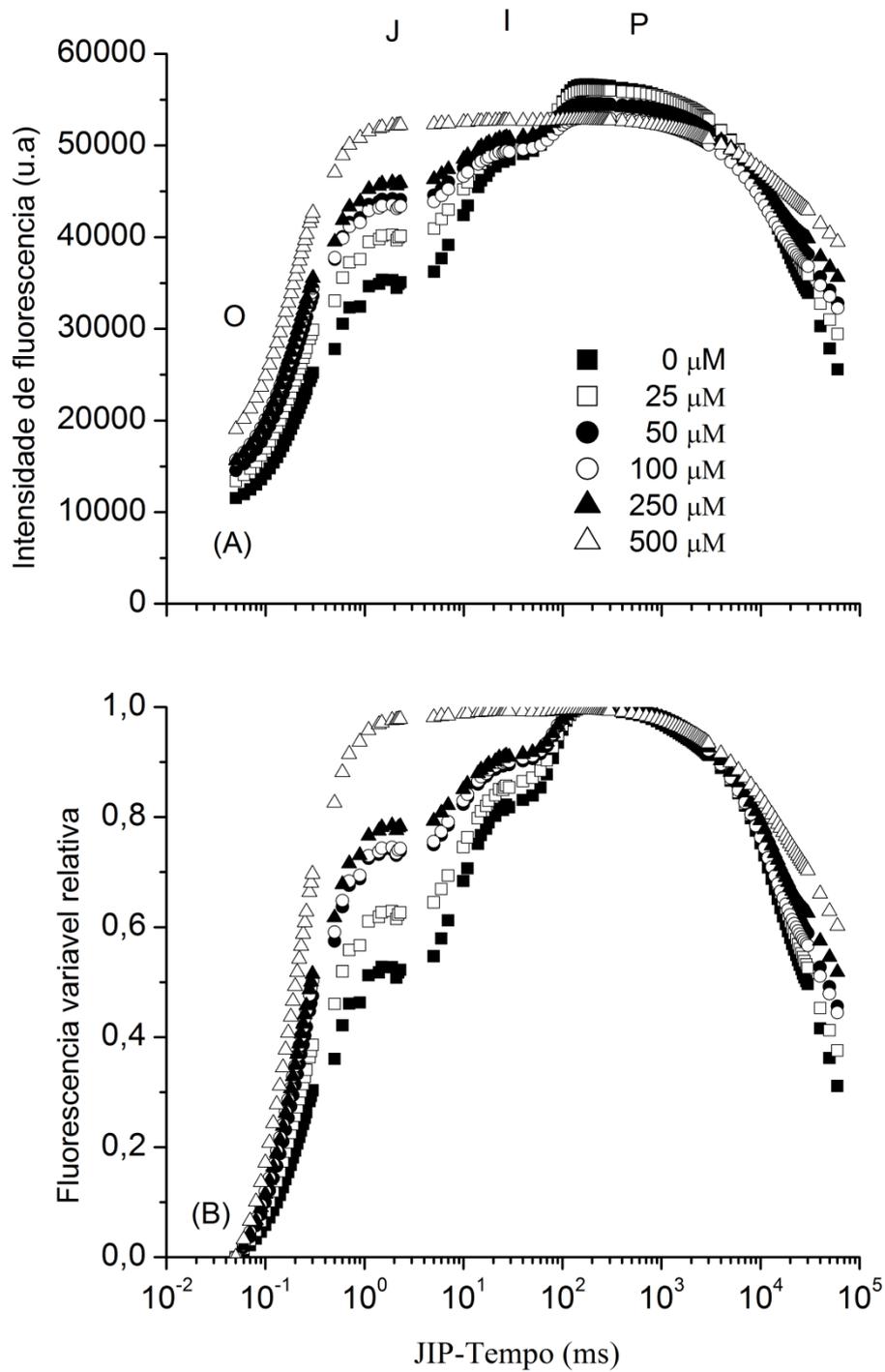


Figura 4: Fluorescência transiente de folhas de ervilhas destacadas adaptadas ao escuro por 30min, tratadas com diferentes concentrações de DCMU. (A) Intensidade de fluorescência, (B) fluorescência variável relativa.

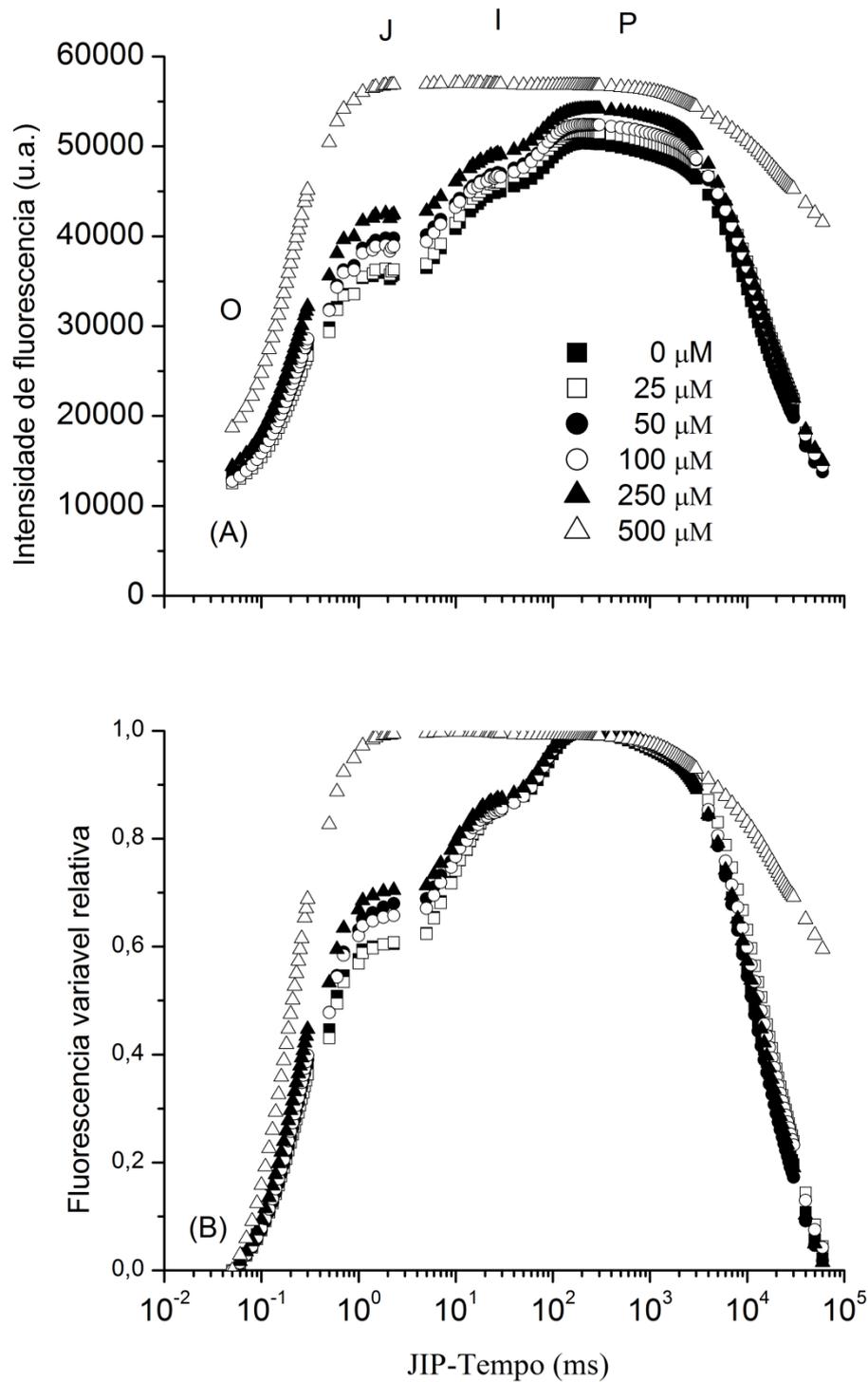


Figura 5: Fluorescência transiente de folhas de ervilhas destacadas adaptadas ao escuro por 30min, tratadas com diferentes concentrações de atrazina. (A) Intensidade de fluorescência, (B) fluorescência variável relativa.

As folhas destacadas de ervilha tratadas com diferentes concentrações de DBMIB e metil viologênio, apresentaram curvas transiente OJIP típica (STRASSER et al., 1999, 2000, 2004) (Figuras 6 e 7). Para o DBMIB, um inibidor da reoxidação do *pool* de plastoquinona, foi observado uma pequena diminuição da curva na fase I-P nas concentrações mais altas (250 e 500 μM) quando comparadas com controle, porém não houve diferença nessa redução, pois os valores do controle com as maiores concentrações se aproximaram. Para os valores de F_M (ponto P) também teve uma pequena decaída nas maiores concentrações de DBMIB, também não sendo diferente em relação ao controle e para F_0 não houve diferença das doses ao controle (Figura 6). As curvas de indução de fluorescência em folhas tratadas com metil viologênio apresentaram comportamento ao contrário do que foi verificado com o DBMIB, as quais tiveram um aumento na fase I-P e no pico F_M nas concentrações de 100 e 500 μM (Figura 7), quando comparada com o controle.

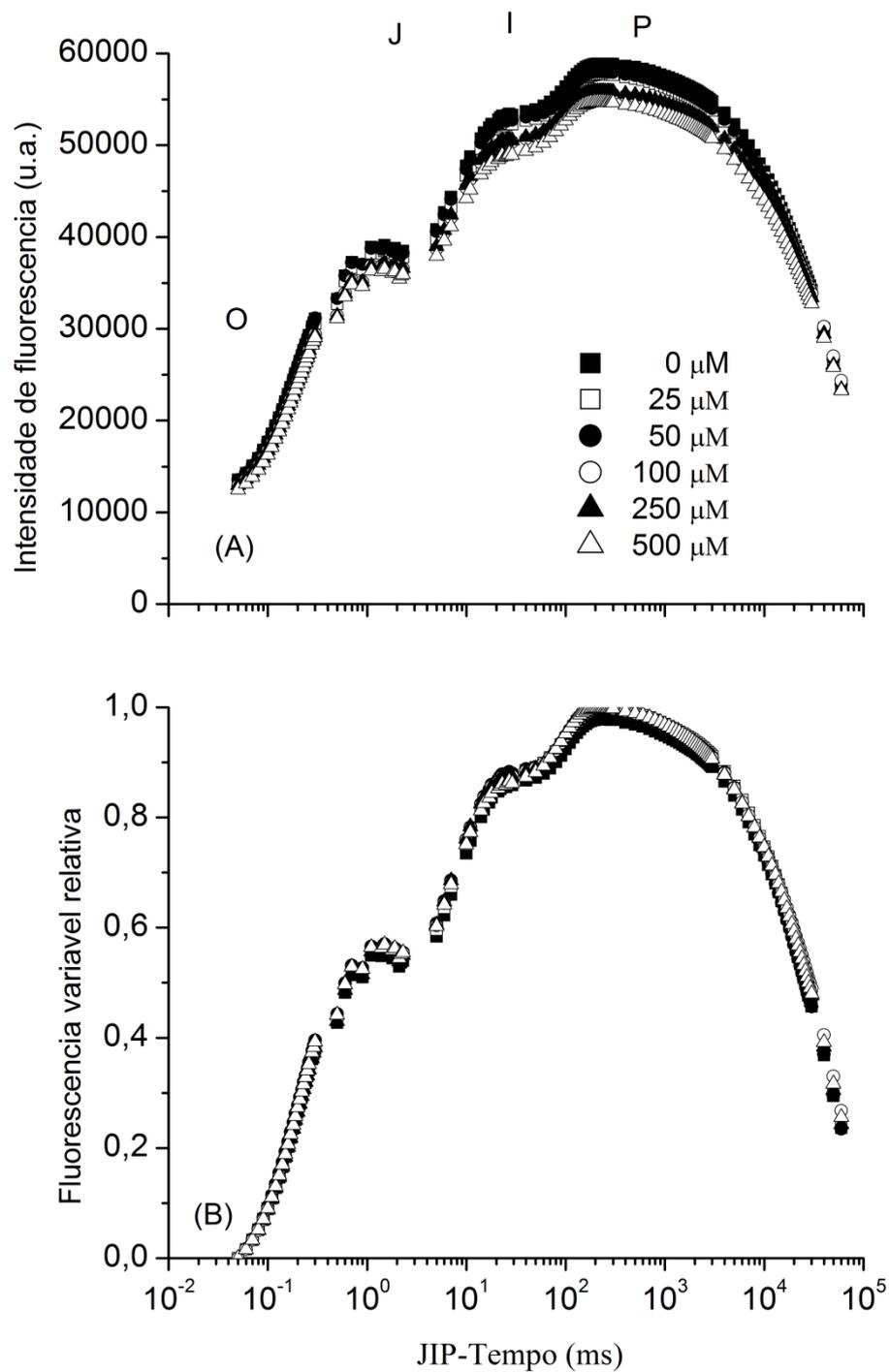


Figura 6: Fluorescência transiente de folhas de ervilhas destacadas adaptadas ao escuro por 30min, tratadas com diferentes concentrações de DBIMB. (A) Intensidade de fluorescência, (B) fluorescência variável relativa.

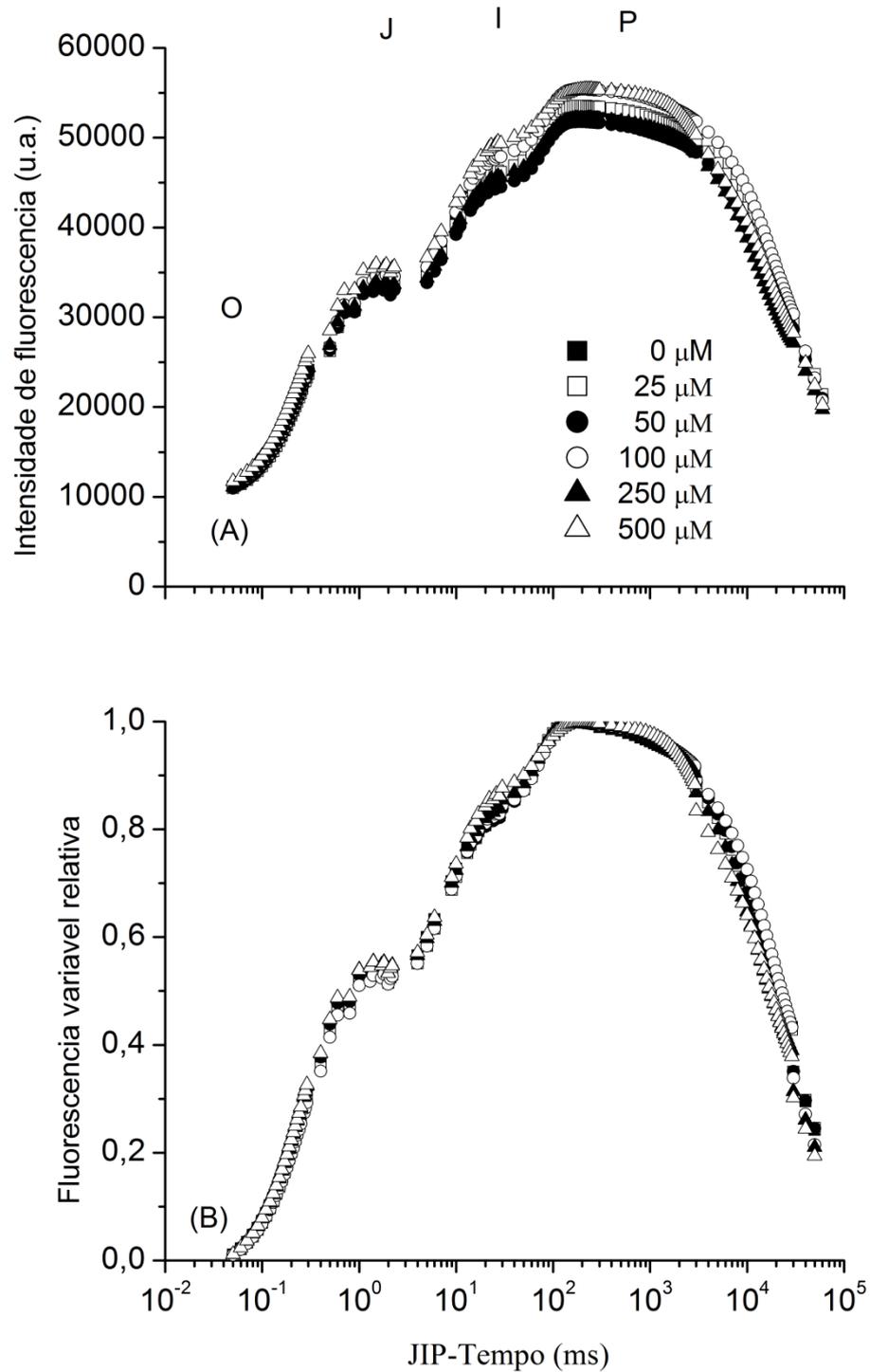


Figura 7: Fluorescência transiente de folhas de ervilhas destacadas adaptadas ao escuro por 30min, tratadas com diferentes concentrações de metil viologênio. (A) Intensidade de fluorescência, (B) fluorescência variável relativa.

Parâmetros do Teste-JIP que transcrevem as intensidades de fluorescência da clorofila são representados nas figuras 8 a 11, sendo os dados normalizados em relação aos respectivos controles. Para o DCMU e atrazina os parâmetros foram feitos até a concentração de 250 μM , visto que a concentração de 500 μM perde a característica sigmoide da curva OJIP (Figura 8 e 9).

Nas folhas de ervilhas tratadas com DCMU, foi observada uma variação nos valores relacionados com os fluxos específicos por centro de reação, sendo dependente da dose utilizada (Figura 8). O parâmetro que indica a relação máxima do rendimento quântico dos processos fotoquímicos e não fotoquímicos do FSII (F_V/F_0) sofreu uma redução a partir da menor concentração com DCMU.

Com o aumento da concentração de DCMU, pode ser observado que o parâmetro relacionado com o fluxo de absorção por RC (ABS/RC) aumentou, o qual também diz respeito ao tamanho aparente do sistema antena. Para os parâmetros de fluxo de transporte de elétrons por centro de reação ET_0/RC e o fluxo de energia capturado por centro de reação TR_0/RC , no tempo zero para ambos, observa-se o mesmo comportamento, em que ambos reduziram a partir da menor concentração de DCMU (25 μM) em relação ao controle.

Além disso, a figura 7 também apresenta os parâmetros de rendimentos ou razões de fluxos. Tanto o rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons ($\phi_{E_0} = ET_0/ABS$) quanto o rendimento quântico de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI por fóton absorvido ($\phi_{R_0} = RE_0/ABS$), como a eficiência que um éxciton capturado no centro de reação pode mover um elétron na cadeia de transporte de elétrons após Q_A ($\Psi_{E_0} = ET_0/TR_0$) tiveram o mesmo comportamento, com a redução de seus valores com o aumento da concentração de DCMU, evidenciando que houve o bloqueio do transporte de elétrons a partir de Q_A^- . O rendimento quântico primário da fotoquímica primária no tempo zero ($\phi_{P_0} = TR_0/ABS = F_V/F_M$) não teve uma variação entre os tratamentos com DCMU.

Para o índice de performance fotossintético (PI_{abs}) e o índice de performance total, o qual mede a performance até os aceptores finais de elétrons do FSI (PI_{total}), houve uma redução à medida que se aumentou a concentração de DCMU, quando comparadas com o controle. Isso indica um efeito negativo na maquinaria fotossintética, visto que esses parâmetros estão relacionados com fluxo de energia em toda a cadeia de transporte de elétrons fotossintética.

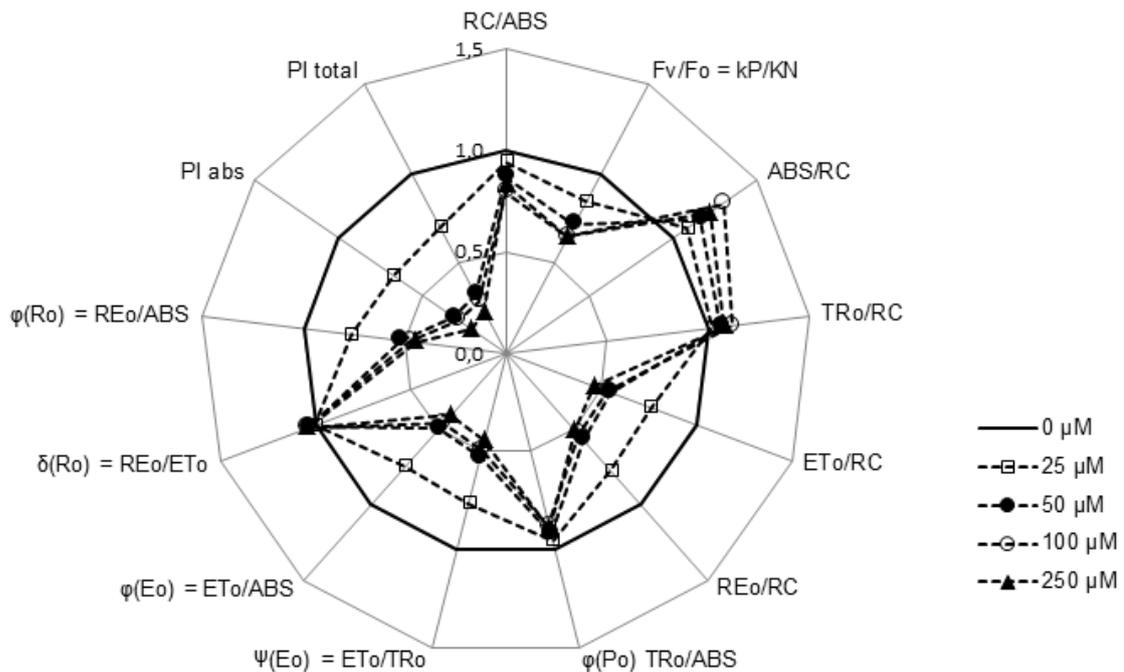


Figura 8: Parâmetros quantitativos da maquinaria fotossintética que foram derivados pelo Teste-JIP a partir da fluorescência polifásica OJIP de folhas de ervilha destacadas tratadas com diferentes concentrações de DCMU. Todos os parâmetros foram normalizados a partir da concentração 0 µM.

Com a imersão dos pecíolos em solução de atrazina foi possível observar pequena alteração nos parâmetros estruturais, tais como: RC/ABS (centro de reação ativo – Q_A reduzida- por clorofilas da antena do FSII) e F_v/F_0 , tiveram um pequeno aumento nas concentrações intermediárias de atrazina. Com relação aos parâmetros funcionais que é representado pelos fluxos específicos por RC ativo, verifica-se um forte efeito sobre ET_0/RC , sendo dependente da concentração. Assim sua redução indica que o transporte de elétrons foi injuriado pela presença do inibidor. Os outros parâmetros relacionados com o fluxo por centro de reação, tais como: ABS/RC, TR₀/RC, RE₀/RC, tiveram uma redução na concentração de 50 µM de atrazina, no entanto não diferiu tanto do controle como ET_0/RC (Figura 9).

Os parâmetros de fluxo de energia por absorção ou rendimento quântico, apenas o ϕ_{E_0} diminui com o aumento da concentração de atrazina quando comparado com o controle. Já para o rendimento ϕ_{R_0} teve uma redução apenas na concentração de 250 µM. Os parâmetros envolvidos com a eficiência e probabilidade

observou-se uma redução em Ψ_{E_0} a partir da menor concentração utilizada e um aumento em δ_{R_0} nas três maiores concentrações.

O PI_{abs} teve um aumento em relação ao controle na menor concentração (25 μM) e diminuiu na dose de 250 μM . Já o PI_{total} apresentou um aumento nas três primeiras concentrações (25, 50 e 100 μM), do contrário ocorreu na concentração de 250 μM , uma redução desse parâmetro comparando com as plantas que não foram tratadas com atrazina. Assim sendo, observa-se que a dose maior desse inibidor prejudicou severamente o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons.

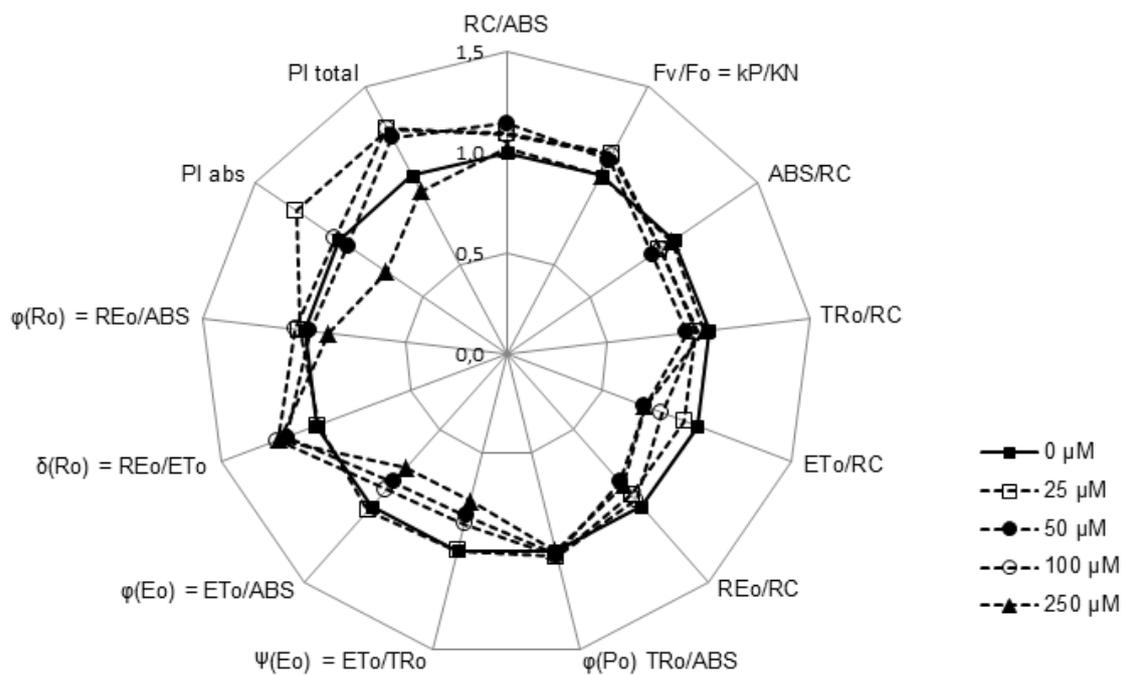


Figura 9: Parâmetros quantitativos da maquinaria fotossintética que foram derivados pelo Teste-JIP a partir da fluorescência polifásica OJIP de folhas de ervilha destacadas tratadas com diferentes concentrações de atrazina. Todos os parâmetros foram normalizados a partir da concentração 0 μM .

Para o DBMIB houve apenas variação dos parâmetros relacionados com a redução dos receptores de elétrons do lado acceptor do FSI, tais como: RE_0/RC , ϕ_{R_0} , δ_{R_0} . Para estes, ocorreu um aumento nos seus valores na maior concentração do inibidor (500 μM) (Figura 10), indicando que alta concentração de DBMIB pode doar elétrons diretamente para os aceptores do FSI. Os parâmetros relacionados com a capacidade de um elétron capturado mover-se para o intersistema, ou seja, além de Q_A^- , não sofreram diferença em relação ao controle (0 μM). O índice de performance total (PI_{total}) também teve um aumento na concentração de 500 μM de DBMIB, enquanto que PI_{abs} não apresentou nenhuma diferença com aumento das concentrações em relação ao controle.

As folhas de ervilha tratadas com diferentes concentrações de metil viologênio, apresentaram variações nos mesmos parâmetros que o DBMIB, em relação à redução dos aceptores de elétrons do FSI (RE_0/RC , δ_{R_0} e ϕ_{R_0}), porém houve uma redução dos seus valores à medida que aumentou a dose do inibidor, sendo mais expressiva essa mudança na concentração de 500 μM (Figura 11). Além disso, a concentração de 500 μM de metil viologênio causou uma redução drástica nos valores de PI_{total} , já que este parâmetro está relacionado com a redução dos aceptores de elétrons do FSI, como (δ_{R_0} , ϕ_{R_0} e RE_0/RC). Com isso, os resultados conferem com o mecanismo de ação desse inibidor, uma vez que o metil viologênio captura elétrons antes destes chegarem até a ferredoxina. As concentrações de 25 e 100 μM apresentaram um pequeno aumento nos parâmetros relacionados com os índices de performance (PI_{total} e PI_{abs}).

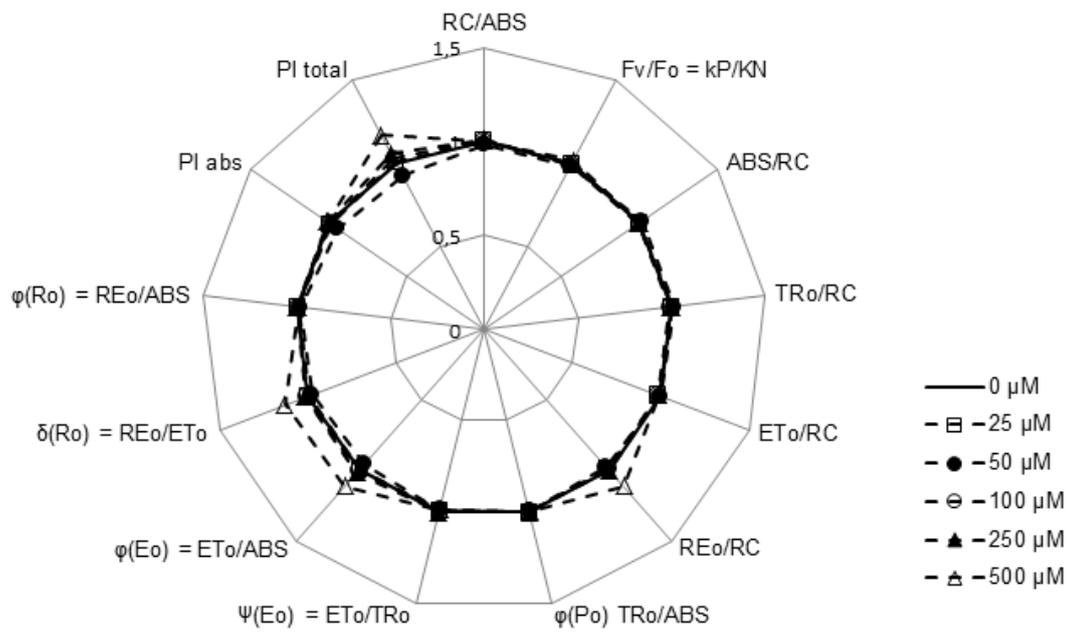


Figura 10: Parâmetros quantitativos da maquinaria fotossintética que foram derivados pelo Teste-JIP a partir da fluorescência polifásica OJIP de folhas de ervilha destacadas tratadas com diferentes concentrações de DBMIB. Todos os parâmetros foram normalizados a partir da concentração 0 μM.

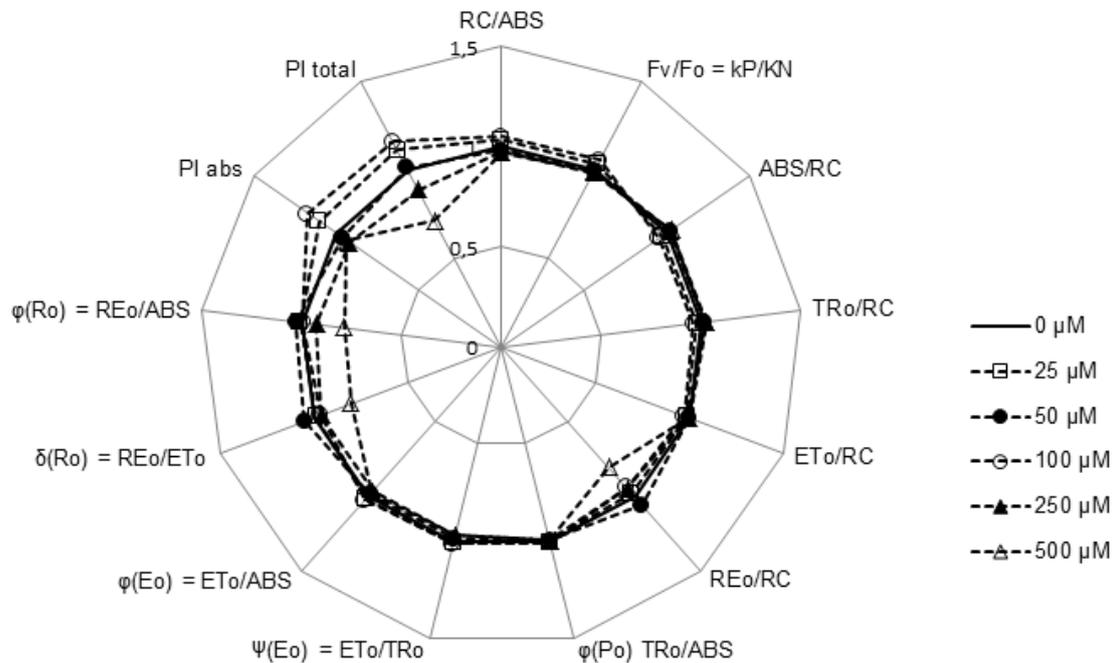


Figura 11: Parâmetros quantitativos da maquinaria fotossintética que foram derivados pelo Teste-JIP a partir da fluorescência polifásica OJIP de folhas de ervilha destacadas tratadas com diferentes concentrações de metil viologênio. Todos os parâmetros foram normalizados a partir da concentração $0 \mu\text{M}$.

3.2. Análise da cinética de reflexão modulada a 820 nm (MR/MR_0)

As figuras 12 a 15 mostram os efeitos de diferentes concentrações dos inibidores utilizados sobre a reflexão modulada a 820 nm. Para todos os inibidores, no início da iluminação actínica de $5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em folhas destacadas de ervilhas e adaptadas ao escuro por 30 min, P_{700} e plastocianinas encontram-se completamente reduzidas, devido aos elétrons que chegam do *pool* de plastoquinona reduzido. Assim que passa o tempo da iluminação há uma redução da amplitude da curva de MR/MR_0 , indicando um aumento no estado oxidado de P_{700} e plastocianinas até um ponto em que ocorre a sua re-redução, que é ilustrada com um novo aumento da amplitude da curva.

Nas folhas de ervilhas tratadas com DCMU, observou-se uma diminuição da amplitude da curva, que corresponde a fase de re-redução de P_{700} e plastocianina em seguida dos seus estados oxidados, com o aumento das concentrações do

inibidor, sendo mais marcante esse efeito na maior concentração (500 μM), onde se observou uma ausência dessa re-redução (Figura 12), podendo ser causado isto pela completa inibição da cadeia de transporte de elétrons além de Q_A^- .

Nas curvas da cinética de MR/MR_0 em folhas tratadas com diferentes concentrações de atrazina (Figura 13) verificou-se o mesmo comportamento que a cinética na presença do DCMU para a concentração de 500 μM , na qual não se observa a fase de re-redução de P_{700} e plastocianina. Para as outras concentrações observa-se o mesmo comportamento que ocorreu no controle.

A figura 14 referente às folhas tratadas com DBMIB, na qual observa-se que não houve uma diferença nas fases de oxidação e re-redução inicial de P_{700} e plastocianina em nenhuma das concentrações em relação ao controle, porém em torno dos 10s de iluminação, nota-se uma pequena re-redução nas concentrações de 50 e 250 μM . Diferentemente disso, os tratamentos de folhas com metil viologênio, apresentaram um pequeno aumento do estado oxidado de P_{700} e PC para as concentrações de 100 e 500 μM (Figura 15). Já na fase de re-redução deles, houve uma queda na amplitude da curva com o aumento da dose do metil viologênio, sendo mais marcante na concentração de 500 μM .

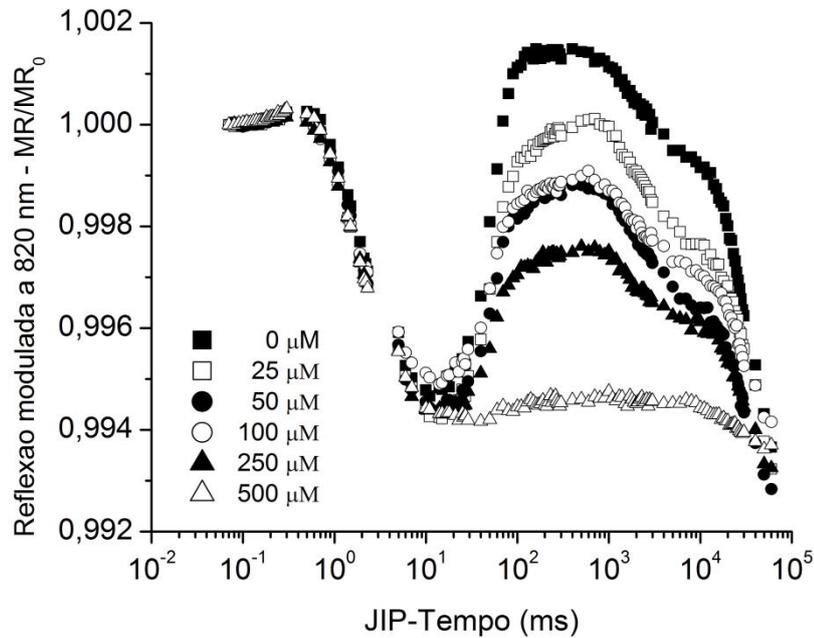


Figura 12. Cinética da reflexão modulada a 820 nm de folhas de ervilha destacadas e adaptadas ao escuro por 30min, tratadas com diferentes concentrações de DCMU. Os sinais de reflexão modulada a 820 nm são representados pela razão MR/MR_0 , onde MR_0 é o valor onde começa a iluminação actínica (a 0,7ms).

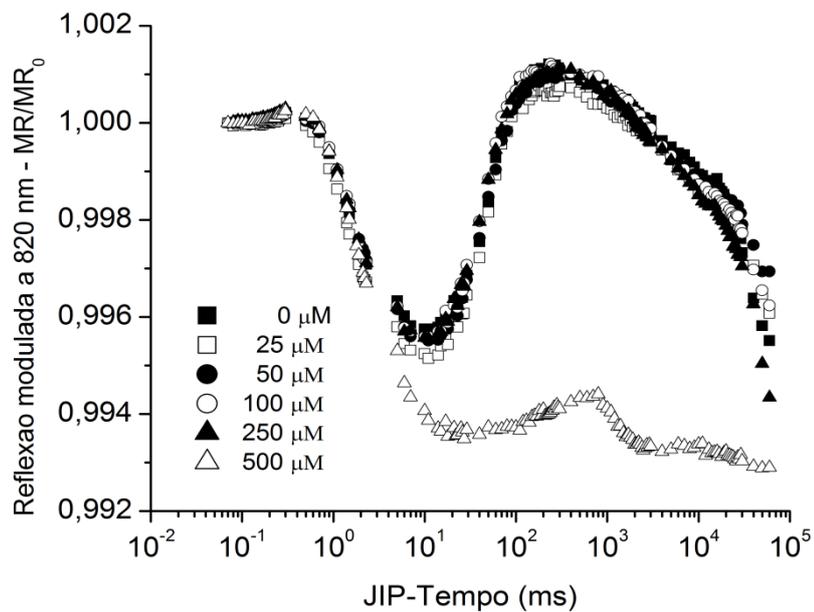


Figura 13. Cinética da reflexão modulada a 820 nm de folhas de ervilha destacadas e adaptadas ao escuro por 30min, tratadas com diferentes concentrações de atrazina. Os sinais de reflexão modulada a 820 nm são representados pela razão MR/MR_0 , onde MR_0 é o valor onde começa a iluminação actínica (a 0,7ms).

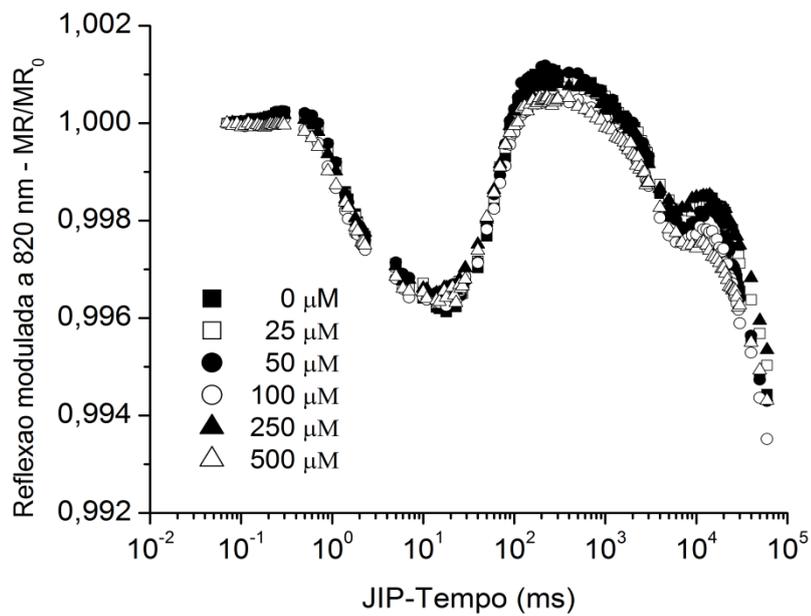


Figura 14. Cinética da reflexão modulada a 820 nm de folhas de ervilha destacadas e adaptadas ao escuro por 30min, tratadas com diferentes concentrações de DBMIB. Os sinais de reflexão modulada a 820 nm são representados pela razão MR/MR_0 , onde MR_0 é o valor onde começa a iluminação actínica (a 0,7ms).

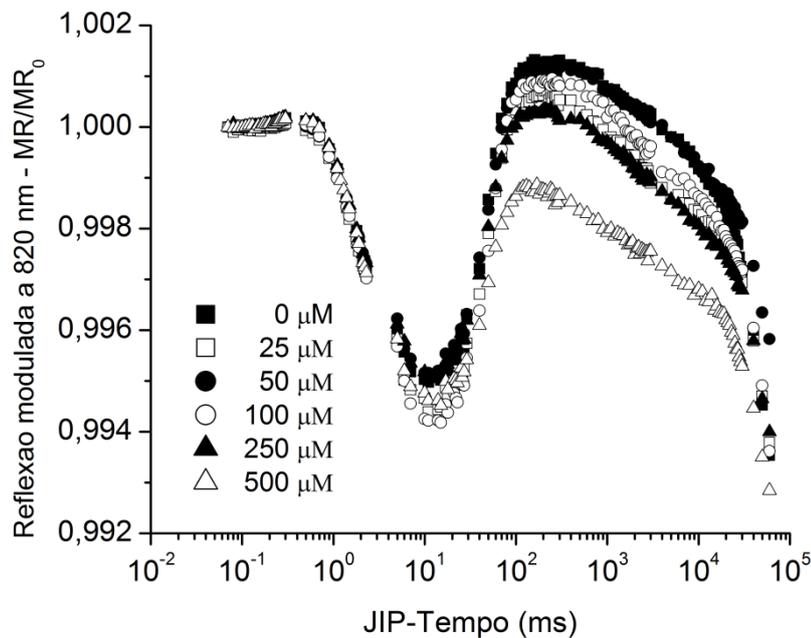


Figura 15. Cinética da reflexão modulada a 820 nm de folhas de ervilha destacadas e adaptadas ao escuro por 30min, tratadas com diferentes concentrações de metilviologênio. Os sinais de reflexão modulada a 820 nm são representados pela razão MR/MR_0 , onde MR_0 é o valor onde começa a iluminação actínica (a 0,7ms).

3.3. Análise da cinética da decaída de fluorescência (DF)

Assim como as clorofilas da antena do FSII emitem o sinal de fluorescência transiente, elas também emitem o sinal de DF, sendo esta como resultado da reversão de separação de carga seguido pela transferência de energia de excitação rápida de P_{680} excitado para as clorofilas da antena (GOLTSEV et al., 2009).

As curvas de indução DF (DF vs JIP-tempo) foram apresentados nas figuras 16 a 19 como proposto por Strasser et al (2010), as mesmas foram construídas como cinética da DF em relação ao JIP-tempo para cada intensidade DF em apropriados tempo de decaída vs JIP-tempo em que o intervalo de escuro começa (tempo registrado durante as interrupções escuras da luz actínica). Aqui, apenas uma seleção de curvas DF é apresentada (para simplificar) (tempo de decaída a 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,15, 0,25, 1, 3, 30 e 230 ms). Os pontos característicos das curvas DF versus JIP-Tempo, isto é, o pico de I_1 (a 3 ms), o ombro I_2 (a 100 ms) e I_3 (a 1000 ms, no planalto) foram denotados segundo nomenclatura do Goltsev (GOLTSEV et al, 2009).

Nas folhas tratadas com diferentes concentrações de DCMU observa-se uma redução apenas no pico I_1 (a 3 ms) até a dose de 250 μM . Para a maior concentração (500 μM) a curva de indução de DF desaparece (Figura 16). Para as folhas tratadas com atrazina foi verificado o mesmo, porém com uma intensidade de redução menor. Mas para a concentração de 500 μM a curva teve o mesmo comportamento (Figura 17). As folhas tratadas com DBMIB não houve alteração na curva de indução de DF com o aumento das doses quando comparada com o controle (Figura 18). Já para os tratamentos com metil viologênio verifica-se um aumento do pico I_1 nos primeiros tempos em que a luz actínica foi interrompida para as concentrações de 100 e 500 μM (Figura 19).

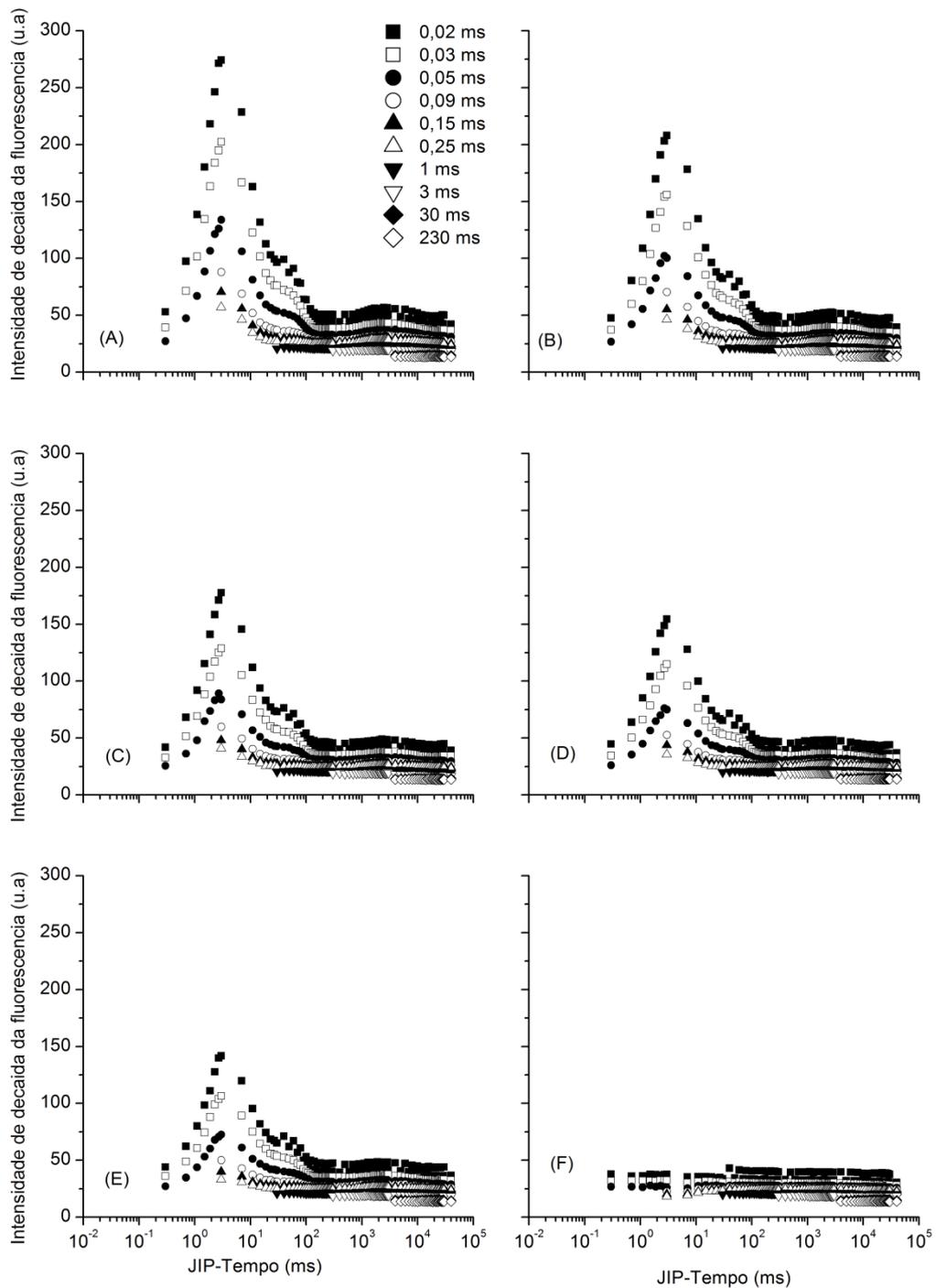


Figura 16. Cinética (curvas de indução) da decaída da fluorescência (DF) induzidas por um pulso saturante de luz actínica vermelha em folhas destacadas de ervilha e adaptadas ao escuro quando tratadas com DCMU. As curvas de indução de DF (DF vs JIP-tempo) foram construídas a partir da cinética de DF vs. tempo de decaída obtidas durante a interrupção da luz actínica (escuro); cada um deles representa a intensidade de DF a um certo tempo de decaída vs. JIP-tempo em que o intervalo de tempo começou. (A, 0 μ M (controle); B, 25 μ M; C, 50 μ M; D, 100 μ M; E, 250 μ M e F, 500 μ M).

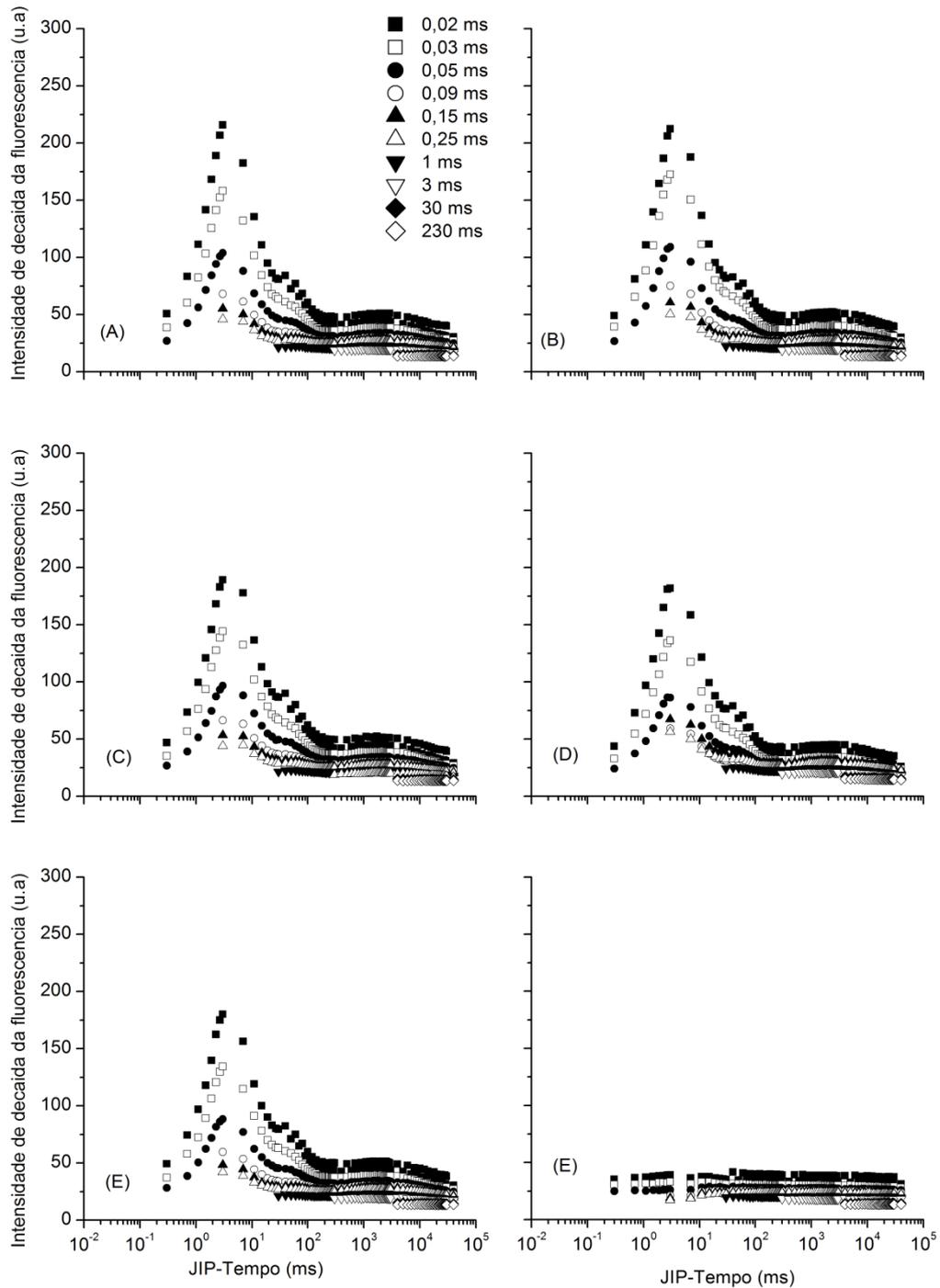


Figura 17. Cinética (curvas de indução) da decaída da fluorescência (DF) induzidas por um pulso saturante de luz actínica vermelha em folhas destacadas de ervilha e adaptadas ao escuro quando tratadas com atrazina. As curvas de indução de DF (DF vs JIP-tempo) foram construídas a partir da cinética de DF vs. tempo de decaída obtidas durante a interrupção da luz actínica (escuro); cada um deles representa a intensidade de DF a um certo tempo de decaída vs. JIP-tempo em que o intervalo de tempo começou. (A, 0 μ M (controle); B, 25 μ M; C, 50 μ M; D, 100 μ M; E, 250 μ M e F, 500 μ M).

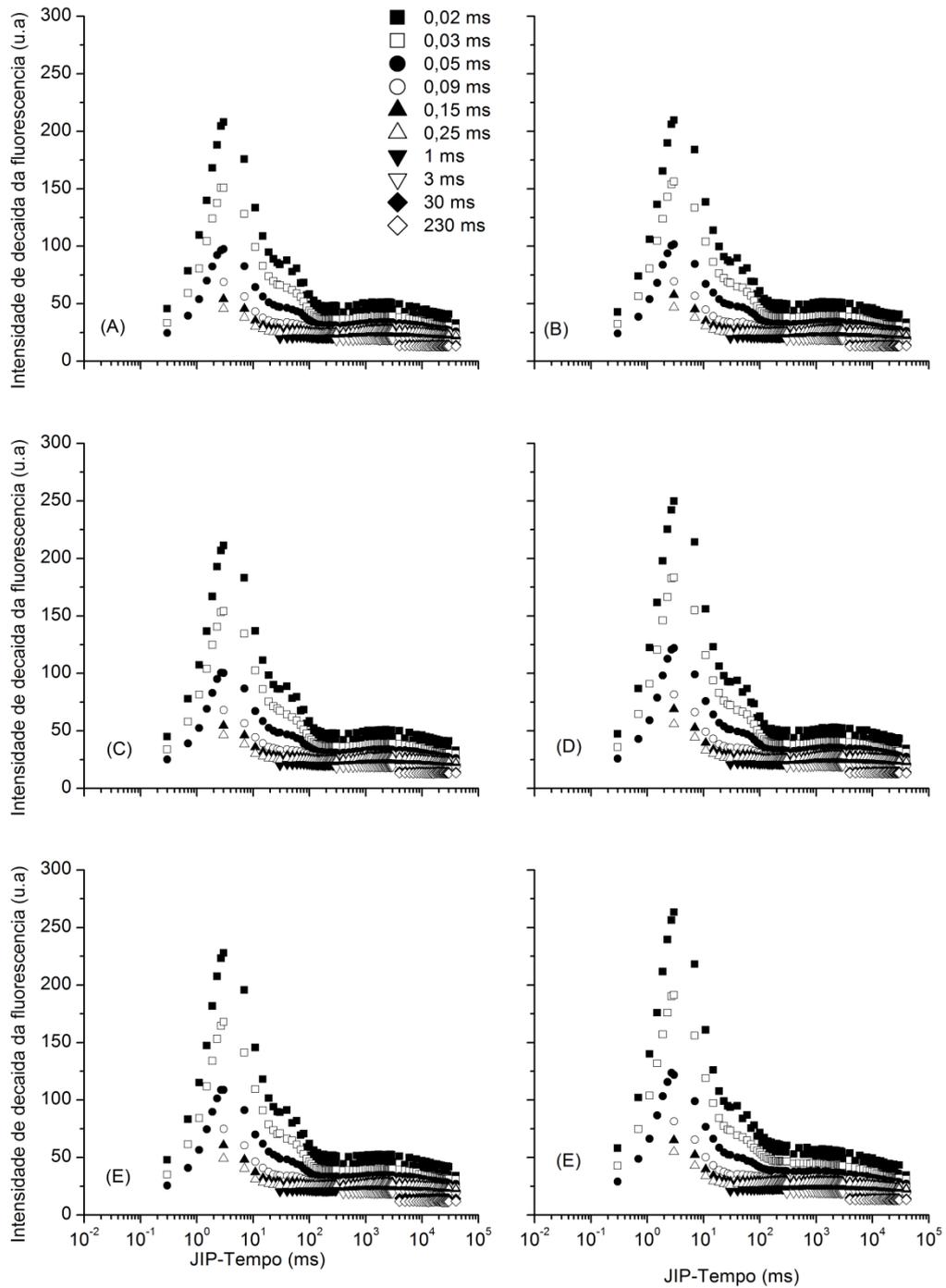


Figura 18. Cinética (curvas de indução) da decaída da fluorescência (DF) induzidas por um pulso saturante de luz actínica vermelha em folhas destacadas de ervilha e adaptadas ao escuro quando tratadas com DBMIB. As curvas de indução de DF (DF vs JIP-tempo) foram construídas a partir da cinética de DF vs. tempo de decaída obtidas durante a interrupção da luz actínica (escuro); cada um deles representa a intensidade de DF a um certo tempo de decaída vs. JIP-tempo em que o intervalo de tempo começou. (A, 0 μ M (controle); B, 25 μ M; C, 50 μ M; D, 100 μ M; E, 250 μ M e F, 500 μ M).

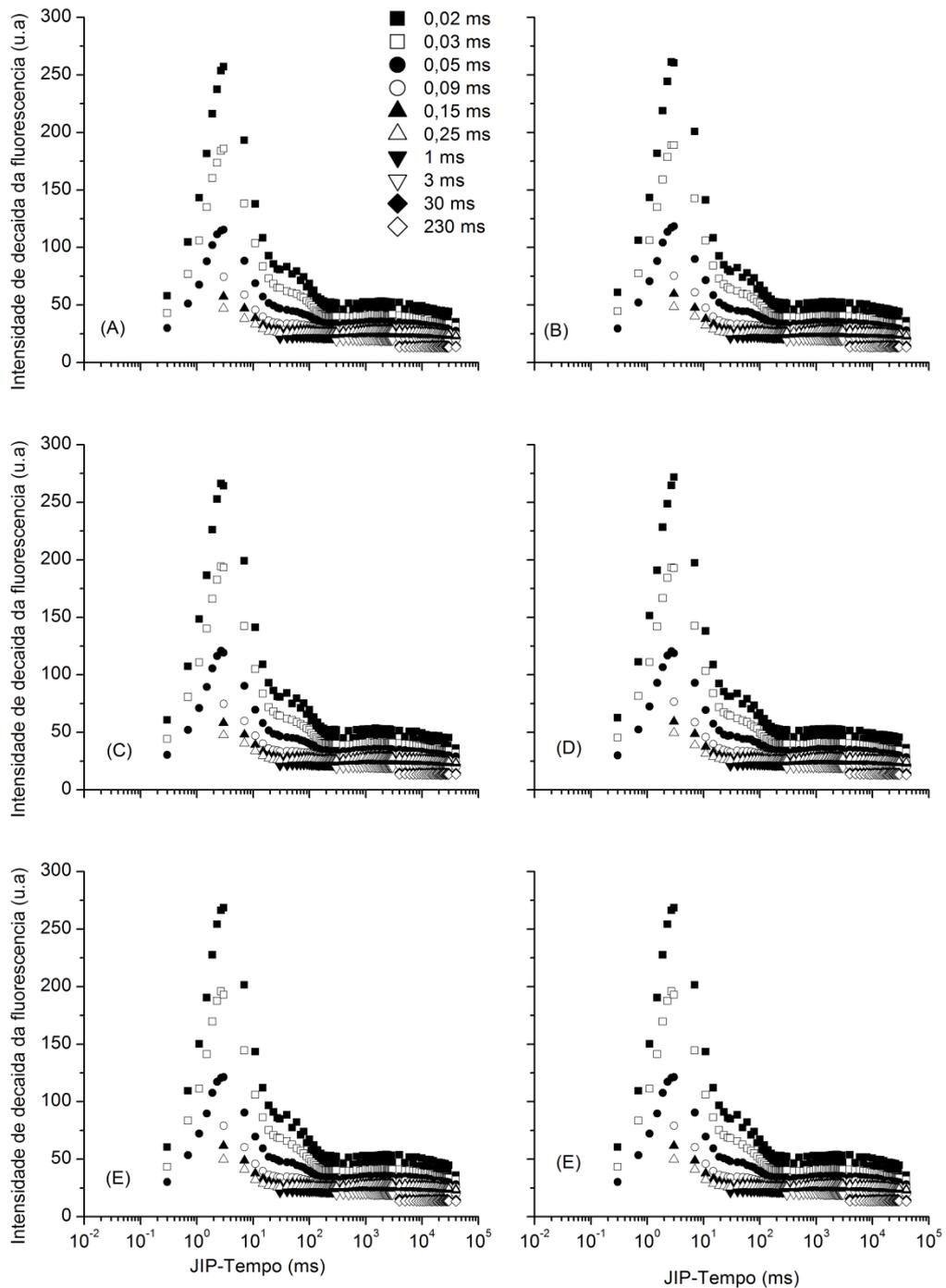


Figura 19. Cinética (curvas de indução) da decaída da fluorescência (DF) induzidas por um pulso saturante de luz actínica vermelha em folhas destacadas de ervilha e adaptadas ao escuro quando tratadas com metil viologênio. As curvas de indução de DF (DF vs JIP-tempo) foram construídas a partir da cinética de DF vs. tempo de decaída obtidas durante a interrupção da luz actínica (escuro); cada um deles representa a intensidade de DF a um certo tempo de decaída vs. JIP-tempo em que o intervalo de tempo começou. (A, 0 μ M (controle); B, 25 μ M; C, 50 μ M; D, 100 μ M; E, 250 μ M e F, 500 μ M).

Nas figuras 20A a 23A são apresentadas as curvas de DF medida no tempo de decaída de 20 μs ($DF_{20\mu\text{s}}$), a qual representa um aumento rápido até o pico I_1 (a 3 ms do JIP-Tempo) e um subsequente declínio polifásico com um ombro I_2 (a 100 ms do JIP-Tempo) e um longo platô (entre 0,5 e 10 s do JIP-Tempo) onde o I_3 está localizado a 1s. Nas figuras 20B a 23B estão representada a relação entre a decaída da fluorescência a 20 μs e a intensidade da fluorescência da clorofila ($DF_{20\mu\text{s}}/PF$), a qual expressa a taxa de re-população da clorofila excitada por absorção (Strasser et al., 2010).

Para os tratamentos com DCMU, a intensidade de $DF_{20\mu\text{s}}$ vai diminuindo com o aumento da concentração do inibidor, conseqüentemente ocorre uma redução do pico I_1 , sendo que para a concentração de 500 μM a cinética de $DF_{20\mu\text{s}}$ é praticamente desaparecida, quando comparada com o controle (Figura 20A). O tratamento das folhas de ervilha com atrazina teve o mesmo comportamento na curva de indução de $DF_{20\mu\text{s}}$ para a concentração de 500 μM (Figura 21A). A cinética de $DF_{20\mu\text{s}}$ de folhas tratadas com DBMIB não apresentou diferença em relação ao controle à medida que aumentou-se a dose do inibidor (Figura 22A). Para as folhas tratadas com metil viologênio observa-se um aumento do pico I_1 nas doses de 100 e 500 μM (Figura 23A).

As avaliações de $DF_{20\mu\text{s}}/PF$ para o tratamento das folhas com DCMU, observa-se uma queda da sua intensidade a medida que se aumenta a concentração do inibidor. Para a maior concentração (500 μM) a curva perdeu sua característica (Figura 20B). Para a mesma concentração, em folhas tratadas com atrazina, observa-se o mesmo comportamento da curva de $DF_{20\mu\text{s}}/PF$ em folhas tratadas com DCMU. Nas demais concentrações houve uma diminuição de $DF_{20\mu\text{s}}/PF$ a partir da concentração de 50 μM , quando comparada com o controle (Figura 21B).

Além desses inibidores, em folhas tratadas com DBMIB essa razão $DF_{20\mu\text{s}}/PF$ não variou na sua cinética quando comparada as diferentes concentrações utilizadas com o controle (Figura 22B). Os tratamentos com diferentes concentrações de MV, verifica-se um pequeno aumento da transiente $DF_{20\mu\text{s}}/PF$ nas concentrações de 100 e 500 μM , porém não há diferença, quando comparadas ao tratamento controle (Figura 23B).

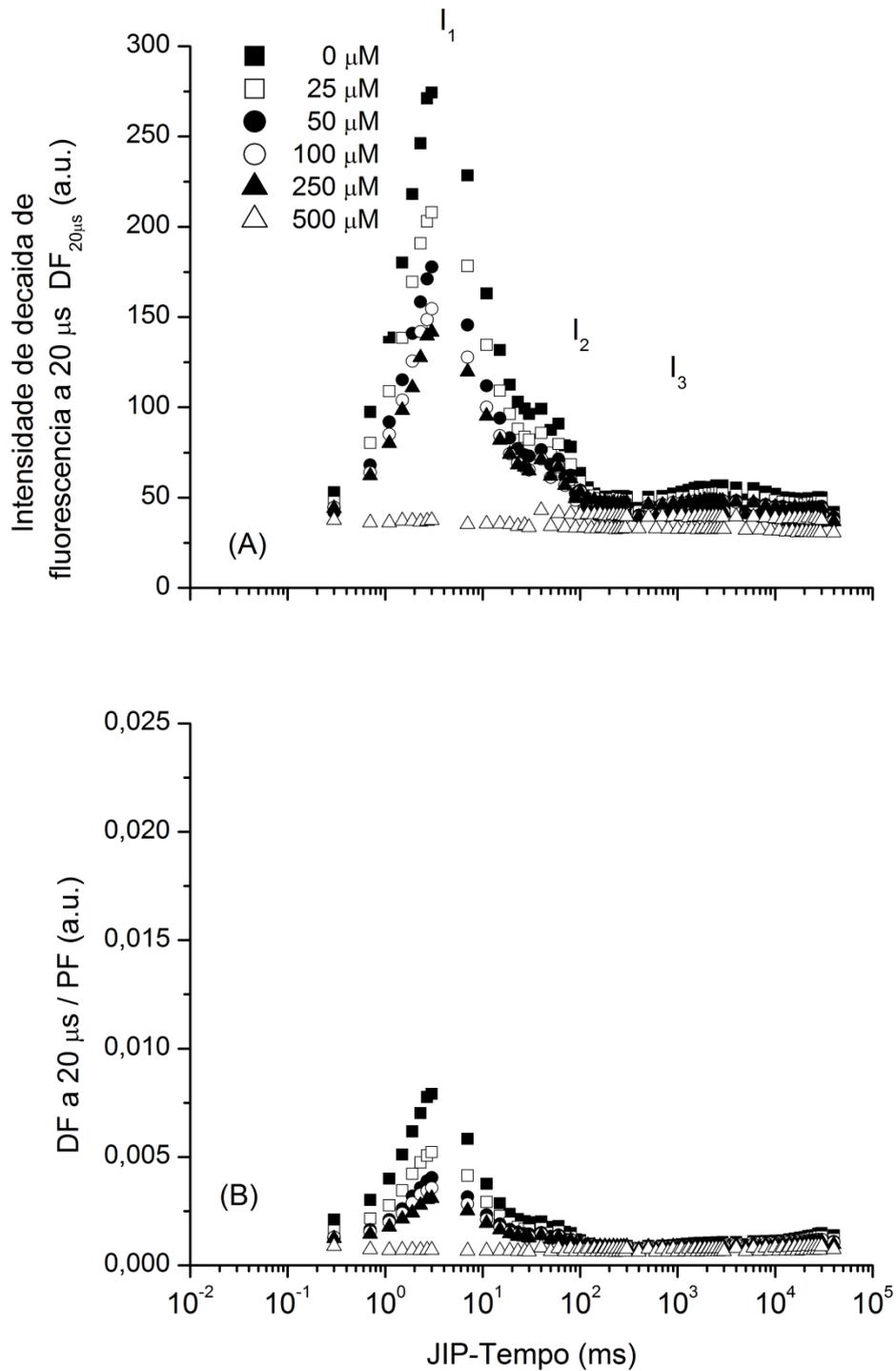


Figura 20. Intensidade da decaída da fluorescência medida a $20 \mu\text{s}$ depois da interrupção da luz actínica ($DF_{20\mu\text{s}}$) (A) e razão entre a decaída e a intensidade de fluorescência medidas no mesmo JIP-Tempo (B), em folhas destacadas de ervilhas tratadas com DCMU.

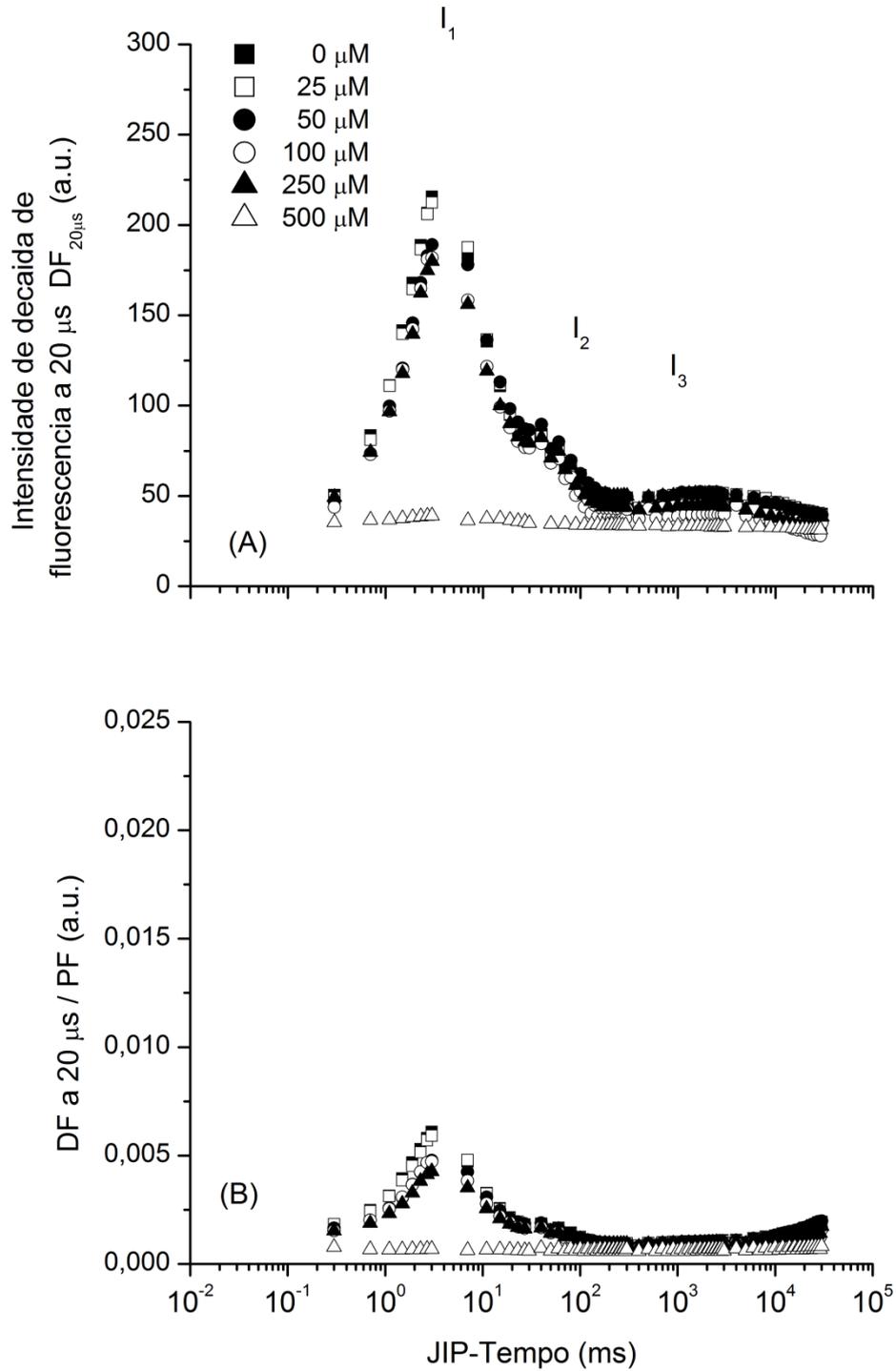


Figura 21. Intensidade da decaída da fluorescência medida a 20 μs depois da interrupção da luz actínica ($DF_{20\mu\text{s}}$) (A) e razão entre a decaída e a intensidade de fluorescência medidas no mesmo JIP-Tempo (B), em folhas destacadas de ervilhas tratadas com atrazina.

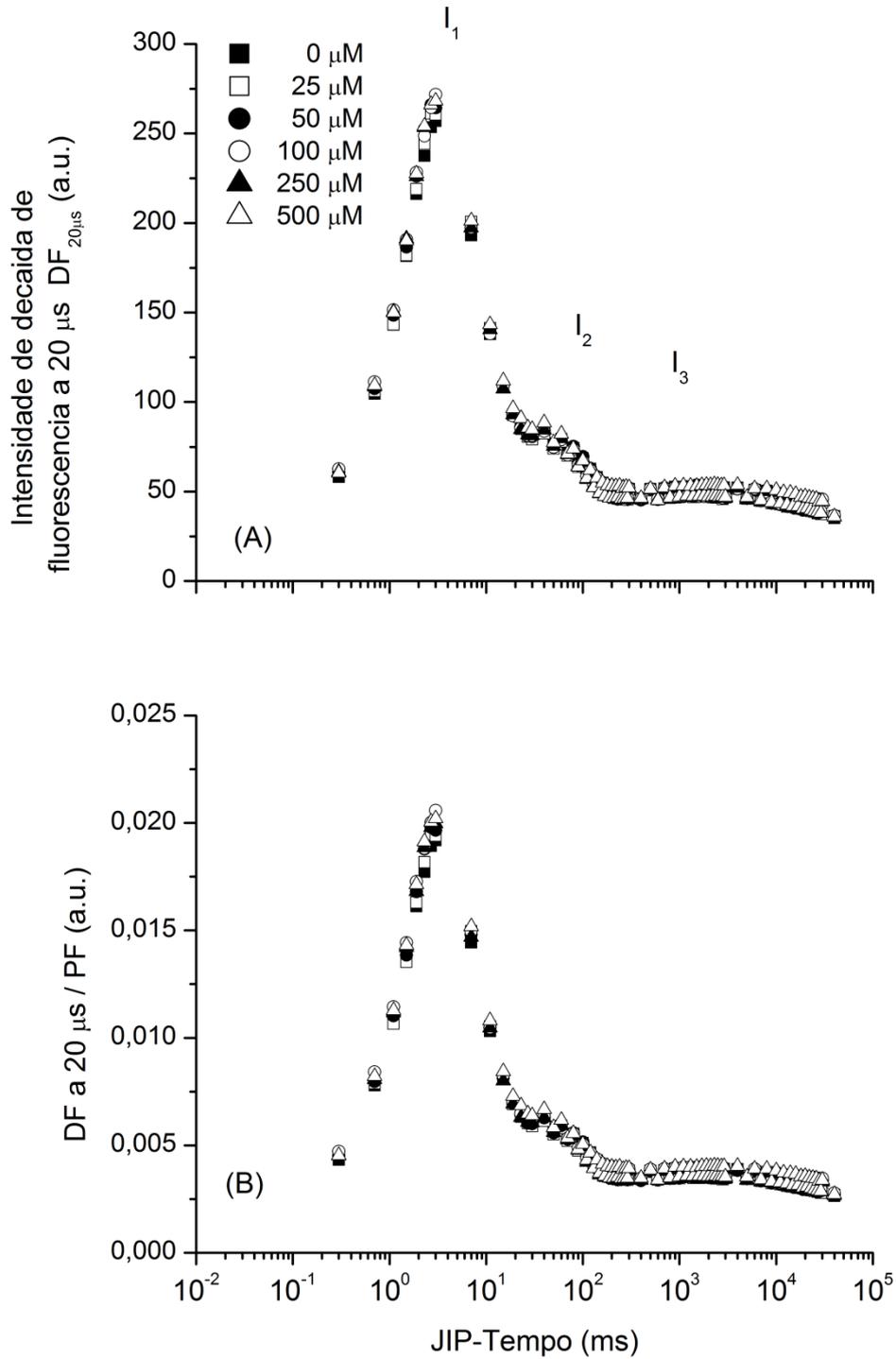


Figura 22. Intensidade da decaída da fluorescência medida a 20 μ s depois da interrupção da luz actínica ($DF_{20\mu s}$) (A) e razão entre a decaída e a intensidade de fluorescência medidas no mesmo JIP-Tempo (B), em folhas destacadas de ervilhas tratadas com DBMIB.

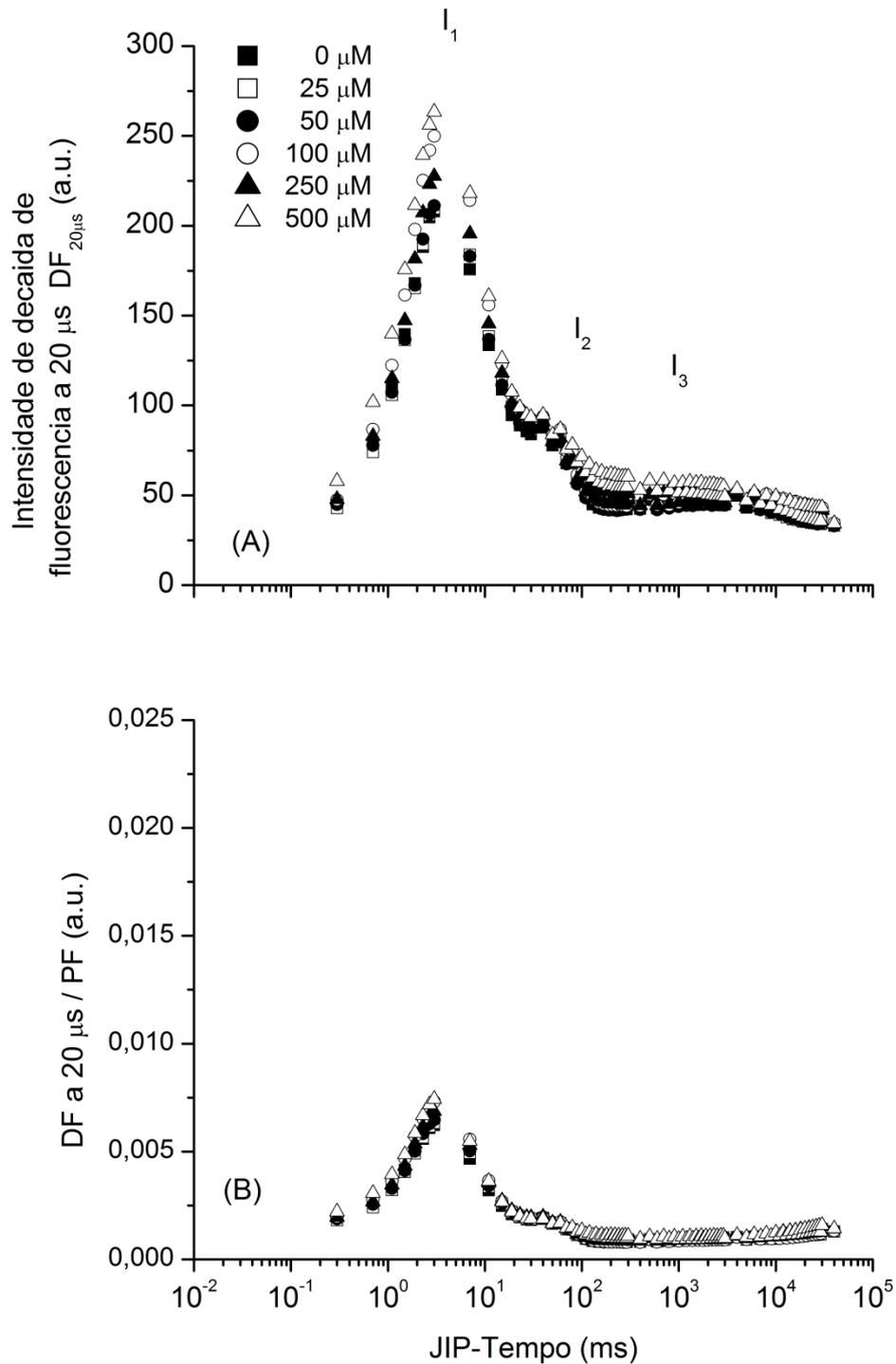


Figura 23. Intensidade da decaída da fluorescência medida a 20 μs depois da interrupção da luz actínica ($DF_{20\mu s}$) (A) e razão entre a decaída e a intensidade de fluorescência medidas no mesmo JIP-Tempo (B), em folhas destacadas de ervilhas tratadas com metil viogênio.

4. DISCUSSÃO

Muitos estudos experimentais são realizados hoje para investigar o comportamento energético do sistema fotossintético. Há um consenso em geral que em temperatura ambiente, a fluorescência da clorofila *a* de plantas, algas e cianobactérias, é emitida na região do espectro entre 680-740 nm, principalmente pelo FSII e isso pode servir como uma investigação do destino da energia de excitação (PAPAGEORGIOU et al., 2004). Assim uma análise adequada da cinética da fluorescência transiente pode fornecer informações não apenas do FSII, mas também para todo o processo fotossintético.

No presente trabalho, para estudar a curva de indução da fluorescência transiente em folhas de ervilhas utilizou-se diferentes inibidores da cadeia de transporte de elétrons, tais como DCMU, atrazina e DBMIB e também um aceptor de elétrons que atua no FSI, o metil viologênio. O DCMU é um inibidor bem conhecido por bloquear a transferência de elétrons de Q_A para Q_B (VETHUYS, 1981), pois ele compete com o sítio de ligação de Q_B na proteína D1 do FSII (OETTMEIER et al., 1983; TREBST et al., 1986). Assim sendo, uma vez que o aumento da fluorescência é principalmente relacionado ao estado redox de Q_A , o bloqueio de sua reoxidação leva para uma considerável simplificação da cinética de indução da fluorescência da clorofila (TÓTH et al., 2005).

Na presença do DCMU em amostras fotossintéticas, o passo J é observado no mesmo tempo que F_M , indicando um acúmulo de Q_A reduzido (LÁZAR et al., 2009). Esse fato foi observado em nossos resultados em que a concentração de 500 μM do DCMU em folhas de ervilha, os níveis de intensidade de fluorescência atingiu um pico único, onde os valores no passo J foram próximos aos obtidos para F_M . O mesmo foi verificado por Tóth e colaboradores (2005) em folhas de ervilhas colocadas em bandejas com a concentração de 200 μM de DCMU, mantidas por 14h de escuro completo, atribuindo a isso uma completa inibição do transporte fotossintético do lado redutor do FSII, que conseqüentemente impede a redução de NADP^+ necessária para a fixação de CO_2 (OETTMEIER, 1992). Para as outras concentrações a característica sigmoide da curva não foi tão afetada, apenas apresentou um aumento no nível J até a concentração de 250 μM de DCMU em relação ao controle, afetando parcialmente o fluxo de elétrons na cadeia fotossintética.

A atrazina é um inibidor da atividade fotossintética em plantas, a qual impede a ligação de Q_B na proteína D1 e assim impedindo o fluxo de elétrons para o FSI (HESS, 2000; CHUECA et al., 2001). Assim como a curva de indução de fluorescência de folhas tratadas com 500 μ M de DCMU, o tratamento para a mesma dose de atrazina observou-se o mesmo comportamento, explicando que esse inibidor causou também um acúmulo de Q_A reduzida, devido ao bloqueio no transporte de elétrons além de Q_A (HALDIMANN et al., 1999). Isso indica que em altas concentrações de atrazina nas folhas interfere diretamente na capacidade da planta em converter a energia luminosa absorvida em forma de energia biologicamente disponível (ATP e NADPH). Em estudos com fitoplanctons, Deblois e colaboradores (2013) verificaram o mesmo prejuízo na conversão de energia causado nos tratamentos na presença de atrazina e também um efeito significativo em cianobactérias e algas.

Segundo Trebst (2007) o DBMIB não permite a reoxidação do *pool* de plastoquinona reduzido pelo complexo $cyt_{b6/f}$. O principal efeito do DBMIB é fazer com que a fase I-P desapareça, significando que o nível I seja aproximadamente igual ao nível máximo de fluorescência, sob condições de luz saturante (SCHANSKER et al., 2005). Além disso, foi verificado por Belatik e colaboradores (2013), estudando membranas de tilacóide isolado, que ocorre uma redução na fase OJ da curva de indução de fluorescência com o aumento da concentração de DBMIB. Nesse trabalho não foi observado nenhum resultado parecido com os desses autores, uma vez que todas as fases da curva seguiram a mesma característica sigmoide para todas as concentrações de DBMIB, assim como no controle, podendo sugerir então que esse composto não agiu eficientemente na inibição da reoxidação do *pool* de plastoquinona. Devido ao mecanismo de atuação do inibidor, conforme está na literatura, se esperava uma alteração na fase J-I, já que está relacionada com a redução do intersistema da cadeia de transporte de elétrons (YUSUF et al., 2010) e conseqüentemente na fase I-P e em F_M também.

O metil viologênio é um composto que aceita elétrons a partir do FSI, não permitindo a redução da ferredoxina (SCHANSKER et al., 2005; TÓTH et al., 2007), por isso muitos autores tem estudado o efeito do metil viologênio na curva de indução de fluorescência. Munday e colaboradores (1969) observaram que célula de *Chlorella pyrenoidosa* infiltrada em solução contendo metil viologênio reduziu fortemente a amplitude da fase I-P. Shansker e colaboradores (2005), encontraram

em seus resultados que na presença de metil viologênio ocorreu uma supressão da fase I-P e não teve mudanças nas intensidades de F_M . Para os nossos resultados ocorreu apenas um aumento da fase I-P e nos valores de F_M nas concentrações de 100 e 500 μM .

Além das análises da curva de indução da fluorescência transiente, que é estudado para avaliar o comportamento do aparato fotossintético das plantas em diferentes condições, alguns parâmetros são derivados do Teste-JIP (TSIMILLI-MICHAEL et al., 2008), sendo calculados usando valores obtidos durante o aumento rápido da curva OJIP, os quais também indicam mudanças na estrutura e na funcionalidade da maquinaria fotossintética.

As folhas de ervilha tratadas com DCMU apresentaram variações em alguns parâmetros relacionados aos fluxos específicos por centro de reação (ABS/RC , Dl_0/RC , ET_0/RC RE_0/RC). As altas concentrações do inibidor fez com que aumentasse a razão ABS/RC , indicando que o fotossistema teve um aumento aparente do seu complexo antena para poder compensar a alta perda de energia na forma de calor (CHRISTEN et al., 2007). Devido a essa alta perda de energia, conseqüentemente houve uma redução na taxa de transporte de elétrons (ET_0/RC) e na redução dos aceptores finais do FSI (RE_0/RC), já que a energia que foi absorvida não foi utilizada para fotoquímica. Além disso, os parâmetros relacionados aos rendimentos, eficiências e probabilidades (ϕ_{E_0} , Ψ_{E_0} e ϕ_{R_0}), também reduziram com altas doses de DCMU, podendo afirmar que altas concentrações desse inibidor têm um eficiente mecanismo de inibição do transporte de elétrons entre Q_A e Q_B . Para reforçar essa ação, notou-se também uma redução no rendimento quântico dos processos fotoquímicos e não fotoquímicos (F_v/F_0), já que este parâmetro é relacionado com a energia que foi capturada com a energia que foi dissipada.

Para os tratamentos com concentrações de 50 e 100 μM de atrazina, houve uma redução apenas no parâmetro ET_0/RC , porém com menor intensidade que o DCMU, causando bloqueio parcial na cadeia de transporte de elétrons. Isso pode ser verificado também pela redução nos parâmetros de ϕ_{E_0} e Ψ_{E_0} e pelo um aumento na eficiência que um elétron pode mover-se dos aceptores reduzidos do intersistema para a redução dos aceptores finais do FSI (δ_{R_0}).

Tanto o índice de performance, relacionado com o potencial de conservação de energia de fótons absorvidos pelo FSII para reduzir os aceptores do intersistema (PI_{ABS}), quanto o índice de performance, envolvido com a conservação de energia

absorvida pelo FSII para a redução dos aceptores finais do FSI (PI_{total}), diminuíram com aumento das concentrações de DCMU. O mesmo foi verificado nas folhas tratadas com a concentração de 250 μ M de atrazina. A redução desses parâmetros indica uma perda na capacidade das plantas em realizar as reações fotoquímicas (THACH et al., 2007), ou seja, na eficiência de utilizar a energia absorvida pela antena para a conversão em energia na forma de ATP e NADPH. Segundo Chen e colaboradores (2011), o índice de performance (PI_{total}), que mede o desempenho até os aceptores finais do FSI, é um dos parâmetros do Teste-JIP mais sensível, isso se deve pela incorporação de vários outros parâmetros, como: ϕ_{P_0} , δ_{R_0} , Ψ_{E_0} e RC/ABS (TSIMILLI-MICHAEL et al., 2008), o que pode ser relacionado com as condições fisiológicas da planta, como o desenvolvimento e a sobrevivência em condições de estresse. Os índices de performance demonstram comportamentos mais sensíveis, do que o parâmetro relacionado com o rendimento quântico fotoquímico máximo do FSII ($\phi_{P_0}=F_v/F_M$), em plantas sob condições de estresse (OUKARROUM et al., 2007). Isso pode ser confirmado com os resultados obtidos no trabalho, pois o parâmetro F_v/F_M não sofreu nenhuma variação em relação ao controle para nenhum dos inibidores utilizados.

Além de ser considerado um inibidor da reoxidação do *pool* de plastoquinona, algumas pesquisas têm demonstrado que o DBMIB pode atuar como um doador artificial de elétrons diretamente para P_{700} oxidada (SHANSKER et al., 2005). Esse fato pode ser observado nas folhas de ervilha tratada na concentração de 500 μ M de DBMIB, pois houve um aumento nos parâmetros que estão envolvidos com a eficiência e o rendimento que um elétron move-se do intersistema e reduz os aceptores finais do FSI (RE_0/RC , ϕ_{R_0} e δ_{R_0}). Além disso, também aumentou o PI_{total} , já que esse índice de performance está envolvido com esses parâmetros.

Os tratamentos de folhas de ervilha com 500 μ M de metil viologênio, apresentaram uma redução nos parâmetros envolvidos com a redução dos aceptores finais do FSI (RE_0/RC , ϕ_{R_0} e δ_{R_0}) e conseqüentemente no PI_{total} , indicando assim que nessa concentração houve uma inibição no lado aceptor do FSI, confirmando o que Tóth e colaboradores (2007) relataram sobre o local de atuação desse inibidor.

A reflexão modulada a 820 nm tem sido recentemente estudada para avaliar a capacidade fotossintética do FSI, através de uma análise do estado redox do centro de reação P_{700} e da PC (YAN et al., 2013). Um acúmulo de P_{700} e plastocianina

oxidadas aumenta a absorvância a 820 nm, resultando em uma diminuição de MR/MR_0 (fase rápida). Subsequentemente, ocorre uma re-redução de ambos pelos carreadores de elétrons do intersistema, aumentando a razão MR/MR_0 (fase lenta) (SCHANSKER et al., 2003). Geralmente, o tempo de duração em que MR/MR_0 é mínimo (estado de transição em que as taxas de oxidação e re-redução são iguais), está na mesma faixa que a fase J-I da fluorescência transiente, enquanto que a fase lenta aparece principalmente na fase I-P da fluorescência transiente (SCHREIBER et al., 1989; SCHANSKER et al., 2003; STRASSER et al., 2010).

Em nosso trabalho isso foi observado em todos os tratamentos, porém as folhas de ervilha tratadas com a concentração de 500 μM de DCMU e atrazina, a fase de re-redução de P_{700} e PC oxidados foi perdida, indicando que houve uma inibição completa do fluxo de elétrons além de Q_A^- . Além disso, as folhas tratadas com DCMU já apresentaram uma queda na taxa de re-redução a partir da concentração mínima (25 μM), visto que na fase J-I da fluorescência transiente também já tem aumentos significativos na sua intensidade a partir dessa dose, o que não foi observado para atrazina. Tóth et al. (2005) em seu experimento com DCMU, observou o mesmo comportamento da transiente de MR/MR_0 , indicando que P_{700} e plastocianina foram oxidados e permaneceram oxidados durante uma sequência de luz vermelha e vermelho distante, pois o bloqueio de elétrons na cadeia transportadora, não permitiu a redução do *pool* de plastoquinonas, permanecendo PQ oxidada durante os diferentes pulsos de luz (SCHANSKER et al., 2005).

Os resultados da reflexão modulada a 820 nm, para as folhas tratadas com diferentes concentrações de DBMIB, não se observou nenhuma diferença na transiente de MR/MR_0 , em face deste inibidor ter a capacidade potencial de atuar como um doador de elétrons para o FSI, entretanto, a maior concentração de metil viologênio diminuiu a transiente da fase de re-redução de P_{700} e plastocianina. Em pesquisa com DBMIB realizado por Schansker (2005) e colaboradores não estão de acordo com os nossos resultados, eles observaram que folhas na presença de DBMIB permaneceram nos estado oxidado durante a sequência de pulsos de luz vermelha e vermelha distante, indicando que o DBMIB efetivamente impediu que os elétrons do FSII alcançassem a P_{700} e a plastocianina. Já os tratamentos com metil viologênio, os resultados do mesmo autor, observou-se um comportamento similar aos nossos na cinética de MR/MR_0 . De acordo com Lin et al. (2007), metil viologênio é responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio, que degrada as

proteínas do FSII. Isso pode explicar a diminuição na taxa de re-redução de P_{700} e plastocianina na concentração de 500 μM de metil viologênio, visto que o metil viologênio aceita elétrons da cadeia de transporte de elétrons na mesma taxa que o FSII esta transferindo esses elétrons para a cadeia (SHANSKER et al., 2005).

De acordo com Goltsev (2009) e colaboradores, a cinética de DF é composta por vários componentes, cada um com diferença de duração e amplitude, sendo emitida por causa do retorno da transferência de elétrons e da recombinação de carga de vários estados redox do FSII, tais como $P_{680}^+Pheo^-$, $P_{680}^+Q_A^-$, $Z^+Q_A^-$, $S_3Z^+Q_A^-Q_B$, $S_3Z^+Q_A^-Q_B^{2-}$. Na curva de indução de DF duas fases podem ser observadas: uma fase que ocorre até cerca de 300 ms, incluindo os picos I_1 (7ms) e I_2 (50ms) e uma fase lenta que pode durar até minutos (GOLTSEV et al., 2009; STRASSER et al., 2010; OUKARROUN et al., 2013).

De acordo com Goltsev et al. (2005) o pico I_1 é um resultado do aumento do gradiente elétrico transmembrana, formado pelo FSI quando P_{700} está oxidado, e do acúmulo de centros de reações com Q_B semi reduzido ($Z^+P_{680}Q_AQ_B^-$), enquanto que I_2 é relacionado com o aumento do estado $Z^+P_{680}Q_A^-Q_B^-$ durante a redução do *pool* de PQ. Esses estados tem um rendimento relativamente alto na emissão de DF. Além disso, o ponto I_2 da curva de indução de DF está provavelmente relacionado com a reabertura prolongada de P_{680} , pela transferência de elétrons acelerada pela quinona Q_B reduzida enquanto PQH_2 está sendo reoxidada pelo FSI, antes da redução completa do *pool* de plastoquinona (GOLTSEV et al., 2009; STRASSER et al., 2010; KALAJI et al., 2012).

Esse fato pode ser observado em nossos resultados, em folhas de ervilha tratadas com DCMU e atrazina. Uma vez que esses dois inibidores tem o mecanismo de bloquear a transferência de elétrons de Q_A para Q_B , isto é, na concentração de 500 μM deles foi verificado uma perda da cinética da $DF_{20\mu\text{s}}$ (primeira medida de DF confiável durante intervalos de escuro), onde os dois pico, I_1 e I_2 , também desapareceram, já que não houve a formação dos estados $Z^+P_{680}Q_AQ_B^-$ (I_1) e $Z^+P_{680}Q_A^-Q_B^-$ (I_2), que são as recombinações de carga responsáveis pela indução de DF. Além disso, pode ser justificado esse fato também nos tratamentos com DBMIB, que não houve alteração na cinética de indução de $DF_{20\mu\text{s}}$, indicando que esse inibidor não afetou a formação da recombinação de carga, mas também os tratamentos com metil viologênio, nos quais as alterações não diferiram em relação ao controle.

A razão de $DF_{20\mu s}/PF$ expressa a taxa de repopulação de clorofilas excitada por absorção. Esta razão é determinada pela concentração dos estados de emissão de luz (resultado da recombinação de carga) no momento em que a luz actínica é desligada, que por sua vez é dependente da taxa de centro de reação fechados (Q_A reduzido), ou seja, é esperado uma diminuição de $DF_{20\mu s}/PF$ à medida que diminui os centro de reação abertos (STRASSER et al., 2010). Assim como na curva de $DF_{20\mu s}$ para as folhas tratadas com DCMU e atrazina, a curva de indução de $DF_{20\mu s}/PF$ também reduziu com aumento das concentrações, desaparecendo na dose de 500 μM , indicando assim uma taxa de repopulação de clorofilas excitada muito baixa, conseqüentemente uma diminuição da recombinação de carga dos estados que emitem DF, também ocorre. Já para os tratamentos com e DBMIB não afetou essa taxa de repopulação de clorofilas excitadas não foi alterada, visto que a intensidade da curva de $DF_{20\mu s}/PF$ de folhas de ervilha tratadas com esse inibidor não mudou em relação ao controle, sendo o mesmo observado com os tratamentos com metil viologênio, onde as alterações não diferiram do controle.

5. CONCLUSÃO

A medida simultânea da fluorescência transiente da clorofila *a*, da decaída da fluorescência e a reflexão modulada a 820 nm é uma ferramenta importante para avaliações da atividade da cadeia de transporte de elétrons fotossintético. Dessa maneira, uma análise detalhada das três medidas, permite coletar e correlacionar uma série de informações sobre o efeito de diferentes inibidores de pontos específicos de toda a cadeia de transporte de elétrons fotossintético.

6. REFERÊNCIAS

BAKER, N.R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p. 89-113, 2008.

BANIULIS D.; YAMASHITA E.; ZHANG, H.; HASAN S.S.; CRAMER W.A. Structure-function of the cytochrome b₆f complex. **Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, p.1349-1358, 2008.

BELATIK, A.; JOLY, D.; HOTCHANDANI, S.; CARPENTIER, R. Re-evaluation of the side effects of cytochrome b₆f inhibitor dibromothymoquinone on photosystem II excitation and electron transfer. **Photosynthesis Research**, v. 117, p. 489-496, 2013.

BREITENBACH, J.; ZHU, C.; SANDMAN, G. Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5270-5272, 2001.

BYRDIN, M.; RIMKE, I.; SCHLODDER, E.; STEHLIK, D.; ROELOFS, T.A. Decay kinetics and quantum yields of fluorescence in photosystem I from *Synechococcus elongates* with P700 in the reduced and oxidized state: are the kinetics of excited state decay trap-limited or transfer-limited? **Biophysical Journal**, v.79, p.992-100, 2000.

CHEN, N.; ZHOU, F.; YIN, C.; STRASSER, R.J.; YANG, C.; QIANG, S. Application of fast chlorophyll *a* fluorescence kinetics to probe action target of 3-acetyl-5-isopropyltetramic acid. **Environmental and Experimental Botany**, v. 73, p. 31-41, 2011.

CHUECA, M.C.; NIEBLAS, M.O.; VILLARROYA, M.; BAUDON, J.M.G. Inducción de fluorescencia en pino. Respuesta de *Pinus halepensis* Miller, *P. nigra* Arnold y *P. pinaster* Aiton a los herbicidas hexazinona y simazina. **Investigación Agraria Sistemas y Recursos Forestable**, v. 10, p. 367-374, 2001.

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.

DEBLOIS, C.H.; DUFRESNE, K.; JUNEAU; P. Response to variable light intensity in photoacclimated algae and cyanobacteria exposed to atrazine. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 77-84, 2013.

DULAI ,S.; MOLNÁR, I.; MOLNÁR-LÁNG, M. Changes of photosynthetic parameters in wheat/barley introgression lines during salt stress. **Acta Biologica Szegdiensis**, v.55, p. 73-75, 2011.

FAN, D.-Y.; JIA, H.; BARBER, J.; CHOW, W.S. Novel effects of methyl viologen on photosystem II function in spinach leaves. **European Biophysics Journal**, v. 39, p. 191-199, 2009.

GILMORE, A.M.; ITOH, S.; GOVINDJEE. Global spectral kinetic analysis of room temperature chlorophyll a fluorescence from light harvesting antenna mutants of barley. **Philosophical Transactions of the Royal Society of Lond B**, v. 335, p. 1-14, 2000.

GOLTSEV, V.; CHERNEV, P.; ZAHARIEVA, I.; LAMBREV, P.; STRASSER, R.J. Kinetics of delayed chlorophyll a fluorescence registered in milliseconds time range. **Photosynthesis Research**, v.84, p. 209-215, 2005.

GOLTSEV, V.; ZAHARIEVA, I.; CHERNEV, P.; STRASSER, R.J. Delayed fluorescence in photosynthesis, **Photosynthesis Research**, v. 101, p. 217-232, 2009.

GOVINDJEE. Chlorophyll a fluorescence: a bit basics and history. In: PAPAGEORGIOU, G.C.; GOVINDJEE (Ed.). **Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis**. Springer, Netherlands, p.1-42, 2004.

GRABOLE, M.; DAU, H. Energetics of primary and secondary electron transfer in Photosystem II membrane particles of spinach revisited on basis of recombination-fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1708, p. 209-218, 2005.

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.

HARBINSON, J.; HEDLEY, C.L. The kinetics of P700⁺ reduction in leaves: a novel in situ probe for thylakoid functioning. **Plant Cell Environment**, v. 12, p. 357-369, 1989.

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

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station Circular**, p. 347. 1950.

HOLUB, O.; SEUFFERHELD, M.J.; GOHLKE, C.; GOVINDJEE; HEISS, G.J.; CLEGG, R. M. Fluorescence lifetime imaging microscopy of *Chlamydomonas reinhardtii*: non-photochemical quenching mutants an effect of photosynthetic inhibitors on the slow chlorophyll fluorescence transient. **Journal of Microscopy**, v. 226, p. 90, 2007.

JOLIOT, P.; JOLIOT A. Cyclic electron flow in C3 plants. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1757, p. 362-368, 2006.

JURSINIC, P. Delayed fluorescence: current concepts and status. In: GOVINDJEE; AMESZ, J.; FORK, D.J. (Ed.). Light emission by plants and bacteria. Orlando, Florida. **Academic Press**, p. 291-328, 1986.

KALAJI, H.M.; GOLTSEV, V.; BOSA, K.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; STRASSER, R.J., GOVINDJEE. Experimental in vivo measurements of light emission in plants: a perspective dedicated to David Walker. **Photosynthesis Research**, v. 114, p. 69-96, 2012.

KAUTSKY, H.; HIRSCH, A. Neue Versuche zur Kohlensaureassimilation. **Naturwissenschaft**, v. 19, p. 964, 1931.

KLUGHAMMER, C.; SCHRIBER, U. Analysis of light-induced absorbance changes in the near-infrared spectral region: I. Characterization of various components in isolated chloroplasts. **Zeitschrift Naturforschung**, v. 46c, p. 233-344, 1991.

LAWLOR, D.W. Musings about the effects of environment on photosynthesis. **Annals of Botany** v. 103, p. 543-549, 2009.

LAZÁR, D.; SCHANSKER, G. Models of chlorophyll *a* fluorescence transients. In: LAISK, A.; NEDBAL, L.; GOVINDJEE (Ed.) **Photosynthesis in silico: Understanding complexity from molecules to ecosystems**. Advances in Photosynthesis and Respiration. Springer, Dordrecht, v.29, p. 85-123, 2009.

LI, P. M.; MA, F.W. Different effects of light irradiation on the photosynthetic electron transport chain during apple tree leaf dehydration. **Plant Physiology Biochimica**, v. 55, p. 16-22, 2012.

LIN, Z.; LIU, N.; LIN, G.; PAN, X.; PENG, C. Stress-induced alteration of chlorophyll fluorescence polarization and spectrum in leaves of *Alocasia macrorrhiza*. **Journal of Fluorescence** v. 17, p. 663-669, 2007.

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

MILOSLAVINA Y.; SZZEPANIAK, M.; MULLER, M.; SANDER, J.; NOWACZYK, M.; RWGNER, M.; HOLZWARTH, A.R. Charge separation kinetics in intact Photosystem II core particles is trap-limited. A picoseconds fluorescence study. **Biochemistry**, v. 45, p. 2436-2442, 2006.

MINAGAWA, J. Fluorescence quenching analysis. In: STERN, D.; WITMAN, G. (Ed.) **The Chlamydomonas Sourcebook**, 2nd ed., v. 3, p. 2000, 2008.

MORIN, P. Études des cinétiques de fluorescence de la chlorophylle in vivo, dans les premiers instants qui suivent le début de l'illumination. **Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie**, v. 61, p. 674-680, 1964.

MUNDAY, J.C.; GOVINDJEE. Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll a in vivo; III. The dip and the peak in the fluorescence transient of *Chlorella pyrenoidosa*, **Biophysical Journal**, v.9, p. 1-21, 1969.

NELSON, N. Photosystems and global effects of oxygenic photosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, p. 856-863, 2011.

OETTMEIER, W.; SOLL, H-J. Competition between plastoquinone and 3-(3,4 dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea at the acceptor side of photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 724, p. 287-290, 1983.

OETTMEIER, W. Herbicides and photosystem II. In: BARBER, J. (Ed.). **Topics in photosynthesis**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Publishers, v.11, p. 349-408, 1992.

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.

OUKARROUM, A.; GOLTSEV, V.; STRASSER, R.J. Temperature effects on pea plants probed by simultaneous measurements of the kinetics of prompt fluorescence, delayed fluorescence and modulated 820 nm reflection. **PLoS ONE** v. 8, n.3, e59433. doi:10.1371/journal.pone.0059433. 2013.

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

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

PAPAGEORGIU, G.C.; GOVINDJEE. Photosystem II fluorescence: slow changes—scaling from the past. **Journal Photochemistry Photobiology B: Biology**, v. 104, p. 258-270, 2011.

RAPPAPORT, F.; BEAL, D.; JOLIOT, A.; JOLIOT, P. On the advantages of using green light to study fluorescence yield changes in leaves. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1767, p. 56-65, 2007.

RENGER, T. Theory of excitation energy transfer: from structure to function. **Photosynthesis Research**, v. 102, p. 471-485, 2009.

RICH, P.R.; MADGWICK, S.A.; MOSS, D.A. The interactions of duroquinol, DBMIB and NQNO with the chloroplast cytochrome bf complex. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1058, p. 312-328, 1991.

ROCHAIX, J.D. Reprint of: Regulation of photosynthetic electron transport. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, p. 878-886, 2011.

ROTTGERS, R. Comparison of different variable chlorophyll a fluorescence techniques to determine photosynthetic parameters of natural phytoplankton. **Deep-Sea Research**, v54, p. 437-45, 2007.

SCHANSKER, G.; SRIVASTAVA A.; GOVINDJEE; STRASSER, R.J. Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll a fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. **Functional Plant Biology**, v.30, p. 785-796, 2003.

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; NEUBAUER, C.; KLUGHAMMER, C. Devices and methods for room temperature fluorescence analysis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of Lond B**, v. 323, p. 241- 251, 1989.

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 Photochemistry Photobiology B: Biology**, v. 104, p. 236-257, 2011.

STIRBET, A.; GOVINDJEE. Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. **Photosynthesis Research**, v. 113, p. 15-61, 2012.

STRASSER, B.J.; STRASSER, R.J., Measuring fast fluorescence transient to address environmental questions: The JIP-test. In: MATHIS, P. (Ed.), **Photosynthesis: from light to biosphere**, Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, The Netherlands, p. 977-980, 1995.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Screening the vitality and photosynthetic activity of plants by the fluorescence transient. In: BEHL, R. K.; PUNIA, M. S.; LATHER, B. P. S. (Ed.), **Crop improvement for food security**. SSARM, Hisar, India, p. 72-115, 1999.

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

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of fluorescence transient. In: PAPAFOGIU, G.; GOVINDJEE (Ed.), **Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis**, Springer, Dordrecht, v. 19, p. 321-362, 2004.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; QIANG, S.; GOLTSEV, V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1313-1326, 2010.

STREHLER, B. and Arnold, W. Light production by green plants. **Journa of General Physiology**, v. 34, p. 809-820, 1951.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, Porto Alegre: Atmed 918p. 2013.

TANAKA, R.; TANAKA, A. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. **Annual Review Plant Biology**, v. 58, p. 321-46, 2007.

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.

TÓTH, S.Z.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R.J. In intact leaves, the maximum fluorescence level (FM) is independent of the redox state of the plastoquinone pool: A DCMU-inhibition study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1708, p. 275-282, 2005.

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.

TREBST, A.; DRABER, W. Inhibitors of photosystem II and the topology of the herbicide and Q_B-binding polypeptide in the thylakoid membrane. **Photosynthesis Research**, v. 10, p. 381-392, 1986.

TREBST A. Inhibitors in the functional dissection of the photosynthetic electron transport system. **Photosynthesis Research**, v.92, p. 217-224, 2007.

TSIMILLI-MICHAEL M.; STRASSER, R.J. *In vivo* assessment of plant's vitality: applications in detecting and evaluating the impact of mycorrhization on host plants. In: VARMA, A. (Ed.). **Mycorrhiza: State of the Art, Genetics, and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure, and Systematics**, 3rd edition Springer, Dordrecht, p. 679-703, 2008.

VELTHUYS, B.R. Electron-dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem-II. **FEBS Letters**, v. 126, p. 277-28, 1981.

- WANG, C.; XING, D.; CHEN, Q. A novel method for measuring photosynthesis using delayed fluorescence of chloroplast. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 454-459, 2004.
- WONG, P. Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. **Chemosphere**, v. 41, p. 177-182, 2000.
- YAN, K., CHEN, P.; SHAO, H.B.; SHAO, S.J.; ZANG, L.H. Photosynthetic characterization of *Jerusalem artichoke* during leaf expansion. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, p. 353-360, 2012.
- YAN, K., CHEN, P.; SHAO, H.; SHAO, S.; ZHAO, S.; BRESTIC, M. Dissection of photosynthetic electron transport process in sweet sorghum under heat stress. **PLoS ONE** v. 8, n.5, e62100, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0062100
- 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., GOVINDJEE, BAKER, N.R. 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.