

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MARIANA CARMONA PATTARO

A influência da luz azul na morfologia de plantas de alface cultivadas sob  
diferentes qualidades e intensidades de luz

Maringá

2019

MARIANA CARMONA PATTARO

A influência da luz azul na morfologia de plantas de alface cultivadas sob  
diferentes qualidades e intensidades de luz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Werner C. Antunes

Maringá

2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)**

P315i Pattaro, Mariana Carmona  
A influência da luz azul na morfologia de plantas de alface cultivadas sob diferentes qualidades e intensidades de luz. / Mariana Carmona Pattaro. -- Maringá, 2019.  
72 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador(a): Prof. Dr. Werner Camargos Antunes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal, 2019.

1. Fotomorfogênese. 2. Criptocromos. 3. Alface. I. Antunes, Werner Camargos, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal. III. Título.

CDD 21.ed. 635.04  
AHS-CRB-9/1065

## FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIANA CARMONA PATTARO

A influência da luz azul na morfologia de plantas de alface cultivadas sob diferentes qualidades e intensidades de luz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

### COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Werner Camargos Antunes  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Carlos Moacir Bonato  
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr<sup>a</sup>. Lindamir Hernandez Pastorini  
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina

Aprovada em:

Local da defesa: Anfiteatro da Pós-Graduação em Agronomia, Bloco J-45, campus da Universidade Estadual de Maringá aos 21 dias de fevereiro de 2019.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela vida, pela saúde, e por todas as conquistas alcançadas.

Aos meus pais, José Renato Pattaro e Leonice Pattaro por proporcionarem condições para que eu pudesse concluir mais essa etapa de minha vida acadêmica.

Ao meu namorado Jean Marcelo Rodrigues pelo amor, companheirismo, paciência e ajuda fornecida tanto na minha vida acadêmica como fora dela.

Ao professor Dr. Werner Camargos Antunes pela orientação, paciência, transmissão de conhecimentos e credibilidade depositadas para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, em especial Renan Falcioni e Thaise Moriwaki por toda ajuda e trocas de experiências.

Ao professor Dr. Diego Corrêa Alves pela excelente contribuição nas análises estatísticas.

A professora Dr<sup>a</sup>. Paula Toshimi Matumoto Pinto e seu orientado Fernando Anjo pela disponibilização de seu laboratório e auxílio em algumas análises.

Ao professor Dr. Luiz Antônio de Souza, pelo apoio no Laboratório de Histotécnica Vegetal, e à Central de Microscopia do COMCAP/UEM para realização das avaliações anatômicas e ultraestruturais.

Aos técnicos de laboratório e servidores da UEM, Nelson Kukubo, Sr. Gilson e Érika pelo excelente trabalho e constante ajuda.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela auxílio através do fornecimento da bolsa.

Aos Departamentos vinculados e a todos os Professores e Colegas, que de alguma forma participaram e contribuíram nesta etapa.

**OBRIGADA!!!**

## Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1	Fitocromos .....	4
2.2	Criptocromos .....	8
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1	Material vegetal e condições de crescimento.....	12
3.2	Delineamento experimental e montagem dos experimentos .....	12
3.3	Análise de crescimento .....	14
3.4	Determinação da intercepção de luz .....	14
3.5	Determinação dos teores de pigmentos foliares .....	14
3.6	Análises bioquímicas .....	15
3.6.1	Compostos fenólicos solúveis totais.....	15
3.6.2	Atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH*).....	15
3.7	Análises anatômicas.....	16
3.7.1	Microscopia eletrônica de transmissão.....	16
3.7.2	Microscopia de luz.....	17
3.8	Análises estatísticas .....	17
3.8.1	Análise multivariada.....	18
4	RESULTADOS .....	19
4.1	Análises fisiológicas e parâmetros de crescimento.....	19
4.2	Pigmentos fotossintéticos .....	27
4.3	Análises bioquímicas: antioxidantes e polifenóis .....	30
4.4	Análises anatômicas.....	30
4.4.1	Microscopia de luz da folha.....	31
4.4.2	Microscopia eletrônica de transmissão.....	34
4.5	Análise de regressão múltipla multivariada.....	41
4.6	Análise de componentes principais.....	42
5	DISCUSSÃO .....	47
5.1	Os padrões de desenvolvimento da alface são afetados tanto pela qualidade espectral bem como pela intensidade luminosa.....	47

5.2	Ação da luz azul sobre o desestiolamento .....	51
5.3	Alterações estruturais e ultraestruturais nas folhas em resposta a luz .....	59
6	CONCLUSÃO.....	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema ilustrativo do planejamento experimental. As cores representam a qualidade e os números em sequência a intensidade luminosa que as plantas foram submetidas, totalizando 18 tratamentos. .... 13
- Figura 2** – Padrão de dispersão espectral e intensidade luminosa (eixo y), dentro da região fotossinteticamente ativa, que compõem cada tratamento. Os tratamentos foram: Branco 300 (a), Branco 600 (b), Azul 300 (c), Azul 600 (d), Azul 300 + Vermelho-distante (e), Verde 300 (f), Verde 275 + Azul 25 (g), Verde 250 + Azul 50 (h), Verde 200 + Azul 100 (i), Vermelho 300 (j), Vermelho 600 (k), Vermelho 275 + Azul 25 (l), Vermelho 250 + Azul 50 (m), Vermelho 200 + Azul 100 (n) Vermelho-distante + Vermelho 300 (o), , Vermelho-distante + Vermelho 275 + Azul 25 (p), Vermelho-distante + Vermelho 250 + Azul 50 (q), Vermelho-distante + Vermelho 200 + Azul 100 (r). Os valores seguidos das cores se referem a intensidade de cada banda espectral expressas em  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Os valores foram normalizados para que o pico de maior intensidade fosse igual a 100% ou 200%. .... 15
- Figura 3** – Imagem representativa de plantas de alface cultivadas sob diferentes qualidades, intensidades e combinações de luz. As composições foram: Branco 300 (a), Branco 600 (b), Azul 300 (c), Azul 600 (d), Azul 300 + Vermelho-distante (e), Verde 300 (f), Verde 275 + Azul 25 (g), Verde 250 + Azul 50 (h), Verde 200 + Azul 100 (i), Vermelho 300 (j), Vermelho 600 (k), Vermelho 275 + Azul 25 (l), Vermelho 250 + Azul 50 (m), Vermelho 200 + Azul 100 (n) Vermelho-distante + Vermelho 300 (o), , Vermelho-distante + Vermelho 275 + Azul 25 (p), Vermelho-distante + Vermelho 250 + Azul 50 (q), Vermelho-distante + Vermelho 200 + Azul 100 (r)..... 20
- Figura 4** – Acúmulo de matéria seca (MS) total da planta (A); da folha (B); do caule (C); da raiz (D), em plantas de alface submetidas a diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz (2W; W; 2B; B; B + FR; G; G + b25; G + b50, G + b100; 2R; R; R + b25; R + b50; R + b100; FR + r; FR + r + b25; FR + r + b50; FR + r + b100, para mais detalhes das siglas ver Tabela 1. Médias seguidas de letras distintas representam diferenças estatísticas entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).  $n=5 \pm \text{SE}$ . .... 21
- Figura 5** – Parâmetros de crescimento: altura total da planta (A); comprimento do caule (B); dos entrenós (C); diâmetro do caule (D) e comprimento da raiz (E), em plantas de alface submetidas a diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4.  $n=5 \pm \text{SE}$ . .... 23
- Figura 6** – Área foliar total da planta (A); área foliar específica (B); relação comprimento / largura foliar (C) e densidade de área foliar (D), em plantas de alface submetidas a diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4.  $n=5 \pm \text{SE}$ . .... 25
- Figura 7** – Razões de área foliar total da planta (A); massa foliar (B); massa caulinar (C) e massa radicular (D), em plantas de alface submetidas a diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4.  $n=5 \pm \text{SE}$  ..... 26
- Figura 8** – Pigmentos foliares: Clorofila *a* (Chl*a*) (A), Clorofila *b* (Chl*b*) (B), Clorofilas totais (Chl*a+b*) (C), Carotenóides (carotenos e xantofilas) (D), Clorofila *a/b* (Chl *a/b*) (E) expressos por unidade de área em plantas de alface submetidas a diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4.  $n=5 \pm \text{SE}$ . .... 28
- Figura 9** – Pigmentos foliares: Clorofila *a* (Chl*a*) (A), Clorofila *b* (Chl*b*) (B), Clorofilas totais (Chl*a+b*) (C), Carotenóides (carotenos e xantofilas) (D), Clorofila *a/b* (Chl *a/b*) (E) expressos por unidade de massa em plantas de alface submetidas a diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4.  $n=5 \pm \text{SE}$ . .... 29



- Figura 10** – Fenóis totais (equivalente a mg de ácido gálico – EAG) (A) e atividade antioxidante (%SRL: sequestro de radicais livres pelo método de DPPH) (B). Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4.  $n=4\pm SE$ ..... 30
- Figura 11** – Espessura da folha (A), epiderme adaxial (B) e epiderme abaxial (C) de plantas de alface submetidas a diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4.  $n=3\pm SE$ . ..... 32
- Figura 12** – Microscopia de luz da secção transversal de folhas de alface cultivadas sob diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Os tratamentos impostos foram: Branco 300 (a), Branco 600 (b), Azul 300 (c), Azul 600 (d), Azul 300 + Vermelho-distante (e), Verde 300 (f), Verde 275 + Azul 25 (g), Verde 250 + Azul 50 (h), Verde 200 + Azul 100 (i), Vermelho 300 (j), Vermelho 600 (k), Vermelho 275 + Azul 25 (l), Vermelho 250 + Azul 50 (m), Vermelho 200 + Azul 100 (n) Vermelho-distante + Vermelho 300 (o), , Vermelho-distante + Vermelho 275 + Azul 25 (p),Vermelho-distante + Vermelho 250 + Azul 50 (q), Vermelho-distante + Vermelho 200 + Azul 100 (r). Barra de escala = 50 $\mu m$ . ..... 33
- Figura 13** – Microscopia de transmissão da parede celular de células epidérmicas da face adaxial de folhas de alface cultivadas sob diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Destaca-se na parte superior de cada imagem a camada epicuticular e abaixo a membrana plasmática. Os tratamentos impostos foram: Branco 300 (a), Branco 600 (b), Azul 300 (c), Azul 600 (d), Azul 300 + Vermelho-distante (e), Verde 300 (f), Verde 275 + Azul 25 (g), Verde 250 + Azul 50 (h), Verde 200 + Azul 100 (i), Vermelho 300 (j), Vermelho 600 (k), Vermelho 275 + Azul 25 (l), Vermelho 250 + Azul 50 (m), Vermelho 200 + Azul 100 (n) Vermelho-distante + Vermelho 300 (o), , Vermelho-distante + Vermelho 275 + Azul 25 (p),Vermelho-distante + Vermelho 250 + Azul 50 (q), Vermelho-distante + Vermelho 200 + Azul 100 (r). Barra de escala = 0,5 $\mu m$ . ..... 35
- Figura 14** – Microscopia de transmissão da parede celular de células do mesófilo de plantas de alface cultivadas sob diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Os tratamentos impostos foram: Branco 300 (a), Branco 600 (b), Azul 300 (c), Azul 600 (d), Azul 300 + Vermelho-distante (e), Verde 300 (f), Verde 275 + Azul 25 (g), Verde 250 + Azul 50 (h), Verde 200 + Azul 100 (i), Vermelho 300 (j), Vermelho 600 (k), Vermelho 275 + Azul 25 (l), Vermelho 250 + Azul 50 (m), Vermelho 200 + Azul 100 (n) Vermelho-distante + Vermelho 300 (o), , Vermelho-distante + Vermelho 275 + Azul 25 (p),Vermelho-distante + Vermelho 250 + Azul 50 (q), Vermelho-distante + Vermelho 200 + Azul 100 (r). Barra de escala = 0,5 $\mu m$ . ..... 37
- Figura 15** – Microscopia de transmissão dos cloroplastos de folhas de alface cultivadas sob diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Os tratamentos impostos foram: Branco 300 (a), Branco 600 (b), Azul 300 (c), Azul 600 (d), Azul 300 + Vermelho-distante (e), Verde 300 (f), Verde 275 + Azul 25 (g), Verde 250 + Azul 50 (h), Verde 200 + Azul 100 (i), Vermelho 300 (j), Vermelho 600 (k), Vermelho 275 + Azul 25 (l), Vermelho 250 + Azul 50 (m), Vermelho 200 + Azul 100 (n) Vermelho-distante + Vermelho 300 (o), , Vermelho-distante + Vermelho 275 + Azul 25 (p),Vermelho-distante + Vermelho 250 + Azul 50 (q), Vermelho-distante + Vermelho 200 + Azul 100 (r). Barra de escala = 1 $\mu m$ . ..... 39
- Figura 16** – Microscopia de transmissão dos cloroplastos com ênfase na organização dos tilacoides de folhas de alface cultivadas sob diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Os tratamentos impostos foram: Branco 300 (a), Branco 600 (b), Azul 300 (c), Azul 600 (d), Azul 300 + Vermelho-distante (e), Verde 300 (f), Verde 275 + Azul 25 (g), Verde 250 + Azul 50 (h), Verde 200 + Azul 100 (i), Vermelho 300 (j), Vermelho 600 (k), Vermelho 275 + Azul 25 (l), Vermelho 250 + Azul 50 (m), Vermelho 200 + Azul 100 (n) Vermelho-distante + Vermelho 300 (o), , Vermelho-distante + Vermelho 275 + Azul 25 (p),Vermelho-distante + Vermelho 250 + Azul 50 (q), Vermelho-distante + Vermelho 200 + Azul 100 (r). Barra de escala = 200nm. .... 40
- Figura 17** – Associação entre os teores de Chl $a+b$  expressas por unidade de área (eixo y) e massa (eixo x) e a relação comprimento por largura da folha (quanto maior o círculo maior a relação) de acordo com cada tratamento. B (blue; azul), G (green; verde) e R (red; vermelho). ..... 42

**Figura 18** – Escores estimados dos tratamentos em relação aos componentes principais (PCA1 e PCA2) e sua distribuição espacial. Média seguidas de letras distintas representam diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). Demais siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4.  $n=5 \pm SE$ ..... 43

**Figura 19** – Representação esquemática das possíveis respostas fotomorfológicas em relação aos tratamentos de luz empregados. A luz branca é composta por diferentes comprimentos de onda possibilitando a ativação de todos os fotorreceptores e o aumento da intensidade luminosa aumenta a ativação desses fotorreceptores promovendo desenvolvimento de plantas mais desestioladas na maior irradiância (A). As respostas biológicas desencadeadas pela luz azul resultam num conjunto de cromoproteínas CRY's ativas promovendo formação de plantas desestioladas. Aumento da intensidade do azul aumenta o grau de desestiolamento via aumento de CRY ativa. A adição de FR ocorre ativação de PHYA e promoção de algum grau de estiolamento. Sugere-se que as proteínas PHYA atuam antagonizando a atividade de CRY como mostrado no tratamento no qual houve fornecimento de vermelho-distante sobre níveis similares de azul ( $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (B). A luz verde possui mínima ativação dos fotorreceptores prevalecendo o fenótipo altamente estiolado, enquanto o fornecimento da luz azul promove a ativação e prevalência dos efeitos dos criptocromos com mínima resposta dos fitocromos e promoção do desestiolamento com baixos níveis de azul (C). Luz vermelha ocorre prevalência de PHYB e promoção de limitado grau de desestiolamento quando comparado ao verde. Enquanto no vermelho-distante tem-se um aumento de PHYA que inibe o PHYB e promoção de maior grau de estiolamento que no tratamento com vermelho puro. Após suplementação com azul há ativação do CRY mas esse é inativado pelos PHY's. A suplementação de azul sobre o vermelho promove ativação de CRY e de PHYB, no entanto existe uma ação negativa (fraca) de PHYB sobre o CRY de modo que o desestiolamento não seja completo. Em paralelo, o fornecimento de azul sobre o Vermelho e vermelho-distante os criptocromos não são eficientes para a completa inativação e reversão do fenótipo estiolado, devido a mais intensa atuação do PHYA na inibição das respostas estimuladas pelo CRY (D)..... 58

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Detalhamento da composição das qualidades, combinações e intensidades de luz fotossinteticamente ativa (PAR) referentes aos tratamentos aos quais as plantas de alface foram submetidas, além de suas e respectivas abreviações. .... 14
- Tabela 2** – Porcentagem de explicação do acúmulo de matéria seca ou da variância total por diferentes grupos de dados experimentais pelos PC1 e PC2 estimados via análise de componentes principais. .... 44
- Tabela 3** – Autovetores estimados para PC1 e PC2 das diferentes variáveis avaliadas experimentalmente de plantas de alface e reposta a variação da intensidade e qualidade de luz. .... 45
- Tabela 4** – Qualidades luminosas e o possível grau de ativação dos fotorreceptores. Mínima ativação (-); baixa ativação (+); média ativação (++); alta ativação (+++); muito alta ativação (++++). G, luz verde; G + b, luz verde acrescida de azul; R, vermelho; 2R Vermelho a  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; R + b, Vermelho acrescido de azul; FR + r, vermelho-distante com vermelho; FR + r + b, vermelho-distante com vermelho e acrescido de azul; W, luz branca; 2W, luz branca a  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; B, azul; 2B, luz branca a  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para mais detalhes dos tratamentos consulte Tabela 1. Todos os tratamentos totalizam  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , excetuando-se o 2R, 2W e 2B. .... 57

## LISTA DE ABREVIACÕES

AFE – Área foliar específica

B – Azul

2B – Azul ( $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

B + FR – Azul  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  + Vermelho-Distante

BICs – Inibidores de luz azul de criptocromos

Car – Carotenóides (carotenos e xantofilas)

CCT – Região carboxi-terminal

Chl(*a/b*) – Razão clorofila *a/b*

Chl(*a+b*) – Clorofilas totais (*a+b*)

Chl*a* – Clorofila *a*

Chl*b* – Clorofila *b*

DAF – Densidade de área foliar

DPPH – Radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EAG – Equivalentes de ácido gálico

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

FR: Vermelho-distante

FR + r – Vermelho-Distante + Vermelho ( $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

FR + r + b25 – Vermelho-Distante + Vermelho ( $275 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) + Azul ( $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

FR + r + b50 – Vermelho-Distante + Vermelho ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) + Azul ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

FR + r + b100 – Vermelho-Distante + Vermelho ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) + Azul ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

G – Verde

G + b25 – Verde ( $275 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) + Azul ( $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

G + b50 – Verde ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) + Azul ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

G + b100 – Verde ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) + Azul ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

HIR – Resposta em irradiância alta

LBL – Baixa luz azul

LFR – Resposta em fluência baixa

MS – Matéria seca

MTHF – 5,10-metilenotetrahidrofolato

R – Vermelho

2R – Vermelho ( $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )  
R + b25 – Vermelho ( $275 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) + Azul ( $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )  
R + b50 – Vermelho ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) + Azul ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )  
R + b100 – Vermelho ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) + Azul ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )  
PAR – Radiação fotossinteticamente ativa  
PCA – Análise de componentes principais  
PHR – Região homóloga a fotoliase  
PIF – Fator de Interação a Fitocromos  
Pr – Forma inativa do fitocromo  
Prf – Forma ativa do fitocromo  
RAF – Razão de área foliar  
RMC – Razão de massa caulinar  
RMF – Razão de massa foliar  
RMR – Razão de massa radicular  
SAS – Fuga da sombra  
SRL – Sequestro de radicais livres  
UV – Radiação ultravioleta  
UVA – Radiação ultravioleta A  
VLFR – Resposta em fluência muito baixa  
W – Branco ( $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )  
2W – Branco ( $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

## A influência da luz azul na morfologia de plantas de alface cultivadas sob diferentes qualidades e intensidades de luz

### RESUMO

As plantas estão constantemente submetidas às variações de luz no ambiente. Elas desenvolveram mecanismos sensoriais refinados para perceber e responder a tais variações. O amplo conjunto das respostas de desenvolvimento das plantas para as propriedades da luz são referidas como fotomorfogênese e envolve a ação de múltiplos fotorreceptores, incluindo fitocromos e criptocromos. Estes absorvem diferentes comprimentos de onda de luz para regular a expressão de genes que regulam o desenvolvimento das plantas. Atuação desses fotorreceptores nos processos de (des)estiolamento foram avaliados em plantas de alface. A manipulação da qualidade e níveis de luz pode influenciar a atividade desses fotorreceptores e, por conseguinte promover alterações morfofisiológicas nas plantas. Desse modo, testou-se a hipótese de que a presença da luz azul é necessária para as plantas desenvolverem o fenótipo desestiolado. Para tanto, plantas de alface foram cultivadas em condições controladas em duas intensidades e diversas qualidades, incluindo luz branca, azul, verde, vermelha e vermelha-distante, além de combinações, perfazendo ao todo 18 tratamentos. Avaliou-se o ganho de biomassa, comprimentos de entrenós, interceptação da luz, teores de pigmentos, alterações morfo-anatômicas das folhas e ultraestruturais do cloroplasto e da parede celular. Verificou-se que no verde há mais intenso grau de estiolamento, no entanto a suplementação do azul promove forte desestiolamento. No vermelho puro, as plantas apresentaram-se um pouco menos estioladas, mas com limitada ação do azul na estimulação do desestiolamento, e no vermelho com vermelho-distante há forte grau de estiolamento e fraca ação do azul sobre esses tratamentos. De maneira geral, as plantas submetidas as maiores intensidades de luz azul isoladamente ou em combinação se assemelharam mais ao controle. Os resultados fornecem suporte para a hipótese que a luz azul é capaz de inibir ou reduzir respostas relacionadas ao estiolamento, porém as respostas não são dependentes apenas da qualidade, mas também da intensidade de luz. Sugere-se uma interferência fraca do PHYB sobre o CRY e uma ação negativa forte de PHYA sobre as proteínas CRY.

**Palavras-chave:** Fotomorfogênese, criptocromos, fitocromos, alface.

# The influence of blue light on the morphology of lettuce plants grown under different qualities and light intensities

## ABSTRACT

Plants are constantly subjected to light variations in the environment. They have developed refined sensory mechanisms to perceive and respond to such variations. The broad set of plant development responses to light properties are referred to as photomorphogenesis and involves the action of multiple photoreceptors, including phytochromes and cryptochromes. These absorb different wavelengths of light to regulate developmental gene expression. The performance of these photoreceptors in the (de-)etiolated processes were evaluated in lettuce plants. The manipulation of quality and light levels may influence the activity of these photoreceptors and therefore promote physio-morphological changes in plants. In this way, we test the hypothesis if the presence of blue light is necessary for the plants not to develop the etiolated phenotype. For this purpose, lettuce plants were grown under controlled conditions in two intensities and several light qualities including white, blue, green, red and far-red, including combinations of light, and performing 18 treatments. The biomass gain, internodes lengths, light interception, pigment contents, morpho-anatomical changes of the leaves and ultrastructural of the chloroplast and of the cell wall were evaluated. It is shown that in the green light there is more intense etiolated phenotype, however the supplementation of the blue promotes strong de-etiolated. In the pure red, the plants shows a little less etiolated phenotype but with limited action of the blue light in the stimulation of the de-etiolated, and, in the red added by far-red there is a strong degree of etiolated phenotype and weak action of the blue light on these treatments. In general, plants submitted to the highest blue light intensities alone or in combination more closely resembled the control. The results support the hypothesis that blue light is able to inhibit or reduce etiolated responses, but the responses are not dependent only on quality but also on light intensity. We suggest a weak PHYB interference over CRY and a strong negative PHYA action on CRY proteins.

**Keywords:** Photomorphogenesis, cryptochromes, phytochromes, lettuce.

# 1 INTRODUÇÃO

As plantas apresentam a capacidade de aquisição de informações sobre seu entorno, através da percepção de sinais ambientais. Devido sua natureza sésstil, as plantas precisaram ser especialmente plásticas em seu desenvolvimento e, assim, estruturar uma ampla gama de respostas adaptativas às condições ambientais. As plantas evoluíram mecanismos sensoriais refinados para monitorar seu ambiente e iniciar respostas de crescimento e desenvolvimento apropriadas, de modo a maximizar as chances de sobrevivência e propagação em um ambiente específico. Como as plantas são organismos autotróficos e dependem da fotossíntese para sua sobrevivência, são especialmente sensíveis as alterações dos múltiplos parâmetros da luz (qualidade, quantidade, periodicidade e direção) em seu ambiente. O amplo conjunto das respostas do desenvolvimento das plantas para as propriedades da luz do ambiente são referidas como fotomorfogênese (Kami et al., 2010; Luo & Shi, 2018).

As respostas fotomorfogênicas das plantas envolvem ação de várias classes de fotorreceptores que são sensíveis a diferentes regiões do espectro de luz. As propriedades de absorção dos fotorreceptores correspondem ao espectro de luz que incide sobre elas, tipicamente abrangem o espectro que se estende do UV próximo (~ 350 nm) até o vermelho-distante (~ 750 nm). Essa é uma faixa mais ampla que o espectro fotossintético (Croce & Amerongen, 2014). Os fotorreceptores são cromoproteínas compostas por uma apoproteína ligada a uma variedade de cromóforos e os espectros de absorção característicos são determinados pelo caráter químico do cromóforo e da apoproteína (Kami et al., 2010).

As três mais estudadas classes de fotorreceptores identificados em plantas superiores são os criptocromos e fototropinas sensíveis a região do ultravioleta A (UVA) / azul (320 – 500 nm) do espectro, e os fitocromos que são os principais responsáveis pela absorção do comprimento de onda vermelho e vermelho-distante (600 – 750 nm). Esses fotorreceptores percebem e transmitem sinais do ambiente (luz) por meio de diferentes vias de sinalização intracelular para modular a expressão gênica nuclear, levando a mudanças aclimatativas nos níveis de organela, de célula e de organismos inteiros (Cope et al., 2014; Kong & Okajima, 2016; Fraser et al., 2016). A luz verde promove diversos efeitos fotomorfogênicos, porém ainda não foi identificado um fotorreceptor exclusivo à luz verde (Folta & Maruhnich, 2007; Smith et al., 2017).

Os fotorreceptores são responsáveis por regular certas respostas do desenvolvimento das plantas. Em *Arabidopsis thaliana* o fitocromo regula a germinação de sementes, o



desestiolamento, a fuga da sombra, o ciclo circadiano e a floração; o criptocromo também regula as respostas ao desestiolamento, o ciclo circadiano e a floração; a fototropina, no entanto, é a única que regula o fototropismo, o movimento dos cloroplastos e abertura estomática (Chen et al., 2004; Cope et al., 2014).

As plantas que evitam o sombreamento geralmente percebem a proximidade de plantas vizinhas usando sinais da luz ambiente por meio de fotorreceptores específicos e acionam as respostas de fuga da sombra (SAS, do inglês *shade avoidance syndrome*). A SAS é uma estratégia usada pelas plantas para melhorar seu sucesso competitivo. Ela é baseada na plasticidade morfológica onde a forma do corpo da planta é remodelada para otimizar a captura de luz. Um sinal crítico da proximidade de vegetação vizinha é a redução na intensidade dos comprimentos de onda na região do vermelho (R) e azul (B) devido à forte absorção das clorofilas das plantas vizinhas. Além disso, há um aumento da proporção de luz vermelha-distante (FR) e verde (G), resultando em uma redução nas relações R:FR e B:G. As plantas detectam essas diferenças espectrais usando os fitocromos (R:FR) e os criptocromos (B:G) levando ao aparecimento da SAS. As respostas de SAS incluem o aumento do alongamento do caule, a hiponastia das folhas, crescimento reduzido da lâmina foliar em relação ao crescimento de pecíolos, diminuição da espessura da folha, redução na quantidade de pigmentos fotossintéticos, ramificação reduzida e orientação fototrópica da parte aérea da planta em direção às lacunas no dossel (Franklin, 2008; Keller et al., 2011). Esse conjunto de características determinam o estiolamento.

Diversos estudos utilizaram lâmpadas para testar combinações específicas de comprimentos de onda de luz para elucidar seus efeitos sobre as plantas. Os estudos iniciais incluíram apenas lâmpadas vermelhas porque emitiam luz que coincide com a absorção máxima da clorofila (660 nm). No entanto, rapidamente ficou aparente que a luz azul era necessária para o crescimento e desenvolvimento “normal” (desestiolada), incluindo a prevenção de respostas de SAS. Por exemplo, as plantas de sorgo (Britz & Sager, 1990), pimenta (Brown et al., 1995) e soja (Britz & Sager, 1990) precisam de luz azul para crescerem e se desenvolverem de forma “normal” (Cope & Bugbee, 2013).

Dentro desse contexto o objetivo desse trabalho foi analisar aspectos fotomorfogênicos e anatômicos em nível estrutural e ultraestrutural, além de parâmetros de crescimento e bioquímicos em plantas de alface, em seu período vegetativo, crescidos sobre a influência de diferentes qualidades/combinções espectrais e diferentes intensidades. Testou-

se a hipótese de que a presença da luz azul é necessária para as plantas de alface não desenvolverem o fenótipo estiolado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fitocromos

O fitocromo foi a primeira cromoproteína envolvida na fotomorfogênese caracterizada. Embora o fitocromo tenha sido reconhecido apenas em 1949 como um absorvedor essencial de luz nos processos fotomorfogênicos, várias respostas morfogênicas induzidas pela luz vermelha em plantas foram bem documentadas desde 1930 (Hendricks & Van der Woude, 1983).

Em 1937, Flint e McAlister demonstraram que sementes fotoblásticas positivas de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids), cujas sementes na presença de luz (branca) tiveram a taxa de germinação e a velocidade de germinação aumentadas, apresentavam germinação máxima após serem expostas à luz vermelha (R) e que a germinação era inibida após irradiação com luz vermelho-distante (FR). Porém, os maiores avanços nos estudos referentes aos efeitos da luz sobre o desenvolvimento das plantas ocorreram a partir da década de 50, com os estudos do botânico H.A. Borthwick e do físico-químico S.B. Hendricks, que, juntamente com vários colaboradores, passaram a estudar o espectro de ação de vários fenômenos, ou seja, correlacionar os diferentes comprimentos de onda do espectro eletromagnético às respostas fotobiológicas, tais como a germinação de sementes fotoblásticas positivas, o alongamento do caule de ervilha e o controle fotoperiódico do florescimento (Labouriau, 1983).

O primeiro passo para o avanço de Borthwick e Hendricks foi identificar que o espectro de ação das três respostas fotobiológicas (germinação de sementes fotoblásticas, crescimento caulinar e controle fotoperiódico do florescimento) era o mesmo, com picos no vermelho e no vermelho-distante, levando-os à hipótese de que um único pigmento era responsável por esses três fenômenos fisiológicos estudados. Em 1952 houve a descoberta de que os efeitos da luz vermelha podiam ser revertidos pela irradiação com vermelho-distante e vice-versa, prevalecendo a resposta desencadeada pelo último comprimento ao qual as plantas ou seus propágulos foram expostos, tal fenômeno é conhecido como fotorreversibilidade (Labouriau, 1983).

Utilizando-se da característica de fotorreversibilidade das moléculas de fitocromo foi possível em 1958 a detecção de fitocromos em extratos de tecido vegetal (Butler et al., 1959). Em seguida, serviu para o isolamento do pigmento que foi realizado em 1964, o que

possibilitou purificar e caracterizar quimicamente o fitocromo que era, na verdade uma cromoproteína (Siegelman & Butler, 1965).

Desde sua descoberta, supunha-se que o fitocromo era um fotorreceptor restrito a plantas superiores. No entanto, análises realizadas nos últimos anos revelaram que fitocromos são amplamente distribuídos entre briófitas, pteridófitas, bactérias fotossintéticas e não fotossintéticas, fungos e algas (Montgomery & Lagarias, 2002; Rockwell et al., 2006).

Os fitocromos vegetais são codificados por uma pequena família de genes na maioria das espécies de plantas. Estudos mostraram a existência de cinco genes phyA (phyA à phyE) em *Arabidopsis* (Sharrock & Quail, 1989; Clack et al., 1994). De acordo com sua estabilidade na luz, fitocromos foram classificados em dois tipos, fitocromos tipo I (foto-lábil) acumulam-se em plântulas estioladas e degradam-se rapidamente com a exposição à luz, enquanto que os fitocromos do tipo II (fotoestáveis) são relativamente estáveis à luz (Abe et al., 1985; Furuya, 1989; Furuya, 1993). Em *Arabidopsis*, o fitocromo que possui a apoproteína PHYA é considerado do tipo I e todos os demais (PHYB, C, D e E) são considerados do tipo II. O PHYB é considerado o de maior abundância (Sharrock & Clack, 2002).

Os fitocromos vegetais são proteínas diméricas constituídas por duas apoproteínas idênticas ligadas à fitocromobilina que atua como um cromóforo. O cromóforo, sintetizado no plastídio, é a porção não proteica do fitocromo, responsável pela absorção da luz. A união do cromóforo com a apoproteína ocorre no citoplasma. Existem duas conformações do fitocromo, uma ativa e outra inativa, que são relativamente estáveis, espectralmente distintas e interconvertíveis. A forma inativa do fitocromo (Pr) absorve majoritariamente o comprimento de onda do vermelho (660 nm) e é convertida à forma biologicamente ativa (Pfr). A reversão para a forma inativa se dá majoritariamente pela absorção do vermelho-distante (730 nm), porém o Pfr pode converter-se espontaneamente a Pr em uma reação que não requer luz (reversão no escuro). A capacidade de um determinado fitocromo absorver a luz vermelha e vermelho-distante resulta da fotoisomerização reversível na ligação dupla C15-C16 da fitocromobilina em resposta aos comprimentos de onda do vermelho e vermelho-distante (Abe et al., 1985; Kendrick & Kronenberg, 1986; Roig-Villanova & Martínez-García, 2016).

Em *Arabidopsis*, os cinco fitocromos acumulam-se no citoplasma no escuro e uma fração das moléculas translocam-se para o núcleo sob influência da luz (Nagy & Schafer, 2002). A importação nuclear só ocorre após ocorrer a alteração conformacional de Pr a Pfr. PHYA transloca-se para o núcleo em FR, enquanto todos os quatro fitocromos se acumulam no núcleo em R ou luz branca (Kircher et al., 2002). Assim, a forma Pfr interage com outras

proteínas no citosol ou no interior do núcleo e regula suas funções para desencadear as respostas a luz (Kircher et al., 2002; Nagy & Schafer, 2002).

Os fitocromos podem agir de três diferentes modos, de acordo com a quantidade (fluência) e a duração da luz requerida para induzir respostas na planta. São subdivididas em respostas em fluência muito baixa (VLFR), respostas em fluência baixa (LFR) e respostas em irradiância alta (HIR). As VLFRs e HIRs são mediadas por PHYA, entretanto, LFR é mediado por PHYB, e em muitos casos por outros fitocromos diferentes de PHYA (Shinomura et al., 2000; Casal et al., 2003).

As VLFRs não são reversíveis e são sensíveis a um amplo espectro de luz entre 300 nm e 780 nm. A forma inativa do fitocromo (Pr) também é capaz de absorver um pouco de luz FR e tornar-se ativa (Pfr), portanto mesmo em condições saturantes de luz FR ainda haverá até 3% de Pfr, sendo uma concentração superior aos 0,02% necessários para induzir VLFR, o que culmina com a ausência da clássica característica de reversão por FR. As LFRs são as respostas “clássicas” do fitocromo com reversibilidade de R:FR. Por fim, as HIRs não são fotorreversíveis, requerem iluminação intermitente prolongada ou de alta frequência. São chamadas assim por não serem proporcionais à fluência e sim à irradiância, ao contrário das demais (Nagy & Schafer, 2002; Casal et al., 2003).

Os fitocromos possuem uma importância ecológica singular na interpretação dos sinais trazidos pela luz ambiente. O fitocromo permite que a planta responda a quantidade de luz fotossinteticamente ativa por meio da alteração da razão R:FR. A alteração mais significativa em R:FR ocorre quando a luz do dia é refletida e/ou transmitida pela vegetação viva. Os tecidos verdes absorvem preferencialmente os comprimentos de onda no vermelho e azul por meio das clorofilas e carotenoides resultando no enriquecimento das regiões menos absorvidas do espectro, verde e vermelho-distante. No entanto, mesmo não sendo detectável pela visão humana, o maior enriquecimento ocorre em comprimentos de onda FR, acarretando uma redução da relação R:FR e essa redução fornece um “alerta” da presença e proximidade de vegetações vizinhas, permitindo o início de estratégias de desenvolvimento aclimatativo para tolerar ou evitar a sombra da vegetação antes do fechamento do dossel (Fraser et al., 2016; Franklin, 2008; Casal, 2013).

Sob o dossel de uma vegetação ou plantas muito próximas umas das outras, a competição entre os indivíduos determina o estabelecimento e a sobrevivência das espécies. Algumas espécies de sub-bosque, desenvolveram estratégias de tolerância à sombra que permitem que elas sobrevivam e se reproduzam com baixos níveis de luz, como as plantas

orelha-de-elefante (*Alocasia macrorrhiza*), que apresentam adaptações nas estruturas fotossintéticas para otimizar a eficiência em baixas intensidades de luz. Estes incluem folhas mais finas e maior teor de clorofila por unidade de massa (Franklin, 2008).

Outras espécies competem pela luz usando uma estratégia de fuga denominada “evitação” da sombra (SAS). Os fenótipos de SAS mais notáveis em plantas sujeitas a baixos R:FR (isto é, alta densidade da vegetação) são um rápido crescimento de caules e alongamento de pecíolo e uma reorientação ascendente das folhas (hiponastia foliar – resposta contrária a epinastia) (Fraser et al., 2016; Roig-Villanova & Martínez-García, 2016; Franklin, 2008). Em *A. thaliana*, as mudanças no comprimento do hipocótilo podem ser notadas em 45 minutos (Cole et al., 2011). Respostas adicionais ao baixo R:FR frequentemente incluem redução da área foliar, folhas com conteúdo reduzido de clorofila e aumento da dominância apical. Se a relação R:FR persiste e a planta é incapaz de ultrapassar a vegetação competidora, ocorre ramificação reduzida e o florescimento é acelerado, promovendo assim o estabelecimento de sementes e aumentando a probabilidade de sucesso reprodutivo (Franklin, 2008; Fraser et al., 2016).

O PHYB desempenha um papel dominante na inibição das respostas de SAS. A alta razão R:FR estabelece um aumento na proporção de PHYB ativa, que é translocada para o núcleo onde se liga aos *Fatores de Interação a Fitocromos* (PIFs). Assim, em condições de baixo R:FR leva a conversão de Pfr para Pr, liberando a supressão PIF para permitir sua estabilização, acumulação e promoção de alongamento de haste por ligação a uma ampla gama de genes alvo (Casal et al., 2003; Fraser et al., 2016).

As respostas das plantas a R:FR envolvem mudanças no status da sinalização hormonal, visto que, várias características da SAS, tais como aumento do crescimento do caule, hiponastia foliar e dominância apical, são características dos altos níveis de auxina. A baixa relação R:FR causado por vegetações vizinhas reduz PHYB ativo. Os PIFs são então liberados da ligação de PHYB e da fosforilação induzida por PHYB, permitindo que eles se liguem e ativem genes de síntese de auxina para promover o crescimento do caule. Ligado a esse caminho, há conexões com a rota de estimulação para diversos outros fitormônios, tais como: giberelinas, citocininas e brassinosteróides. Essa ampla capacidade evolutiva de percepção das plantas está relacionada ao ambiente complexo que as plantas enfrentam para completarem seu ciclo (Casal et al., 2003).

## 2.2 Criptocromos

Inicialmente o termo criptocromo foi designado para os receptores de luz azul nas plantas com espectros de ação que compreendiam dois picos, um na região da luz ultravioleta A (320 – 400 nm), e outro na região do azul (400 – 500 nm). Era assim chamado devido sua natureza críptica e a prevalência das respostas em plantas criptógamas (antigo termo taxonômico usado para referir-se a plantas que não produzem flores, sementes e frutos, incluindo samambaia, musgo, algas e fungos) (Russo et al., 1985; Whitelam, 1995; Briggs & Huala, 1999).

Estudos realizados com mutantes fotomorfogênicos indicaram que as respostas à luz azul são mediadas por fotorreceptores diferentes. Os mutantes *hy4* e *blu 1, 2 e 3* de *Arabidopsis* apresentam comprometimento do alongamento do hipocótilo, mas mantêm curvatura fototrópica em resposta à luz azul direcional. Por outro lado, os mutantes de *Arabidopsis jk218* e *jk224* são defeituosos no fototropismo, mas mantêm a inibição do alongamento do hipocótilo dependente de luz azul. Essas observações permitiram concluir que existem fotorreceptores separados para a percepção do sinal de luz azul direcional e não-direcional (Quail, 1994). Portanto, uma única nomenclatura de criptocromo não seria adequada, pois abrangeria todos os receptores de luz azul (Lin & Shalitin, 2003; Yang et al., 2017).

Apesar do fato da maioria dos estudos que levaram à descoberta dos criptocromos serem referentes ao fototropismo, descobriu-se que os fotorreceptores responsáveis por esse fenômeno na verdade era outra classe de fotorreceptores, assim um nome diferente, fototropinas, teve que ser inventado para estes receptores de luz azul (Lin & Shalitin, 2003). Os maiores avanços para a descoberta dos criptocromos só ocorreu em 1993 quando Cashmore e seu grupo de pesquisa isolaram o primeiro criptocromo em *Arabidopsis* (Ahmad & Cashmore, 1993). Usando a marcação genética, esses pesquisadores clonaram o locus *hy4* de *Arabidopsis* e notaram que a proteína codificada (posteriormente denominada de CRY1) possuía alta similaridade com as fotoliasas do DNA de procariotos, uma classe de flavoproteínas que catalisam o reparo do DNA dependente da luz azul, sugerindo assim que HY4/CRY1 seria um possível fotorreceptor de luz azul que medeia a inibição do alongamento de hipocótilo sob luz azul não-direcional em *Arabidopsis* (Quail, 1994; Whitelam, 1995; Ahmad & Cashmore, 1996; Briggs & Huala, 1999).

Em testes posteriores foi possível descobrir que mesmo a homologia entre CRY1 e as fotoliasas ser tão alta quanto a homologia das fotoliasas entre si, os produtos do gene *cry1* não

exibiam atividade de fotoliase. Além disso, sua superexpressão e a perda da função dos alelos *cry1* resultou em alterações na sensibilidade à luz ultravioleta A (UVA) e azul, e em menor extensão à luz verde, tanto em plantas de tabaco transgênicas como em plantas de *Arabidopsis*, apoiando a hipótese de que o CRY1 é um fotorreceptor que responde seletivamente a esses comprimentos de onda (Lin et al., 1995, 1996).

A descoberta de um segundo criptocromo em *Arabidopsis*, denominado criptocromo 2 ou CRY2, solidificou a nomenclatura do termo criptocromo ser referente aos receptores de luz azul semelhantes às fotoliasas (Hoffman et al., 1996; Briggs & Huala, 1999; Lin & Shalitin, 2003). Os criptocromos de *Arabidopsis* CRY1 e CRY2 possuem funções fisiológicas conhecidas, mas um terceiro membro da família, CRY3, permanece com suas funções incertas, porque um mutante *cry3* com inserção de T-DNA não apresentou nenhuma alteração fenotípica óbvia quando cultivado sob várias condições de luz visível ou UV. No entanto, CRY3 foi detectado em mitocôndrias e cloroplastos, apresentando atividade bioquímica na reparação de danos causados por luz UV ao genoma dessas organelas (Yu et al., 2010; Liu et al., 2016).

Análises genéticas com os mutantes *Arabidopsis cry1* e *cry2* revelam que a proteína nuclear CRY1 é responsável pela inibição do alongamento do hipocótilo sob altas intensidades de luz azul e o CRY1 que se localiza no citosol medeia a estimulação da expansão do cotilédone e alongamento da raiz (Wu & Spalding, 2007). Diferente do CRY1, que é estável, o CRY2 é imediatamente degradado sob condições de luz azul, semelhante aos fitocromos, para os quais PHYA, mas não os outros fitocromos, sofre rápida degradação na luz vermelha. O CRY2 é localizado exclusivamente no núcleo, ocorrendo tanto sua fosforilação quanto sua degradação neste compartimento celular. O CRY2 atua na indução floral, a inibição do alongamento do hipocótilo em condições de baixas intensidades de luz azul e parece antagonizar a função do CRY1 na regulação do alongamento da célula radicular (Yu et al., 2007).

Tanto o CRY1 como o CRY2 funcionam como dímeros em células vegetais com monômeros que consistem em dois domínios principais, o domínio N-terminal PHR (Região homóloga à fotoliase) e o carboxi-terminal (CCT). Os criptocromos de *Arabidopsis*, como as fotoliasas, ligam-se a dois cromóforos: FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e um derivado de pterina, o 5,10-metilenotetrahidrofolato (MTHF). O FAD é ligado não covalentemente dentro da região PHR (~ 500 aminoácidos) e funciona como o sensor primário de luz, enquanto o papel do MTHF é coletar e transferir energia luminosa adicional para o cromóforo FAD da



região do ultravioleta A (Hoang et al., 2008; Liu et al., 2016). Enquanto a fotossensibilização é mediada pelo domínio PHR, o CCT (~ 100 – 200 aminoácidos) é importante para a sinalização criptocromática, porque as mutações neste domínio muitas vezes prejudicam a função dos criptocromos mutantes (Ahmad & Cashmore, 1993; Yang et al. 2000; Yu et al., 2010; Liu et al., 2016).

Os criptocromos fotoexcitados são fosforilados para adotar uma conformação aberta, tornando-se ativos e ligando-se a outras proteínas sinalizadoras para alterar a expressão gênica, e conseqüentemente, os programas metabólicos e de desenvolvimento das plantas (Yu et al., 2010; Liu et al., 2016). A importância dessa classe de fotorreceptores é ampla. Abrangendo desde o processo de desestiolamento, em que ocorre a transição de uma plântula cultivada no escuro que vive de suas reservas da semente para uma plântula fotoautotroficamente competente, incluindo respostas de inibição do crescimento do hipocótilo, promoção da expansão do cotilédone e síntese de um número de pigmentos incluindo clorofilas e antocianinas. E também atuando nos estádios mais avançados do desenvolvimento, tendo profunda importância para a indução de floração dependente de fotoperíodo, alongamento radicular, biossíntese de fitormônios e sincronização do ciclo circadiano. Além disso, possui importante papel ecológico, pois paralelamente à diminuição da razão de R:FR, as plantas sombreadas também percebem uma redução de ultravioleta A (UVA) e luz azul (B) e um enriquecimento de luz verde (G). A luz verde tem mostrado inativar parcialmente a sinalização criptocromática exacerbando ainda mais as respostas de SAS (Chen et al., 2004; Fraser et al., 2016).

A atenuação da luz azul é percebida por CRY1 e CRY2 em plantas juvenis, com CRY1 adotando um papel dominante em plantas adultas. No entanto, trabalhos mais recentes mostram que é possível a ação de PIF na cascata de sinalização dos criptocromos (Pedmale et al., 2016). Os fatores de transcrição PIF são necessários para as respostas de evitação da sombra mediadas por fitocromos, mas PIF4 e PIF5 estão envolvidos tanto na baixa razão R:FR como na resposta à baixa luz azul (Keller et al., 2011; Pedmale et al., 2016). Curiosamente, PHY e CRY ligam-se a sítios diferentes dos PIFs (Pedmale et al., 2016), sugerindo que diferentes complexos fotorreceptores de PIF se formam dependendo do regime de luz. Outro ponto de elevada relevância é que as respostas de SAS mediada por fitocromos e PIFs são causadas pela regulação positiva da biossíntese de auxina e pela redistribuição de auxina (Li et al., 2012). No entanto, a SAS induzida por CRY e PIF4 / PIF5 parece ser amplamente regulada pela modificação da parede celular, com a auxina ainda desempenhando

seu papel (Pedmale et al., 2016; Fankhauser & Batschauer, 2016). Trabalhos realizados com inibidores de transporte de auxina que bloqueiam o alongamento induzido por baixa R:FR não bloqueiam completamente o alongamento do hipocótilo em resposta ao LBL (baixa luz azul), indicando que as respostas de crescimento de R:FR e LBL podem ser mediadas por mecanismos separados. Assim, PHY's e CRY's usam estratégias diferentes para atingir o mesmo objetivo (Fankhauser & Batschauer, 2016).

Os fitocromos e criptocromos são evolutivamente adaptados para co-atuar em plantas expostas à comprimentos de onda mistos. Os fitocromos podem interagir diretamente com os criptocromos para coordenar as respostas a luz vermelha / vermelha-distante e a luz azul. E também, fitocromos e criptocromos podem interagir com o comum parceiros de sinalização para coordenar suas ações, como é o caso dos PIFs. Além desses mecanismos, foi descoberto que os fitocromos e criptocromos medeiam a indução da expressão dos genes não apenas necessários à fotomorfogênese, mas também dos genes BICs (inibidores de luz azul de criptocromos). As proteínas BICs interagem com criptocromos fotoexcitados para suprimir todas as reações fotoquímicas presentemente conhecidas de criptocromos (Wang et al., 2016). Os genes BICs são induzidos pela luz em um modo independente do comprimento de onda, mas mutações de criptocromos ou fitocromos prejudicam o acúmulo de mRNA BIC em resposta à luz azul ou luz vermelha / vermelho-distante, respectivamente. Estes resultados argumentam que o circuito de feedback negativo do CRY-BIC é controlado não apenas por criptocromos, mas também por fitocromos (Wang et al., 2018).

Portanto, diferentes qualidades espectrais que ativam seletivamente diferentes fotorreceptores ativam um conjunto de genes sobrepostos no qual estão associados a uma profusa regulação transcricional e pós-transcricional, indicando a presença de vários pontos de contato (*crosstalk*) nesta complexa rede de interações no qual desencadeiam respostas fenotípicas, bioquímicas e estruturais nas plantas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal. Algumas análises foram executadas nos laboratórios de Histotécnica Vegetal e Complexo de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-Paraná, Brasil.

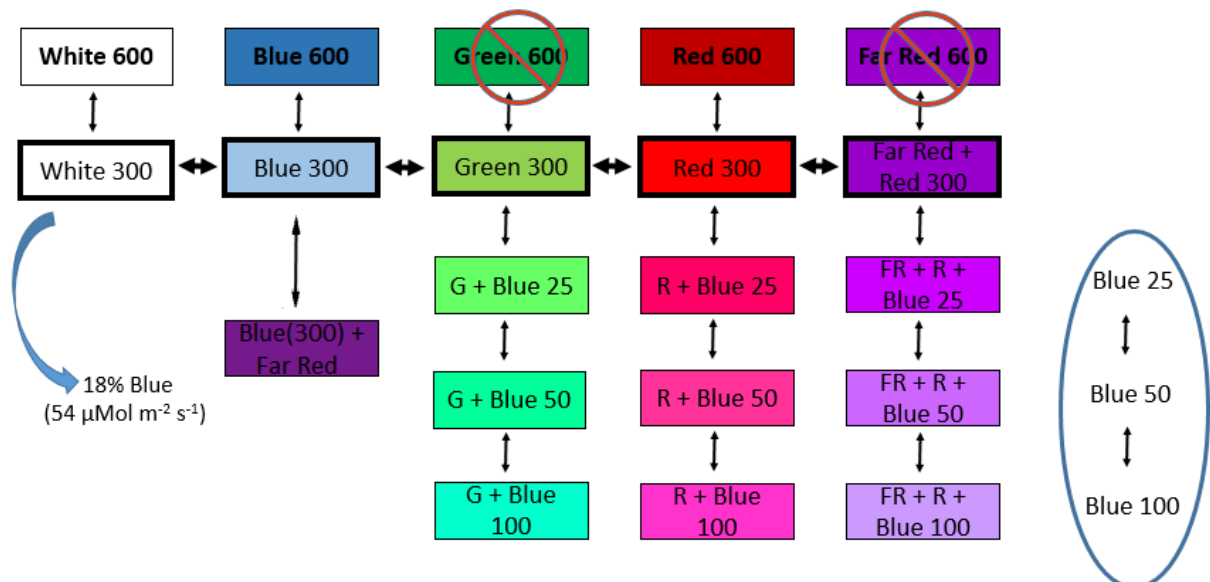
#### 3.1 Material vegetal e condições de crescimento

Foram utilizadas plantas de alface (*Lactuca sativa* L., var. Elisa), em que mudas foram adquiridas no comércio local da cidade e cultivadas no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal na Universidade Estadual de Maringá. Plantas com 4 folhas expandidas foram selecionadas, pela uniformidade, sanidade e vigor, e transplantadas em potes de 250 mL, contendo mistura de substrato comercial com solo (Nitossolo vermelho de textura argilosa) em proporção de 2:1. O cultivo foi realizado em caixas de MDF de coloração branca. Inicialmente foram inseridas 9 plantas por caixa/tratamento e, 7 dias após o transplante, 4 plantas foram removidas devido à falta de espaço e utilizadas para análises de antioxidantes e fenólicos totais. As 5 plantas restantes permaneceram sob o efeito dos tratamentos de luz até o dia da coleta final (15º dia) e utilizadas para as demais análises. As condições de crescimento foram ajustadas a 24°C com fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro). Todas as plantas eram frequentemente irrigadas conforme a necessidade e fornecido solução nutritiva de Hoagland completa (pH 5,3) a cada 2 dias. As plantas foram mantidas sob diferentes qualidades e intensidades de luz (18 tratamentos/combinções) descritos no Tabela 1. Desde a imposição dos tratamentos as plantas foram rotacionadas em suas respectivas caixas para evitar favorecimento ou desfavorecimento de alguma planta em específico. As coletas foram realizadas 15 dias após a imposição dos tratamentos.

#### 3.2 Delineamento experimental e montagem dos experimentos

Os diversos tratamentos foram determinados com base em experimentos prévios onde foram cultivadas plantas de alface sob a influência de LEDs brancos, azuis, verdes, vermelhos e vermelhos-distantes em  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Observou-se que apenas as plantas cultivadas nos LEDs brancos e azuis não apresentaram fenótipo estiolado. A partir desta

observação averiguou-se que os LEDs brancos utilizados possuíam 18% de azul, ou seja,  $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  do total dos  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  impostos na condição de cultivo. Deste modo, decidiu-se testar a metade ( $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), o valor ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e o dobro ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) do valor de azul encontrado nos LEDs brancos. Além disso, testou-se uma maior intensidade para averiguar se seria meramente um efeito de qualidade e/ou intensidade. Os tratamentos de maior intensidade ( $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ficaram incompletos devido a estrutura (caixas de MDF) não comportar o número de LEDs necessários para atingir tal intensidade no tratamento vermelho-distante (Far-red 600), e devido à um número insuficiente de LEDs verdes (Green 600), pois possuem elevado custo. A maneira como o experimento foi planejado se encontra na figura 1.



**Figura 1** – Esquema ilustrativo do planejamento experimental. As cores representam a qualidade e os números em sequência a intensidade luminosa que as plantas foram submetidas, totalizando 18 tratamentos.

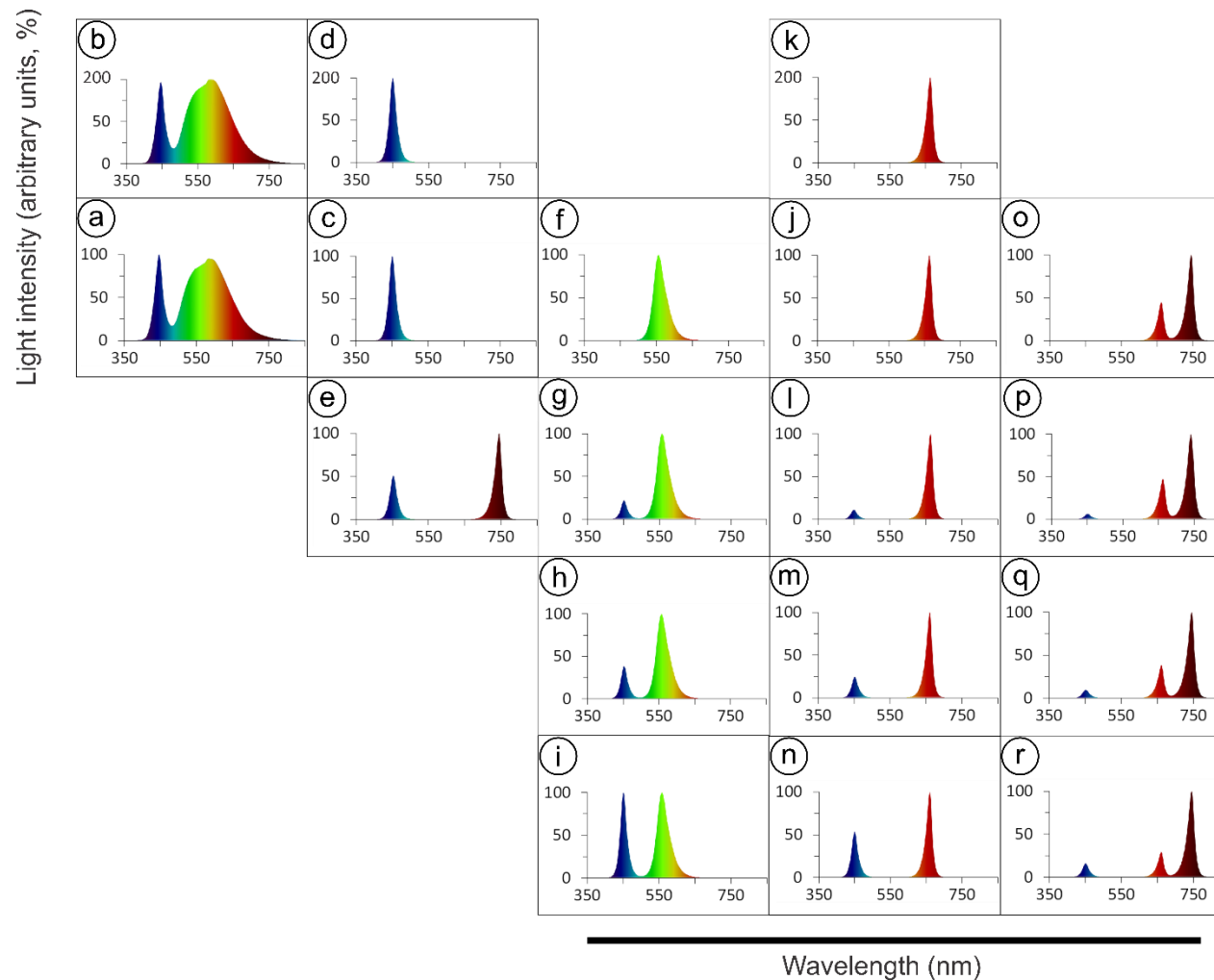
O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC). Os tratamentos com diferentes irradiâncias (intensidade de luz) foram realizados utilizando LEDs (diodos emissores de luz) monocromáticos de alta eficiência (Figura 1). A intensidade de cada tratamento foi ajustada isoladamente através de um sensor quantum (sensor PAR, LI-190R, LiCor, Nebraska, USA) e acoplado a um medidor portátil que monitora com precisão ( $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a radiação fotossinteticamente ativa (400 – 700 nm). As medições foram realizadas na altura da copa e ajustadas para as intensidades de  $300$  e  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Nos tratamentos que possuem luzes vermelho-distante, como o sensor não permite sua medição,

todas as luzes dessa qualidade foram ajustadas em sua potência máxima e depois ajustados as demais luzes que compunha o tratamento. A qualidade dos LEDs foi monitorada com auxílio de um espectroradiômetro (ADS Inc; FieldSpec 3 Jr., Colorado, USA). As diversas qualidades espectrais estudadas foram melhores explanadas na Tabela 1 e na Figura 2. Usando-se os dados do espectroradiômetro e com base na área do pico de emissividade de cada banda espectral foi possível determinar que a relação R:FR foi de 0,33 no tratamento FR + r.

**Tabela 1** – Detalhamento da composição das qualidades, combinações e intensidades de luz fotossinteticamente ativa (PAR) referentes aos tratamentos aos quais as plantas de alface

<b>Abreviações</b>	<b>Tratamentos (<math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}</math>)</b>	<b>PAR final (<math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}</math>)</b>
W (a)	Branco (300)	300
2W (b)	Branco (600)	600
B (c)	Azul (300)	300
2B (d)	Azul (600)	600
B + FR (e)	Azul (300) + Vermelho-Distante	300
G (f)	Verde (300)	300
G + b25 (g)	Verde (275) + Azul (25)	300
G + b50 (h)	Verde (250) + Azul (50)	300
G + b100 (i)	Verde (200) + Azul (100)	300
R (j)	Vermelho (300)	300
2R (k)	Vermelho (600)	600
R + b25 (l)	Vermelho (275) + Azul (25)	300
R + b50 (m)	Vermelho (250) + Azul (50)	300
R + b100 (n)	Vermelho (200) + Azul (100)	300
FR + r (o)	Vermelho-Distante + Vermelho (300)	300
FR + r + b25 (p)	Vermelho-Distante + Vermelho (275) + Azul (25)	300
FR + r + b50 (q)	Vermelho-Distante + Vermelho (250) + Azul (50)	300
FR + r + b100 (r)	Vermelho-Distante + Vermelho (200) + Azul (100)	300

foram submetidas, além de suas e respectivas abreviações.



**Figura 2** – Padrão de dispersão espectral e intensidade luminosa (eixo y), dentro da região fotossinteticamente ativa, que compõem cada tratamento. Os tratamentos foram: Branco 300 (a), Branco 600 (b), Azul 300 (c), Azul 600 (d), Azul 300 + Vermelho-distante (e), Verde 300 (f), Verde 275 + Azul 25 (g), Verde 250 + Azul 50 (h), Verde 200 + Azul 100 (i), Vermelho 300 (j), Vermelho 600 (k), Vermelho 275 + Azul 25 (l), Vermelho 250 + Azul 50 (m), Vermelho 200 + Azul 100 (n) Vermelho-distante + Vermelho 300 (o), , Vermelho-distante + Vermelho 275 + Azul 25 (p),Vermelho-distante + Vermelho 250 + Azul 50 (q), Vermelho-distante + Vermelho 200 + Azul 100 (r). Os valores seguidos das cores se referem a intensidade de cada banda espectral expressas em  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Os valores foram normalizados para que o pico de maior intensidade fosse igual a 100% ou 200%.

### **3.3 Análise de crescimento**

Avaliou-se os parâmetros de crescimento na fase vegetativa da planta. Foram coletadas 5 plantas por tratamento na última coleta (15° dia após imposição dos tratamentos), devido à realização de análises destrutivas para a determinação desses parâmetros. Para obtenção da área foliar, comprimento e largura das folhas, todas as folhas foram removidas e então escaneadas com o auxílio do scanner (HP Scanjet 300, California, USA, 300 dpi) e as imagens digitalizadas foram analisadas com o auxílio do software Image-Pro Plus® 4.5. Foi quantificada a matéria seca das raízes, caule, folhas, e total da planta pela soma das frações anteriores, além da medição do diâmetro do caule e comprimento do caule e da maior raiz. Para obtenção da matéria seca as frações foram colocadas em estufa de ventilação forçada, a temperatura de 70°C até peso constante e quantificadas em balança digital analítica. Os parâmetros de crescimento e fisiológicos foram estimados segundo método descrito por Hoffmann & Poorter, 2002 e Silva et al., 2013.

### **3.4 Determinação da intercepção de luz**

Calculou-se a densidade volumétrica do dossel, considerando a parte aérea da planta com projeção de um cilindro, calculado pela fórmula,  $V_{cilindro} = \pi r^2 h$ , considerando o raio (r) como o comprimento da maior folha e (h) altura do caule, compondo a densidade de área foliar pela relação da área por volume ( $\text{cm}^2$  folha /  $\text{cm}^3$  de planta).

### **3.5 Determinação dos teores de pigmentos foliares**

Para a quantificação dos teores de clorofilas e carotenóides totais foram utilizadas folhas totalmente expandidas do terço intermediário. A partir dessas folhas foram obtidos segmentos de 4  $\text{cm}^2$  do limbo, exceto para o tratamento que continha apenas luz verde, no qual foram necessários 8  $\text{cm}^2$ , pois o baixo teor de pigmentos nas plantas resultou em amostras muito diluídas comparados aos demais tratamentos. A extração foi realizada imediatamente após a coleta dos segmentos, com imersão, no escuro e em temperatura ambiente, por aproximadamente 18 – 20 horas em solução de acetona 80% saturada com  $\text{CaCO}_3$ . Para leitura do espectro de absorção (400 a 700 nm) dos pigmentos foliares extraídos

utilizou-se espectrofotômetro Lambda 1050 UV/VIS/NIR (PerkinElmer, Inc., Waltham, Massachusetts, USA). As concentrações de clorofilas e carotenoides foram estimadas, segundo equações matemáticas descritas por Lichtenthaler (1987) selecionando os comprimentos de onda de 470, 647 e 663 nm. Segmentos similares aos usados para extração dos pigmentos foram coletados, colocados em estufa a 70°C e quantificados em termos de matéria seca para avaliação e expressão dos dados com base em massa.

### **3.6 Análises bioquímicas**

Para a determinação dos fenóis totais (polifenóis solúveis) e da atividade antioxidante (DPPH; sequestro de radicais livres) foram coletadas 4 plantas por tratamento 7 dias após serem transplantadas. Os extratos vegetais para ambas análises foram realizados em duplicatas. Para isso, foram triturados 0,5 g de folhas frescas em 5 mL de metanol 80% (v/v) e posteriormente centrifugados a 15.000 rpm durante 60 segundos. O sobrenadante foi usado nas análises.

#### **3.6.1 Compostos fenólicos solúveis totais**

A determinação dos fenóis solúveis totais foi realizada conforme Ragae et al. (2006), com modificações. A concentração do mix de reagentes para quantificação foram 1M de Folin- Ciocalteu reagente fenol (Sigma-Aldrich; F9252), 3.56M de Carbonato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e água quando necessário para diluição. A reação iniciou com a adição de 170  $\mu\text{L}$  do extrato metanólico, 85  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu, 170  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e 830  $\mu\text{L}$  de água deionizada. As amostras ficaram no escuro por 40 minutos e, posteriormente realizou-se a centrifugação por 90 segundos a 15.000 rpm antes da leitura em espectrofotômetro em  $\lambda 725$  nm. Foi determinado a concentração dos polifenóis equivalente à curva padrão à concentração de ácido gálico,  $Y = 87.651x + 1.6515$ ;  $R^2 = 0.993$ .

#### **3.6.2 Atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH<sup>\*</sup>)**

Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método sequestrador de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) descrito por Ragae et al. (2006), com



pequenas modificações. Foi utilizada a solução de DPPH na concentração de 1mM. A reação iniciou com a adição de 100 µL do extrato metanólico, 1,5 ml da solução de DPPH e 500 µL de metanol 100%. As amostras foram agitadas e mantidas no escuro por 40 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em  $\lambda$ 515 nm. As absorbâncias obtidas foram usadas para o cálculo da capacidade dos extratos de alface em eliminar os radicais livres DPPH.

A atividade antioxidante foi calculada pela equação:

$$\% \text{ atividade antioxidante} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Abs sol. DPPH}}{\text{Abs amostras}} \right) \right] \times 100$$

Onde: Abs sol. DPPH: Absorbância da solução de DPPH;

Abs amostras: Absorbância das amostras após 40 minutos.

### **3.7 Análises anatômicas**

#### **3.7.1 Microscopia eletrônica de transmissão**

Realizou-se análises da ultraestrutura dos cloroplastos, dos tilacóides, da epiderme e parede celular das células parenquimáticas das plantas de alface. Para tanto, secções de limbo de 2 mm<sup>2</sup> da 5<sup>a</sup> ou 6<sup>a</sup> folha (a contagem das folhas foi feita de baixo para cima, excluindo as folhas cotiledonares), totalmente expandidas e desenvolvidas sob as condições dos respectivos tratamentos foram coletadas na última avaliação (15<sup>o</sup> dia) e fixadas em solução de Karnovsky modificada contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,05 M (Karnovsky, 1965). Em seguida foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M. Após a fixação os seguimentos de limbo foram contrastados (*in bloc*) com acetato de uranila 0,5% overnight. Procedeu-se a desidratação das amostras utilizando-se séries com concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%; 3x), e posterior infiltração e inclusão em resina Spurr. As amostras foram transferidas para moldes específicos para polimerização da resina, em estufa de temperatura controlada (65 - 70°C) por 72 horas. Foram realizados cortes semi-finos (1,5 µm de espessura) e ultrafinos (70 nm de espessura) em ultramicrótomo (MTX Powertome X, Boeckeler Instruments RMC Products) utilizando navalha de vidro e diamante (Diamond Knife), respectivamente. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963), lavados com água deionizada e finalmente observados no microscópio eletrônico de

transmissão (JEOL JEM-1400, Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA) equipado com uma câmera digital, a 80 kV disponível no Complexo de Apoio à Pesquisa (COMCAP). As imagens digitais obtidas foram analisadas de forma qualitativa. Todos os reagentes usados eram grau microscopia eletrônica de alto padrão Sigma Aldrich (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA) ou EMS (Electron Microscopy Science, Industry Road Hatfield, Pennsylvania, USA).

### **3.7.2 Microscopia de luz**

Para avaliação das características anatômicas foram utilizados os cortes semi-finos (1,5 nm de espessura) obtidos no ultramicrotomo utilizando a navalha de vidro. Os cortes semi-finos foram coletados e depositados em lâminas de vidro. Para o processo de coloração foi depositado o corante azul de toluidina em tampão Bórax sobre os cortes e, posteriormente foi realizada a secagem em placa aquecedora sem deixar entrar em ebulição a solução, formando um anel de coloração verde ao redor da gota de corante depositada. Após a secagem, as lâminas foram lavadas abundantemente em água destilada. As imagens digitais foram obtidas em microscópio Leica ICC50 (Leica Company, Wetzlar, DEU) acoplado a um computador com o software Leica Application Suite<sup>®</sup>. As medidas foram realizadas com auxílio do software Image-Pro-Plus<sup>®</sup> v.4.5 e calibrados com uso de lâmina de referência de medição.

### **3.8 Análises estatísticas**

Os dados obtidos dos respectivos tratamentos foram submetidos às análises estatísticas ANOVA *One-Way* para média entre tratamentos. Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em comparação múltiplas e entre os efeitos da qualidade da luz e intensidade foram analisados utilizando o teste estatístico de Scott-Knott, processado no software Sisvar 5.6, que têm por objetivo separar as médias de tratamentos, em grupos homogêneos, pela minimização da variação dentro, e maximização entre grupos. Os gráficos foram elaborados com auxílio do software Sigma Plot 10.0<sup>®</sup> (Systat, San Jose, California, USA).

### **3.8.1 Análise multivariada**

#### **3.8.1.1 Análise de regressão múltipla multivariada**

As variáveis dependentes (relação comprimento pela largura foliar; clorofila por área; clorofila por matéria seca) foram testadas simultaneamente em relação as variáveis independentes (qualidades de luz: vermelho; azul; verde; vermelho-distante; vermelho + azul; verde + azul; vermelho-distante + azul). Para o processamento dos dados foi utilizado o software RStudio 1.0.153. O modelo utilizado foi:  $Y_i = B + G + R + FR + B*G + B*R + B*FR + e_i$ .

#### **3.8.1.2 Análise de componentes principais (PCA)**

Procedeu-se a análise de componentes principais (PCA) de modo a reduzir a dimensionalidade dos dados e propiciar ao conjunto de variáveis auto-correlacionadas análises mais estáveis e que pudesse discriminar a real influência das variáveis. Buscou-se no conjunto de variáveis qual é a contribuição individual para a explicação do ganho de matéria seca total das plantas. Utilizou-se a rotina do software STATISTICA 10<sup>®</sup> (Statsoft, Tulsa, California, USA) em dados brutos e não transformados. Utilizaram-se os dados primários da análise de crescimento coletados ao 15<sup>o</sup> dia após imposição dos tratamentos, dados derivados da análise de crescimento (após algum procedimento matemático como relações), dados de concentração de pigmentos e dados anatômicos para processar a análise multivariada. Não se procedeu a rotação de vetores. Usaram-se apenas os dois primeiros componentes principais para as demais caracterizações derivadas da PCA. Com o uso dos autovetores (correlação linear entre uma variável com um componente principal) e autovalores (quadrado do autovetor) foi possível derivar estatisticamente qual a magnitude de explicação de uma variável particular (ou grupos) para o crescimento das plantas. Os dados dos escores estimados pelo componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2) foram submetidos a MANOVA Bifatorial e, se significativo pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), foram então submetidos comparação de média pelo teste de Scott-Knott, sendo considerado significativo a uma probabilidade de erro inferior a 5%.

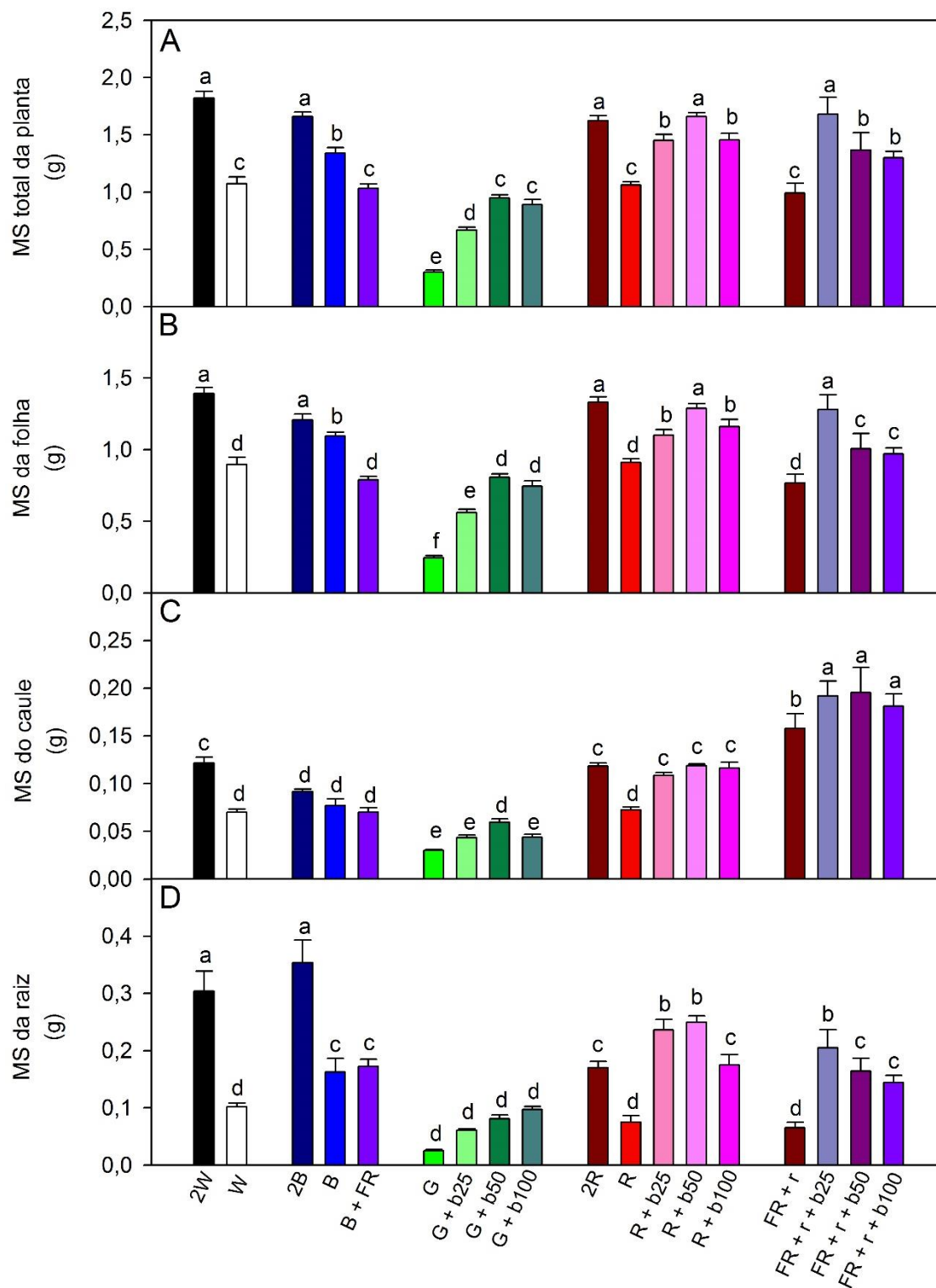
## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Análises fisiológicas e parâmetros de crescimento**

A partir análise das plantas de alface cultivadas sob influência de diferentes qualidades, intensidades e combinações de luzes, identificou-se um padrão de crescimento bastante diferenciado entre os tratamentos com cores puras e suas combinações com luz azul, mostrando que a luz azul é um estímulo ambiental necessário para o desenvolvimento desestiolado de plantas de alface (Figura 3). As diferenças morfológicas observadas pela presença de luz azul, em geral, foram mais evidentes quando suplementadas nos tratamentos com a luz verde em relação à aquelas cultivadas com a luz vermelha.



**Figura 3** – Imagem representativa de plantas de alface cultivadas sob diferentes qualidades, intensidades e combinações de luz. As composições foram: Branco 300 (a), Branco 600 (b), Azul 300 (c), Azul 600 (d), Azul 300 + Vermelho-distante (e), Verde 300 (f), Verde 275 + Azul 25 (g), Verde 250 + Azul 50 (h), Verde 200 + Azul 100 (i), Vermelho 300 (j), Vermelho 600 (k), Vermelho 275 + Azul 25 (l), Vermelho 250 + Azul 50 (m), Vermelho 200 + Azul 100 (n) Vermelho-distante + Vermelho 300 (o), , Vermelho-distante + Vermelho 275 + Azul 25 (p), Vermelho-distante + Vermelho 250 + Azul 50 (q), Vermelho-distante + Vermelho 200 + Azul 100 (r).



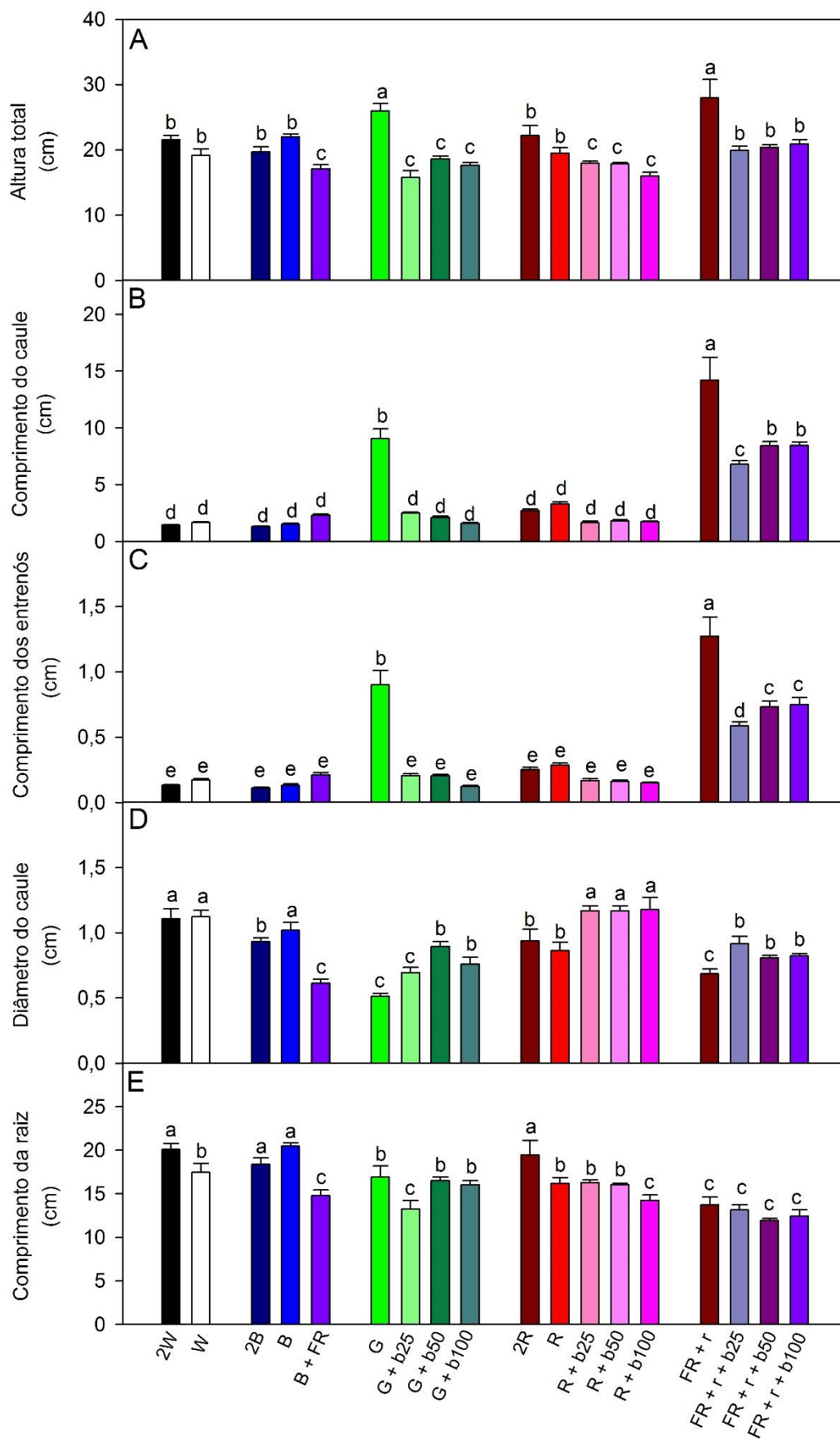
**Figura 4** – Acúmulo de matéria seca (MS) total da planta (A); da folha (B); do caule (C); da raiz (D), em plantas de alface submetidas a diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz (2W; W; 2B; B; B + FR; G; G + b25; G + b50; G + b100; 2R; R; R + b25; R + b50; R + b100; FR + r; FR + r + b25; FR + r + b50; FR + r + b100, para mais detalhes das siglas ver Tabela 1. Médias seguidas de letras distintas representam diferenças estatísticas entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).  $n=5 \pm SE$ .

De maneira geral, as plantas submetidas as maiores intensidades de azul isoladamente ou em combinação se assemelharam mais ao controle (branco a  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) no qual exibiram reversão do fenótipo estiolado (plantas crescidas em luz verde ou vermelho-distante; sem azul). Destaca-se que a luz branca é composta de 18% de azul (correspondente de 440 a 485 nm), perfazendo o equivalente a  $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  do total dos  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  impostos na condição de cultivo.

Após 15 dias de tratamento, os efeitos promovidos pela luz e as combinações testadas induziram diferenças significativas quanto ao acúmulo de matéria seca (MS) total (Figura 4A), da folha (Figura 4B), do caule (Figura 4C), da raiz (Figura 4D), comprimento do caule (Figura 5B) e dos entrenós (Figura 5C) ( $p \leq 0,05$ ). Contudo, outras variáveis como altura total (Figura 5A), diâmetro do caule e comprimento da raiz (Figuras 5D e 5E) não tiveram alterações muito expressivas ( $p \geq 0,05$ ), excetuando-se o G e o FR + r.

O maior acúmulo de MS total e de folhas ( $p \leq 0,05$ ) ocorreu nos tratamentos de maior intensidade (2W, 2B e 2R) e da qualidade na presença de azul (R + b50; FR + r + b25), enquanto que a luz G apresentou redução de aproximadamente 70% em ambos (Figura 4A e 4B). Em geral observou-se aumento na MS do caule (Figura 4C) e da raiz (Figura 4D) nos tratamentos que continham combinação com luz azul (vermelho e/ou vermelho-distante), com incrementos em média de 170,86%, para caule nos tratamentos com vermelho-distante, e de 246,18% na MS da raiz ( $p \leq 0,05$ ) no tratamento com azul puro na maior intensidade (2B), respectivamente. Ressalta-se que a presença de luz azul foi capaz de propiciar um ambiente mais adequado ao ganho de MS das plantas (Figura 4) comparado às suas respectivas cores puras submetidos a mesmo PAR.

No tratamento G, o comprimento do caule (Figura 5B) e entrenós (Figura 5C) aumenta em 443,15% e 419,08% respectivamente, em relação ao controle (W). Porém, as combinações de G + b resultaram na reversão desse alongamento, se equiparando ao controle ( $p \geq 0,05$ ) (Figuras 5B e 5C). Por outro lado, no tratamento FR + r o comprimento do caule e entrenós apresentaram um aumento de 753,12% e 633,31% respectivamente, em relação ao controle. Neste caso, as combinações com azul reduziram o alongamento, mas não houve respostas de reversão fenotípica semelhantes a aquelas demonstradas no controle ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 5C).



**Figura 5** – Parâmetros de crescimento: altura total da planta (A); comprimento do caule (B); dos entrenós (C); diâmetro do caule (D) e comprimento da raiz (E), em plantas de alface submetidas a diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4.  $n=5 \pm SE$ .

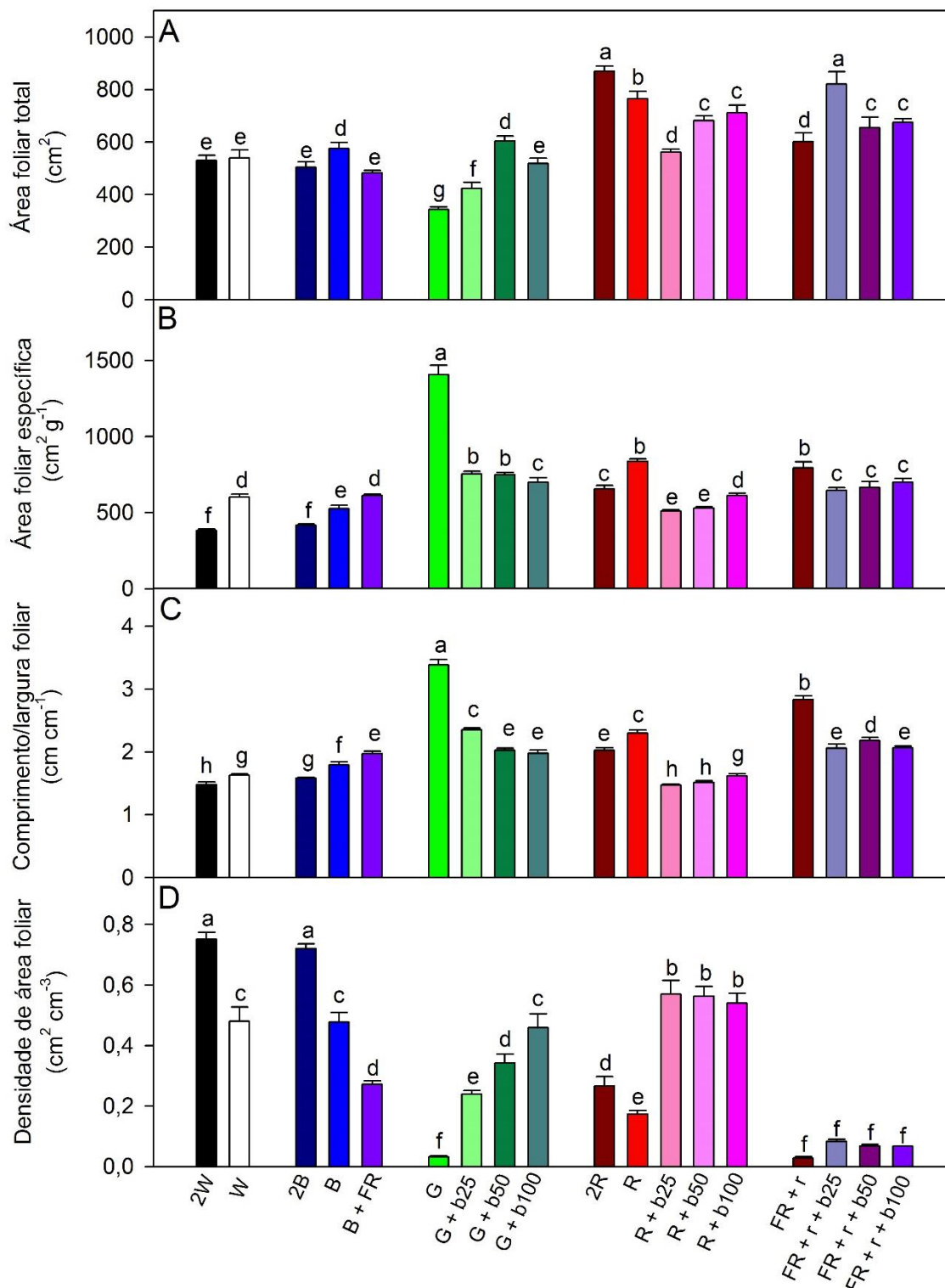


Observaram-se alterações significativas ( $p \leq 0,05$ ) principalmente nos tratamentos G, R e FR + r na relação comprimento / largura foliar e área foliar específica (AFE) (Figura 6B e C). Essas variáveis reduziram com o incremento de luz azul. No entanto, a área foliar total não apresentou um padrão sistemático de resposta em relação as intensidades, qualidades e combinações de luz (Figura 6A).

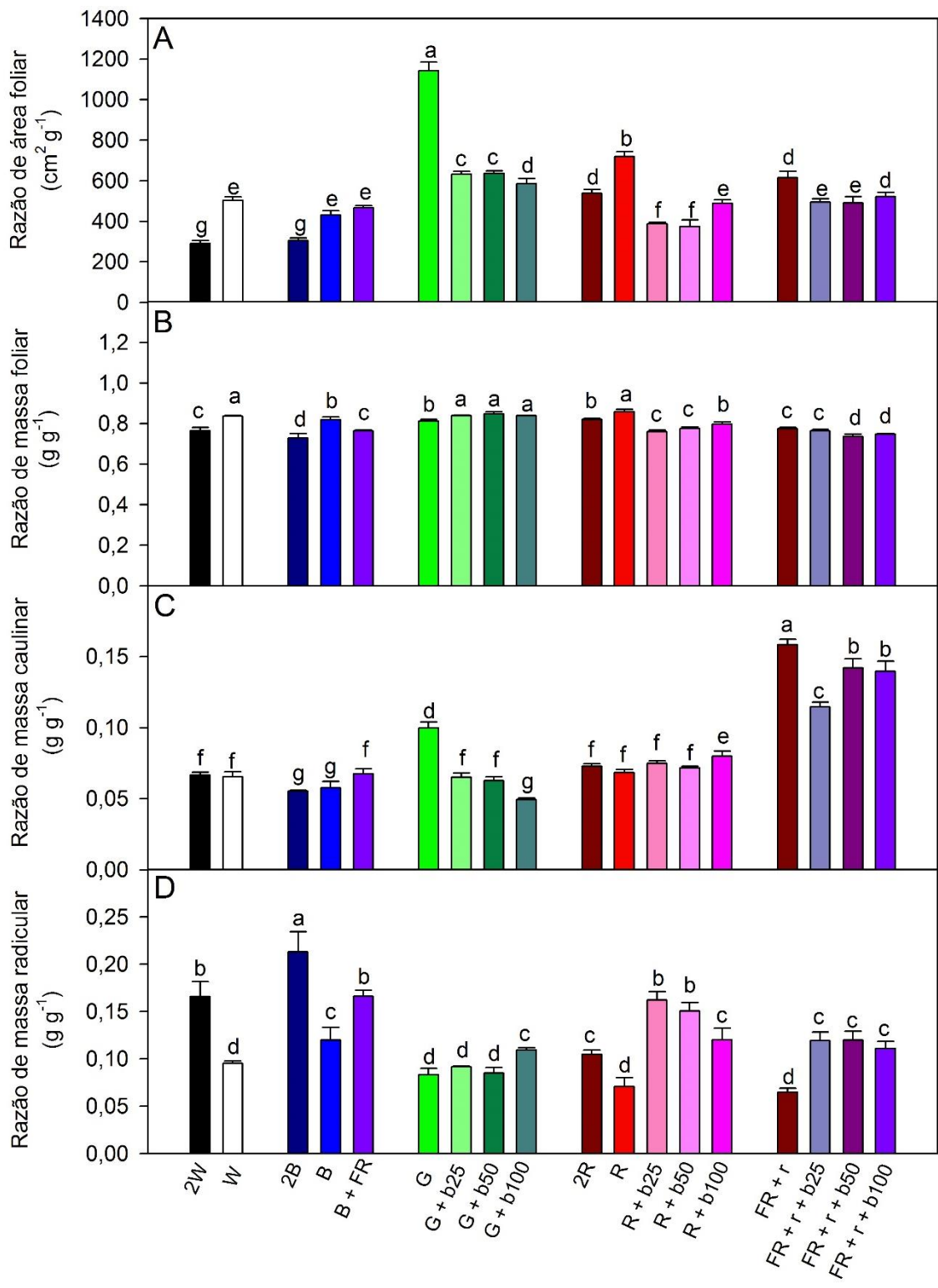
A densidade de área foliar (DAF) (Figura 6D) aumentou na presença de luz azul, com exceção dos tratamentos que continham vermelho-distante. Essa resposta sugere uma possível influência do arranjo tridimensional da folhagem promovida principalmente pelo maior comprimento do caule e entrenós, sendo um componente importante na melhoria da interceptação total da luz e conseqüentemente no ganho de MS total da planta.

A razão de área foliar (RAF) (Figura 7A) foi maior no tratamento G com um aumento de 126,81% e os menores valores nos tratamentos 2W e 2B, 57,87% e 60,40% respectivamente, em relação ao controle (W). Ressalta-se que os tratamentos G quando combinados com B tiveram uma redução expressiva na RAF ( $p < 0,05$ ).

É interessante notar a redução expressiva da razão de massa caulinar (RMC) (Figura 7C) em resposta aos níveis de luz azul em relação aos tratamentos que continham G do que nos tratamentos que continham FR. A razão de massa radicular (RMR) exibiu o valor mais elevado no tratamento 2B, indicando acréscimos de 123,63% ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao controle. Por outro lado, verificou apenas alterações menos expressivas para as razões de massa foliar (RMF) (Figura 7B).



**Figura 6** – Área foliar total da planta (A); área foliar específica (B); relação comprimento / largura foliar (C) e densidade de área foliar (D), em plantas de alfaca submetidas a diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4. n=5±SE.



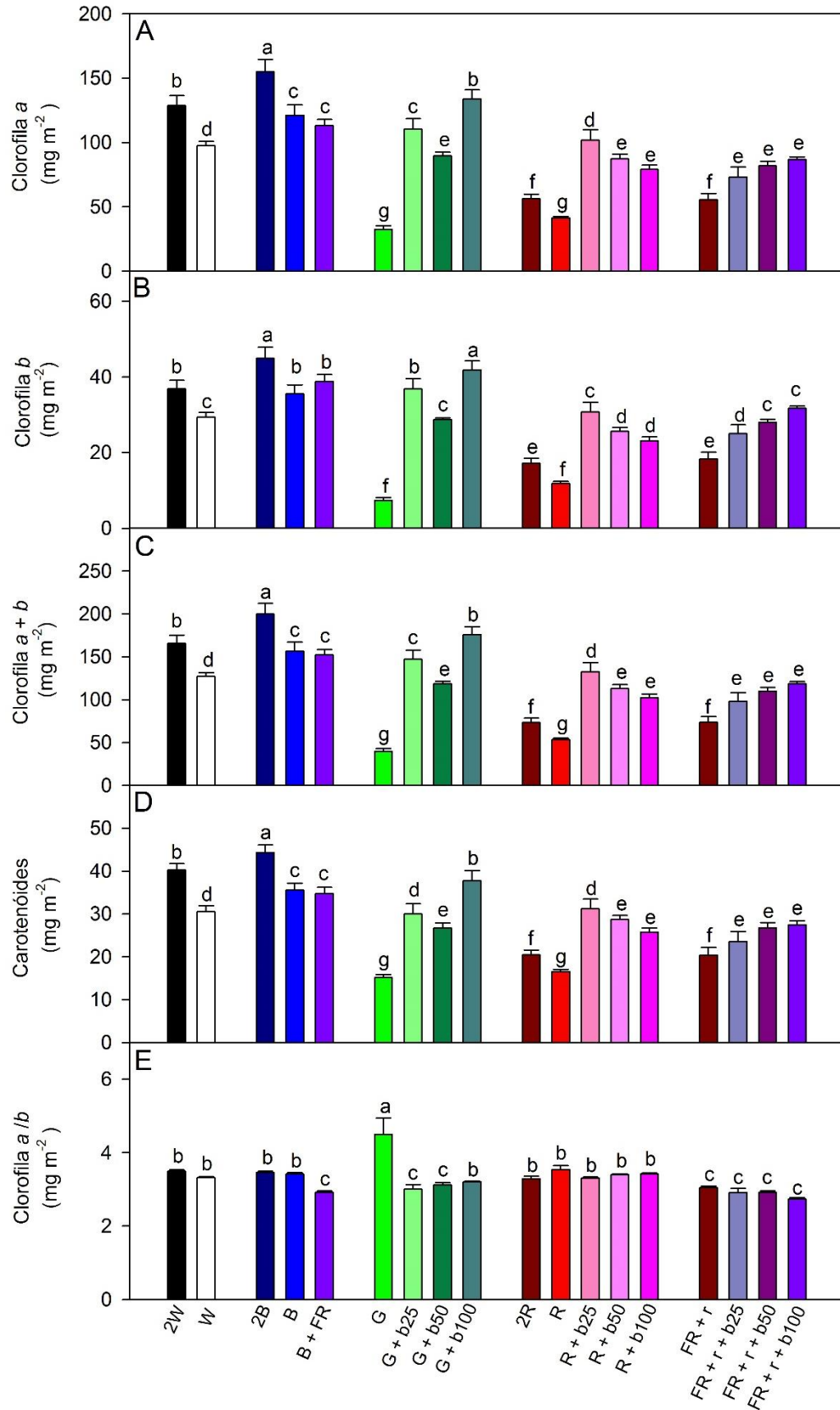
**Figura 7** – Razões de área foliar total da planta (A); massa foliar (B); massa caulinar (C) e massa radicular (D), em plantas de alface submetidas a diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4. n=5±SE

## 4.2 Pigmentos fotossintéticos

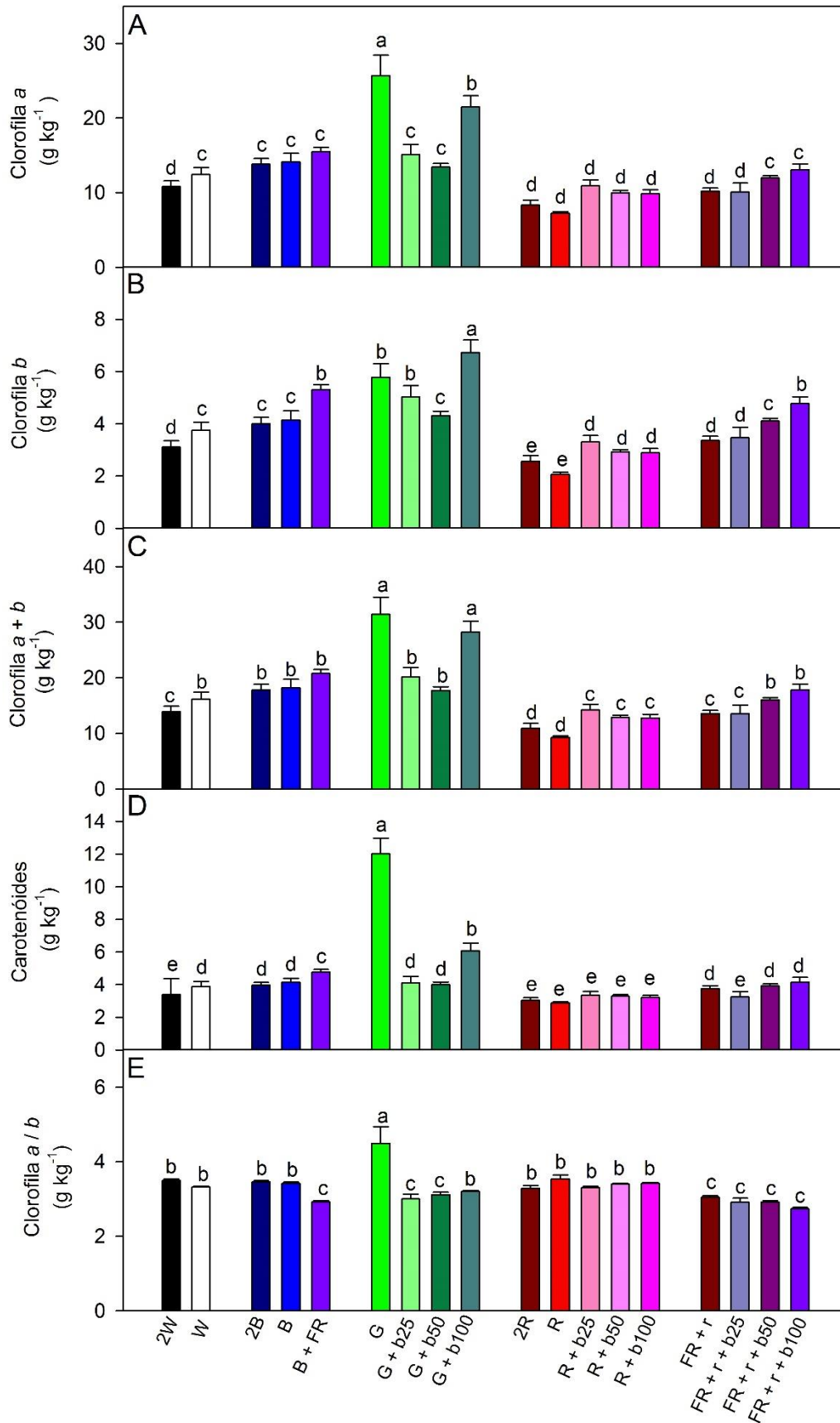
A intensidade, qualidade e as diversas combinações de luzes impostas no cultivo das plantas induziram alterações dos teores foliares de clorofila *a* (Chl*a*), *b* (Chl*b*) e totais (Chl*a+b*) ou carotenoides (Car) expressos em unidade de área (Figura 8) e, por unidade de massa (Figura 9).

De modo geral, o comportamento sobre o acúmulo de diferentes pigmentos fotossintéticos expressos por unidade de área apresenta um padrão muito semelhante (Figuras 8A, B, C e D). Os tratamentos B, 2B e B + FR se destacaram quanto ao aumento de ambas clorofilas e carotenóides em relação ao controle (W). Os tratamentos G e R apresentaram quantidade similares e baixas de clorofila *a*, *b*, *a+b* e carotenóides, porém quando ocorre a combinação desses tratamentos com azul os tratamentos G + b aumentam mais fortemente os teores de clorofilas e carotenóides que os tratamentos R. A relação de clorofilas *a/b* (Figura 8E) praticamente não teve influência sob os diferentes tratamentos com exceção do tratamento G em que houve um aumento dessa relação em 35,58% comparado ao controle ( $p \leq 0,05$ ).

Considerando-se que pudesse haver diferenças quanto à espessura da lâmina foliar e do arranjo celular entre os tratamentos, pigmentos fotossintéticos expressos por unidade de massa (Figura 9) apresentaram maiores valores para Chl*a* (Figura 9A), Chl*b* (Figura 9B) e Car (Figura 9D) com os respectivos valores de 206,79%, 153,94% e 309,12% para o tratamento G e de 172,90%, 178,96% e 155,99% para o tratamento G + b100, em relação ao controle (W). No entanto, apenas o tratamento G apresentou valores altos na razão entre as clorofilas (Figura 9E). Salienta-se que o tratamento G foi o que apresentou menores teores de clorofilas expressos por unidade de área e maiores por massa. Assim, sugere-se uma influência considerável do verde sobre a anatomia foliar dessas plantas bem como uma indução do azul nesses processos via observação dos tratamentos G + b.



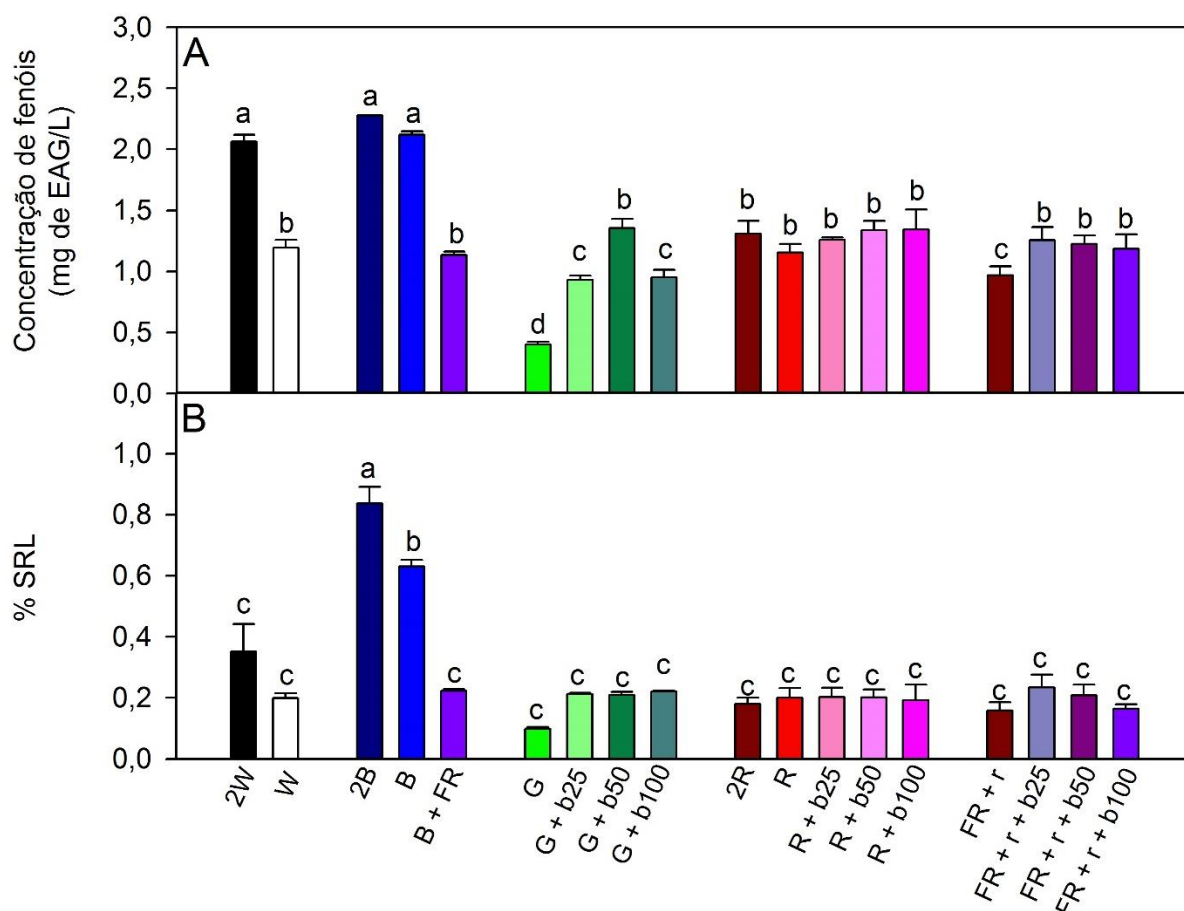
**Figura 8** – Pigmentos foliares: Clorofila *a* (Chl*a*) (A), Clorofila *b* (Chl*b*) (B), Clorofilas totais (Chl*a*+*b*) (C), Carotenóides (carotenos e xantofilas) (D), Clorofila *a/b* (Chl *a/b*) (E) expressos por unidade de área em plantas de alface submetidas a diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4. n=5±SE.



**Figura 9** – Pigmentos foliares: Clorofila *a* (Chl*a*) (A), Clorofila *b* (Chl*b*) (B), Clorofilas totais (Chl*a*+*b*) (C), Carotenóides (carotenos e xantofilas) (D), Clorofila *a/b* (Chl *a/b*) (E) expressos por unidade de massa em plantas de alface submetidas a diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4. n=5±SE.

### 4.3 Análises bioquímicas: antioxidantes e polifenóis

O conteúdo de compostos fenólicos solúveis totais (Figura 10A) apresentam comportamento semelhantes aos resultados da atividade antioxidante obtidos com o método de sequestro do radical livre DPPH (Figura 10B), obtendo maiores valores nos tratamentos B e 2B. Ainda se destaca o baixo conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante do G e indução do B sobre o G sobre o acúmulo dos fenólicos totais e a ausência de resposta do azul nos tratamentos.



**Figura 10** – Fenóis totais (equivalente a mg de ácido gálico – EAG) (A) e atividade antioxidante (%SRL: sequestro de radicais livres pelo método de DPPH) (B). Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4.  $n=4\pm SE$ .

### 4.4 Análises anatômicas

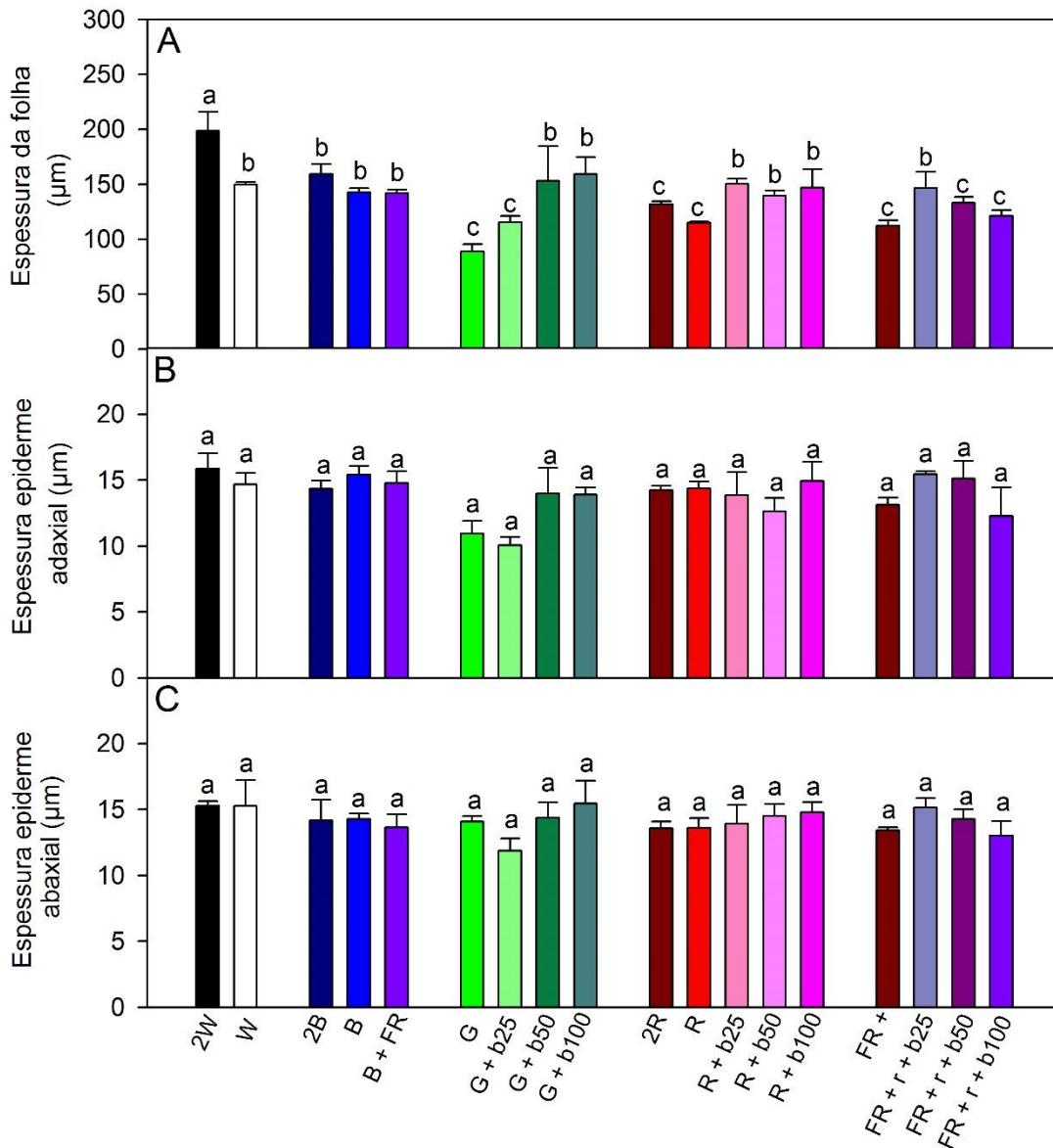
Em função das alterações no acúmulo de MS, nos parâmetros de crescimento, nos pigmentos foliares, buscou-se analisar algumas características morfo-anatômicas da folha em resposta aos tratamentos aplicados a fim de elucidar questões referentes à diferenciação

celular em resposta as variações de luz, em especial sob a influência da luz azul sobre diferentes combinações de luzes impostas para o crescimento.

#### **4.4.1 Microscopia de luz da folha**

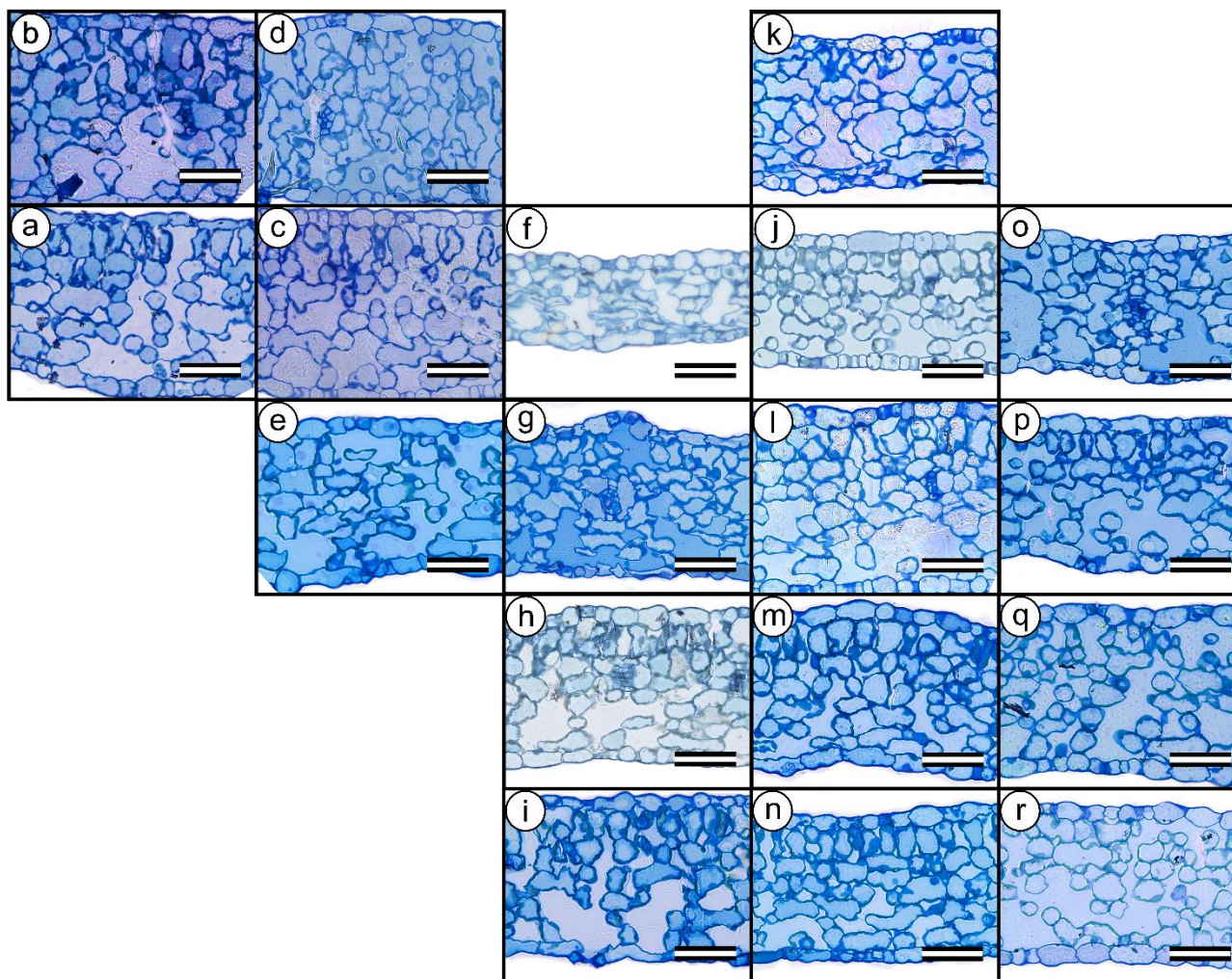
Foram observadas variações na espessura da folha entre plantas cultivadas em função dos diversos tratamentos de luz. As menores espessuras foliares foram encontradas nos tratamentos G, FR + r e R. Não foram verificadas diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diversos tratamentos para a espessura das células epidérmicas tanto na face adaxial ou abaxial (Figura 11B e C). De modo geral observou-se um aumento expressivo (47%, G + b100 em comparação a G) na espessura foliar induzido pelo B sobre o G, embora de menor magnitude fosse também observado do B sobre o R e parcialmente sobre o FR + r. O aumento da intensidade luminosa promoveu discreto aumento na espessura do B e R (tratamento 2B ou 2R) ( $p > 0,05$ ) porém significativo ( $p < 0,05$ ) no 2W em comparação à W.





**Figura 11** – Espessura da folha (A), epiderme adaxial (B) e epiderme abaxial (C) de plantas de alface submetidas a diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4.  $n=3\pm SE$ .

Observaram-se alterações em relação a morfologia celular em todos os tratamentos assim como aumento dos espaços intercelulares, principalmente nos tratamentos com luz G e FR. Quanto à disposição e à forma das células (Figura 12) pode-se observar que não houve uma diferenciação clara das células que compõem o parênquima paliçádico e lacunoso. Paralelo às mudanças na espessura foliar, há de forma qualitativa uma redução na proporção de espaços intercelulares em quantidades crescentes de B sobre as cores puras G ou R, mas não de forma evidente sobre FR + r. O fornecimento de FR em todos os tratamentos avaliados promove total perda da identidade do parênquima paliçádico e lacunoso tornando-se parênquima clorofiliano uniforme (Figura 12).



**Figura 12** – Microscopia de luz da secção transversal de folhas de alfaca cultivadas sob diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Os tratamentos impostos foram: Branco 300 (a), Branco 600 (b), Azul 300 (c), Azul 600 (d), Azul 300 + Vermelho-distante (e), Verde 300 (f), Verde 275 + Azul 25 (g), Verde 250 + Azul 50 (h), Verde 200 + Azul 100 (i), Vermelho 300 (j), Vermelho 600 (k), Vermelho 275 + Azul 25 (l), Vermelho 250 + Azul 50 (m), Vermelho 200 + Azul 100 (n) Vermelho-distante + Vermelho 300 (o), , Vermelho-distante + Vermelho 275 + Azul 25 (p), Vermelho-distante + Vermelho 250 + Azul 50 (q), Vermelho-distante + Vermelho 200 + Azul 100 (r).

Barra

de

escala

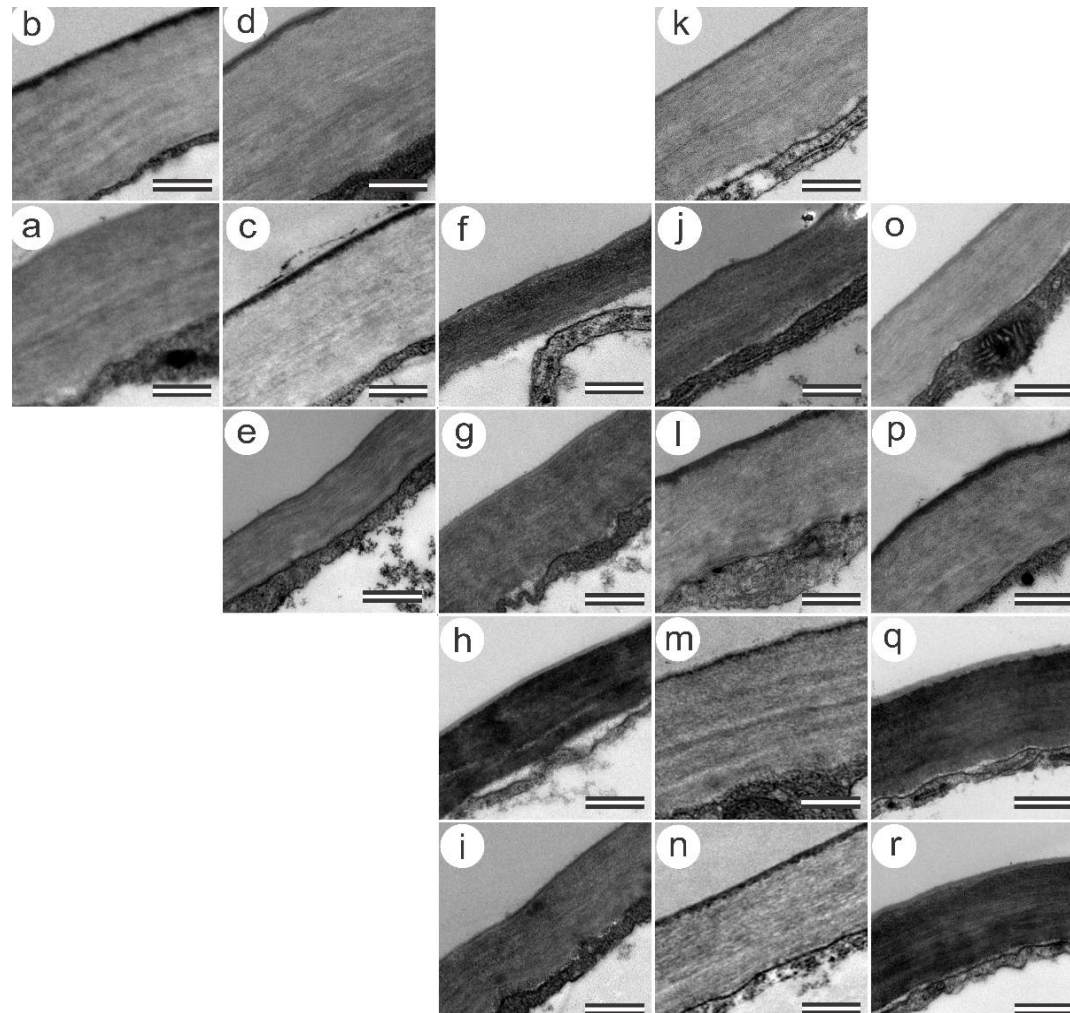
=

50µm.

#### **4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão**

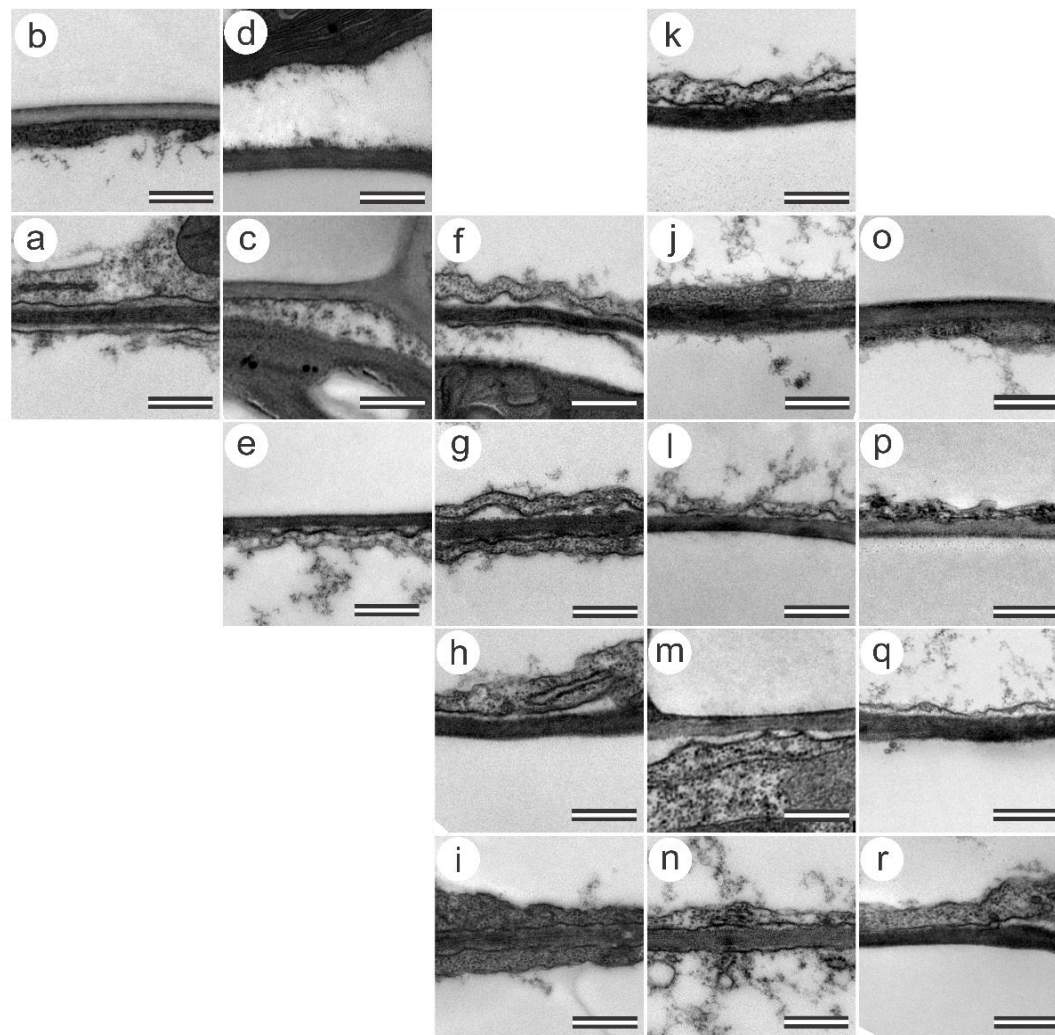
De modo geral, o aumento na intensidade luminosa promoveu aumento na espessura da parede celular da epiderme em relação aos respectivos controles (Figura 13). Além disso, pode-se notar sobre as luzes puras do experimento (Figura 13e, f e h), com exceção da luz azul, que há uma redução na espessura da parede celular da epiderme cujas diferentes combinações desses tratamentos com a luz azul resultaram em um aumento na espessura da parede celular dessas células. Destaca-se ainda o desenvolvimento atípico do tratamento 2B (Figura 13d), onde é possível verificar que a espessura da parede é superior aos demais tratamentos (Figura 13).

Vale-se evidenciar a superior eletrodensidade da camada epicuticular nos tratamentos em que houve suplementação com luz azul. Com isso pode-se supor que, quando submetidas à exposição dessa luz, a planta desenvolve mecanismos de resposta que é detectada via aumento de eletrodensidade. Não é possível diferenciar se há um aumento na espessura ou se há mudança substancial na composição das ceras epicuticulares.



**Figura 13** – Microscopia de transmissão da parede celular de células epidérmicas da face adaxial de folhas de alfaca cultivadas sob diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Destaca-se na parte superior de cada imagem a camada epicuticular e abaixo a membrana plasmática. Os tratamentos impostos foram: Branco 300 (a), Branco 600 (b), Azul 300 (c), Azul 600 (d), Azul 300 + Vermelho-distante (e), Verde 300 (f), Verde 275 + Azul 25 (g), Verde 250 + Azul 50 (h), Verde 200 + Azul 100 (i), Vermelho 300 (j), Vermelho 600 (k), Vermelho 275 + Azul 25 (l), Vermelho 250 + Azul 50 (m), Vermelho 200 + Azul 100 (n) Vermelho-distante + Vermelho 300 (o), Vermelho-distante + Vermelho 275 + Azul 25 (p), Vermelho-distante + Vermelho 250 + Azul 50 (q), Vermelho-distante + Vermelho 200 + Azul 100 (r). Barra de escala = 0,5µm.

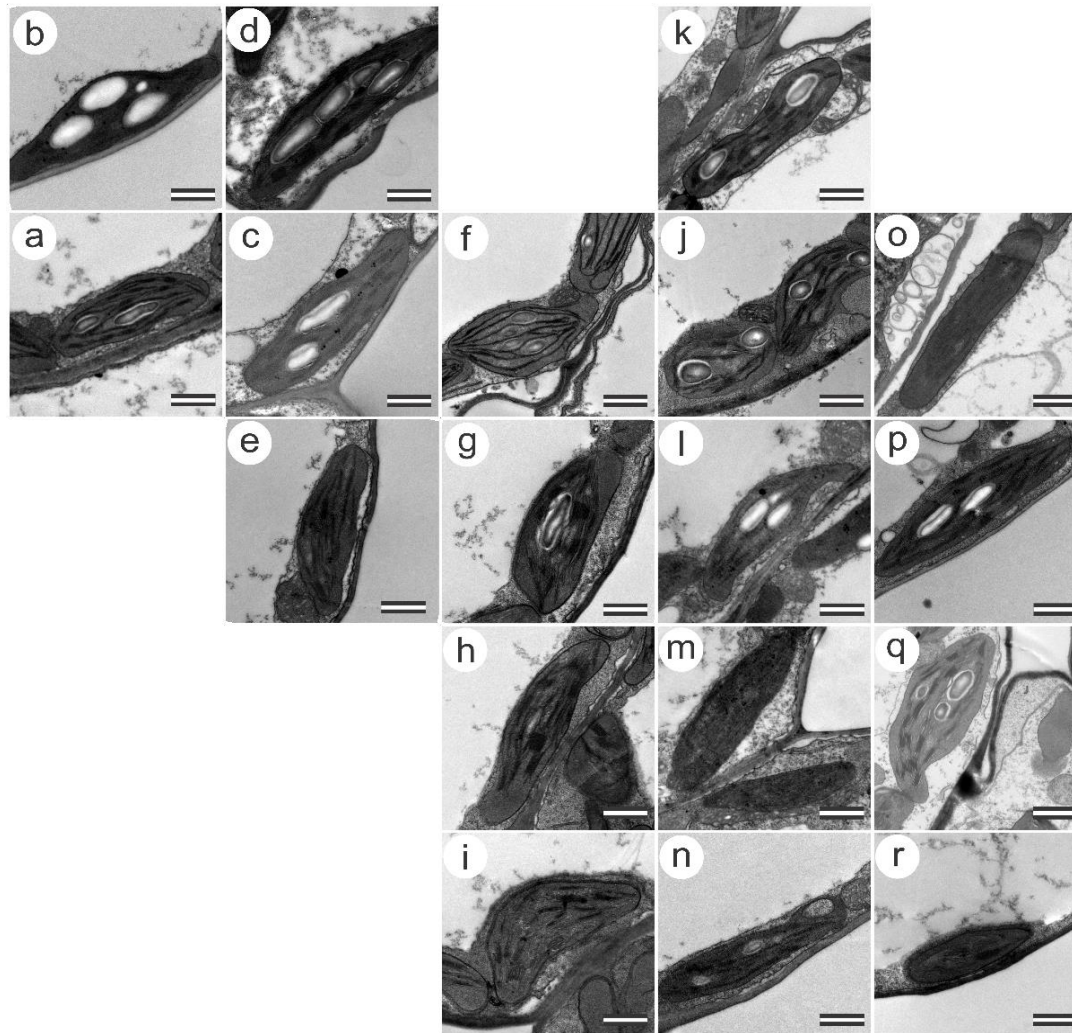
Nas figuras 13e e 14e é possível visualizar a membrana plasmática separada da parede celular o que é característico de uma célula que sofreu lise celular, destacando a fragilidade que as plantas cultivadas na luz verde se encontravam. Salienta-se que a lise celular é um artefato experimental associado a variações osmóticas das células durante a fixação em tampão apropriado. Para as análises, usou fixador Karnovsky com concentração final de 50mM. Portanto, o potencial osmótico das células que sofreram lise é inferior ao do tampão de fixação. Esse efeito é reduzido com a combinação com B, visível na figura 14p, i e q. Os outros tratamentos ilustrados na imagem não apresentam características atípicas ao controle.



**Figura 14** – Microscopia de transmissão da parede celular de células do mesófilo de plantas de alface cultivadas sob diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Os tratamentos impostos foram: Branco 300 (a), Branco 600 (b), Azul 300 (c), Azul 600 (d), Azul 300 + Vermelho-distante (e), Verde 300 (f), Verde 275 + Azul 25 (g), Verde 250 + Azul 50 (h), Verde 200 + Azul 100 (i), Vermelho 300 (j), Vermelho 600 (k), Vermelho 275 + Azul 25 (l), Vermelho 250 + Azul 50 (m), Vermelho 200 + Azul 100 (n) Vermelho-distante + Vermelho 300 (o), , Vermelho-distante + Vermelho 275 + Azul 25 (p), Vermelho-distante + Vermelho 250 + Azul 50 (q), Vermelho-distante + Vermelho 200 + Azul 100 (r). Barra de escala = 0,5µm.

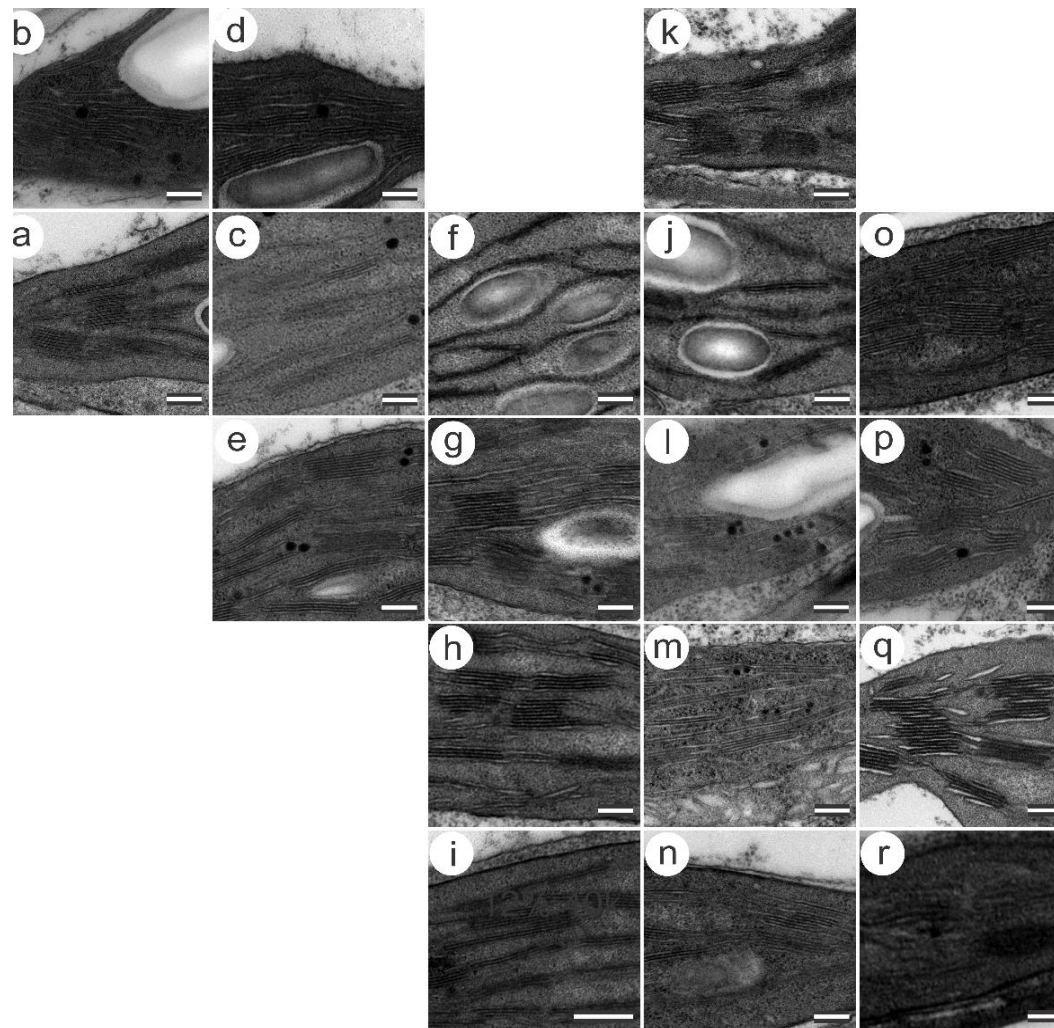
#### 4.4.2.1 Ultraestrutura do cloroplasto

Observaram-se modificações no tamanho, forma (Figura 15) e, principalmente, alterações em termos de quantidade, disposição e adensamento dos tilacoides dessas organelas em relação ao controle (W). Ainda é possível notar um número reduzido de tilacoides nos tratamentos com luz verde e vermelha (Figuras 16e e 16f) e o aumento destes com a combinação com a luz azul. O fornecimento do azul promove intenso aumento do grau de empilhamento dos tilacóides particularmente sobre o G mas também presente sobre o R. Em paralelo a isso também é possível identificar um aumento na eletrodensidade tanto na membrana dos tilacóides bem como na região do estroma do cloroplasto (Figura 16) suportando os dados de aumento nos teores de pigmentos fotossintéticos bem como sugerido um aumento na capacidade carboxilativa e promoção do aumento no ganho de biomassa quando da suplementação do B sobre o G, R ou FR + r.



**Figura 15** – Microscopia de transmissão dos cloroplastos de folhas de alface cultivadas sob diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Os tratamentos impostos foram: Branco 300 (a), Branco 600 (b), Azul 300 (c), Azul 600 (d), Azul 300 + Vermelho-distante (e), Verde 300 (f), Verde 275 + Azul 25 (g), Verde 250 + Azul 50 (h), Verde 200 + Azul 100 (i), Vermelho 300 (j), Vermelho 600 (k), Vermelho 275 + Azul 25 (l), Vermelho 250 + Azul 50 (m), Vermelho 200 + Azul 100 (n) Vermelho-distante + Vermelho 300 (o), , Vermelho-distante + Vermelho 275 + Azul 25 (p), Vermelho-distante + Vermelho 250 + Azul 50 (q), Vermelho-distante + Vermelho 200 + Azul 100 (r). Barra de escala = 1μm.





**Figura 16** – Microscopia de transmissão dos cloroplastos com ênfase na organização dos tilacoides de folhas de alfaca cultivadas sob diferentes intensidades, qualidades e combinações de luz. Os tratamentos impostos foram: Branco 300 (a), Branco 600 (b), Azul 300 (c), Azul 600 (d), Azul 300 + Vermelho-distante (e), Verde 300 (f), Verde 275 + Azul 25 (g), Verde 250 + Azul 50 (h), Verde 200 + Azul 100 (i), Vermelho 300 (j), Vermelho 600 (k), Vermelho 275 + Azul 25 (l), Vermelho 250 + Azul 50 (m), Vermelho 200 + Azul 100 (n) Vermelho-distante + Vermelho 300 (o), , Vermelho-distante + Vermelho 275 + Azul 25 (p), Vermelho-distante + Vermelho 250 + Azul 50 (q), Vermelho-distante + Vermelho 200 + Azul 100 (r). Barra de escala = 200nm.

#### 4.5 Análise de regressão múltipla multivariada

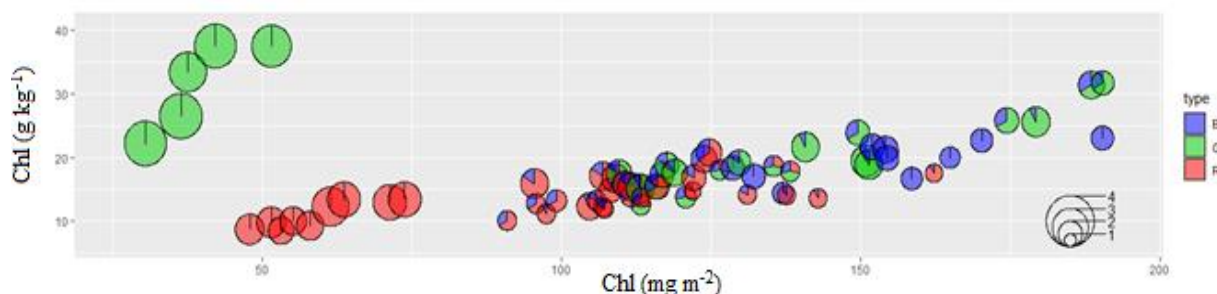
De modo a promover uma incorporação de diferentes efeitos promovidos pelas luzes e a magnitude dessa resposta individualizada, sumarizou-se numa análise de regressão múltipla multivariada, no qual o modelo usado diferencia os efeitos individuais das luzes azul, verde, vermelho, vermelho-distante e as interações entre azul e verde, azul e vermelho, e azul com vermelho-distante. Depois de algumas equações testadas (dados não mostrados), a que melhor sumariza o fenômeno observado é mostrado na Figura 17 traz informações dos teores de  $Chla+b$  expressas por unidade de área (eixo y) e massa (eixo x) e a relação comprimento pela largura da folha (quanto maior o círculo maior a relação) de acordo com cada tratamento.

As elevadas relações comprimento / largura foliar dos tratamentos G, R e FR + r apresentadas no gráfico através do tamanho maior dos círculos, evidencia o fenótipo estiolado apresentado pelas plantas desses tratamentos. Destaca-se os altos teores de  $Chla+b$  expressos por unidade de massa nas plantas referentes ao tratamento com luz verde (Figura 17).

Há uma linearidade do aumento dos teores de clorofila expressas por unidade de área e massa com o aumento da intensidade de azul fornecido nas combinações de luzes. É possível notar que os tratamentos verde e vermelho possuem os menores teores de clorofila por unidade de área, porém, quando combinados com azul esse teor aumenta, mas reduz-se a relação entre comprimento e largura da folha. Ademais, pode-se destacar que a suplementação do azul em tratamentos que contém luz vermelha (R e FR + r) esse aumento tende a saturar em um ponto intermediário, enquanto na luz verde isso não ocorre (Figura 17).

A Figura 17 ainda enfatiza os resultados anteriormente mostrados de que a combinação com a luz azul favorece o desenvolvimento “normal” e desestiolado das plantas de alface através da correlação entre esses importantes parâmetros e os tratamentos estudados. Exemplifica-se como “*outlier*” o tratamento G (círculos verdes) nos quais apresenta os mais baixos teores de clorofilas por área, mas elevados por massa e enfatizando o alto percentual de espaços intercelulares das folhas, paredes celulares finas e baixo conteúdo citoplasmático, em outras palavras pouca massa por área (alta AFE). No entanto, o fornecimento do azul sobre o G (pontos com 1/3 do círculo verde tachado de azul, tratamento G + b100) nos quais pode-se verificar valores similares de clorofilas por massa com valores muito distintos por massa. Esses dados enfatizam o aumento direto na quantidade de clorofilas por massa bem como aumento na massa (de modo a manter a relação constante) e ressalta o aumento na espessura da parede celular bem como a promoção do empilhamento dos tilacoides e aumento

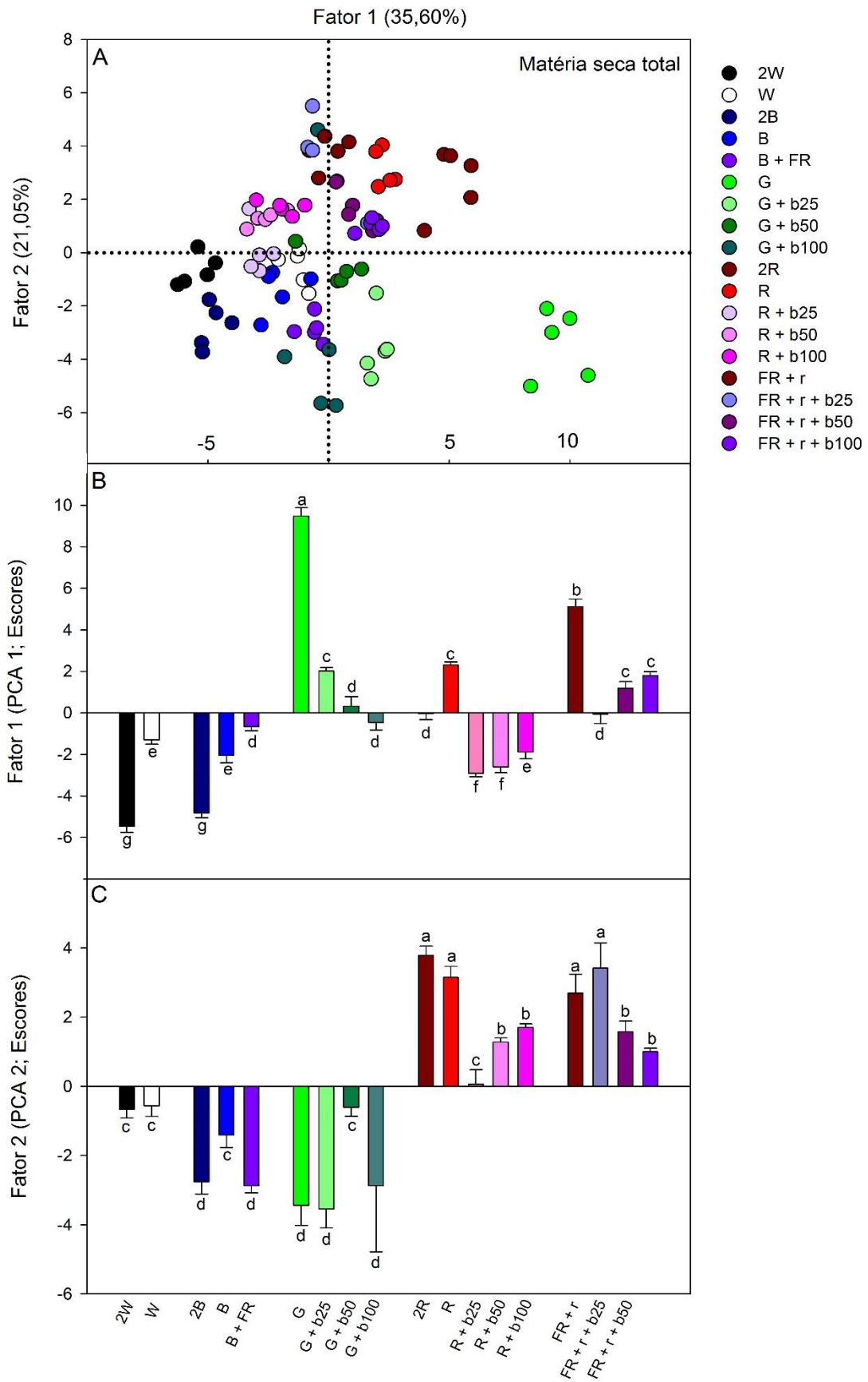
de suas eletrodensidades, em outras palavras, indução do desestiolamento. Por essa análise, as plantas cultivadas no B e no G + b100 são as mais desestioladas enquanto o outro extremo é dominado pelo R com ápice no G.



**Figura 17** – Associação entre os teores de  $Chl_{a+b}$  expressas por unidade de área (eixo y) e massa (eixo x) e a relação comprimento por largura da folha (quanto maior o círculo maior a relação) de acordo com cada tratamento. B (blue; azul), G (green; verde) e R (red; vermelho).

#### 4.6 Análise de componentes principais

Análise de componentes principais (PCA) que tem a capacidade de estimar a contribuição individual (ou de grupos correlacionados) das variáveis analisadas no trabalho para o acúmulo de matéria seca nas plantas indica que o primeiro componente (PC1 – maior variância; 35,6%) foi capaz de separar os tratamentos aplicados em dois grandes grupos (Figura 18). Atribui-se ao PC1 a separação das respostas da luz verde e vermelho daquelas que são estimuladas pelo vermelho-distante ou de alguma interação com a luz azul, sugerindo um mecanismo diferencial nas respostas associadas ao estiolamento e desestiolamento e eficiência da interceptação da luz para o acúmulo de matéria seca nessas plantas. O segundo componente (PC2 – menor variância; 21,05%) separou as respostas de todos os tratamentos que contém luz vermelha daqueles que não a continham. De modo geral, tratamentos que continham luz verde e azul foram discriminados daquelas do vermelho e vermelho-distante mesmo quando acrescida de um “pouco” de azul nesses tratamentos. Muitas variáveis (PC2) estão associadas às respostas da eficiência da captura da luz pelas folhas (área foliar, comprimento de folha, etc) e diretamente relacionados à explicação pelos pigmentos fotossintéticos. Sugere-se que as respostas fisiológicas da adição da luz azul sob a luz verde desencadeiem mecanismos distintos da luz azul sob luz vermelha ou do vermelho-distante (Figura 18 e Tabela 2).



**Figura 18** – Escores estimados dos tratamentos em relação aos componentes principais (PCA1 e PCA2) e sua distribuição espacial. Média seguidas de letras distintas representam diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). Demais siglas e comparações estatísticas conforme Figura 4.  $n=5 \pm SE$ .

A análise dos autovetores (correlação linear entre uma dada variável com um dado componente principal) mostra que o PC1 se correlaciona fortemente com os componentes primários em relação à razão comprimento / largura foliar (0,949) e densidade de área foliar (-0,826). Nos pigmentos com relação as clorofilas  $a+b$  (0,666) por unidade de área, mas não por unidade de massa (0,379). No crescimento derivado a forte correlação é encontrada em área foliar específica (0,927) e também na razão de área foliar (0,905). Quanto a anatomia é a espessura do mesofilo (-0,803) e a espessura da folha (-0,792) que expressam a maior correlação. Em paralelo e em relação ao PC2, o maior autovetor (em módulo) foi no crescimento primário com a área foliar (0,801), nos pigmentos com  $Chla+b$  e  $Chla$  em unidades de massa (-0,815 e -0,801, respectivamente) e sobre o crescimento derivados em relação ao índice de área foliar (0,801).

**Tabela 2** – Porcentagem de explicação do acúmulo de matéria seca ou da variância total por diferentes grupos de dados experimentais pelos PC1 e PC2 estimados via análise de componentes principais.

<b>Grupos</b>	<b>PC1</b>	<b>PC2</b>
Crescimento Primário	26.47%	23.75%
Pigmentos	17.42%	52.09%
Crescimento derivado (relações)	28.75%	21.07%
Anatomia	27.36%	3.09%
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

**Tabela 3** – Autovetores estimados para PC1 e PC2 das diferentes variáveis avaliadas experimentalmente de plantas de alface e reposta a variação da intensidade e qualidade de luz.

Grupos	Variável	Autovetores	
		PC1	PC2
<b>Crescimento primário</b>	Raiz (cm)	-0.355	-0.101
	Raiz (g)	-0.785	0.061
	Caule (cm)	0.707	0.291
	Caule (g)	-0.134	0.628
	Diâmetro do caule (cm)	-0.689	0.285
	Comprimento do entrenó (cm)	0.737	0.263
	Número de folhas (número)	-0.104	-0.081
	Folha (cm <sup>2</sup> )	-0.178	0.801
	Folha (g)	-0.760	0.492
	Altura total (cm)	0.440	0.218
	Comprimento da folha (cm)	0.711	0.549
	Largura da folha (cm)	-0.495	0.671
	Razão comprimento/largura foliar (cm cm <sup>-1</sup> )	0.949	-0.078
	Densidade de área foliar (cm <sup>2</sup> cm <sup>-3</sup> )	-0.826	-0.246
<b>Pigmentos</b>	Chla (mg m <sup>-2</sup> )	-0.677	-0.612
	Chlb (mg m <sup>-2</sup> )	-0.614	-0.585
	Chla+b (mg m <sup>-2</sup> )	-0.666	-0.608
	Carotenoides (mg m <sup>-2</sup> )	-0.678	-0.578
	Chla (g kg <sup>-1</sup> )	0.393	-0.801
	Chlb (g kg <sup>-1</sup> )	0.295	-0.795
	Chla+b (g kg <sup>-1</sup> )	0.379	-0.815
	Carotenoides (g kg <sup>-1</sup> )	0.611	-0.580
	Chla/b (g kg <sup>-1</sup> )	-0.005	0.174
	Chl área/massa <sup>-1</sup>	-0.228	0.178

**Tabela 3 continuação**

<b>Crescimento derivados</b>	RMR - Razão de massa radicular ( $\text{g g}^{-1}$ )	-0.694	-0.226
	RMC - Razão de massa caulinar ( $\text{g g}^{-1}$ )	0.505	0.418
	RMF - Razão de massa foliar ( $\text{g g}^{-1}$ )	0.282	-0.076
	Razão de área foliar ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ )	0.905	-0.146
	AFE - Área foliar específica ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ )	0.927	-0.132
	IAF - Índice de área foliar ( $\text{cm}^2 \text{cm}^{-2}$ )	-0.178	0.801
<b>Anatomia</b>	Espessura da mesófilo ( $\mu\text{m}$ )	-0.803	-0.028
	Espessura da epiderme adaxial ( $\mu\text{m}$ )	-0.495	0.271
	Espessura da epiderme abaxial ( $\mu\text{m}$ )	-0.290	0.122
	Espessura da folha ( $\mu\text{m}$ )	-0.792	-0.001

De posse dos dados dos autovetores, procedeu-se um agrupamento empírico das diferentes variáveis analisadas em quatro grupos de acordo com associação experimental “natural” de cada grupo. São eles: dados primários de crescimento, pigmentos fotossintéticos, crescimento derivado (relações) e anatômicos. Por meio do somatório dos autovalores (quadrado dos autovetores) e o cálculo do autovalor parcial (normalizado pelo número de variáveis de cada grupo) dos grupos em relação ao total (independente para cada autovetor) foi possível atribuir estatisticamente um “grau de explicação” do grupo para o respectivo componente principal. Optou-se pelo uso de “grupos” em função de que, entre as variáveis de cada grupo, existe um elevado grau de correlação ou ainda são variáveis auto-correlacionadas. Para o fator 1 (PC1), os maiores percentuais de explicação foram ligados ao grupo de crescimento derivado (28,75%), anatomia (27,36%) e crescimento primário (26,47%), seguindo pelos pigmentos (17,42%) (Tabela 2). Entretanto, para o fator 2 (PC2), o maior percentual de explicação foi o grupo dos pigmentos (52,09%) e crescimento primário (23,75%), depois crescimento derivado (21,07%) e por último a anatomia (3,09%).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Os padrões de desenvolvimento da alface são afetados tanto pela qualidade espectral bem como pela intensidade luminosa

De modo geral foi possível demonstrar que o cultivo de plantas de alface em diferentes qualidades espectrais, bem como sob variações na intensidade podem promover o desenvolvimento estiolado ou desestiolado das plantas (Figura 3). Isoladamente, foi possível demonstrar que o aumento da intensidade luminosa (2W, 2B ou 2R;  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) promove algum grau de desestiolamento das plantas quando comparado à respectiva qualidade monocromática à  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figuras 5, 8, 12 e 17). Salienta-se que diferentes qualidades promovem efeitos muito distintos entre os tratamentos avaliados.

Cultivo em G, R ou FR + r propiciaram plantas estioladas enquanto em B, G + b plantas desestioladas. Nota-se um efeito marcante da luz azul na promoção do desestiolamento. A ampla capacidade de percepção e resposta a uma variação do espectro eletromagnético, desde as regiões do UVA (320 nm) até o vermelho-distante (720 – 780 nm) são desempenhadas por múltiplos fotorreceptores que foram supostamente e gradativamente ativados entre os tratamentos (Boccalandro et al., 2001). Uma possível atuação dos fitocromos com o aumento na suplementação da luz vermelha (2R) possui um papel relevante, porém limitado na promoção do desestiolamento (Tepperman et al., 2006). A suplementação de azul, e uma possível ativação dos criptocromos, promove maiores graus de desestiolamento nas plantas, tanto no tratamento que promoveu maior grau de estiolamento como o G quanto em misturas com o vermelho ou vermelho e vermelho-distante (Figuras 5 e 12) (Boccalandro et al., 2001).

Combinações de bandas espectrais na mistura da luz incidente afetam o crescimento (Figura 5), o desenvolvimento (Figura 3), o metabolismo (Figura 10) e a morfologia das plantas (Figura 17) (Casal et al., 2003; Chen et al., 2004; Folta & Carvalho, 2015; Fraser et al., 2016). Assim, a luz é capaz de alterar variáveis que contribuem para o ganho de MS das plantas (Figura 4), como a concentração de pigmentos (Figuras 8 e 9), o comprimento dos entrenós e do caule (Figura 5), a eficiência da interceptação de luz (Figura 6D), área foliar total (Figura 6A) (Johkan et al., 2010). Além das alterações causadas por diferentes qualidades de luz, o ganho de MS também pode ser afetado pela variação da intensidade (Muneer et al., 2014). Os dados demonstram aclimatação tanto a intensidade quanto qualidade da luz, proporcionados por crescimento em condições controladas sob diferentes LEDs,



ajustando o desenvolvimento do cloroplasto (Figura 15), da célula (Figura 12), dos tecidos (Figura 11) e da planta como um todo (Figura 3), que em última instância resultou em incremento de biomassa (Figura 4A), em especial quando as plantas que tiveram suplementação em alguma das combinações (G, R e FR + r) com luz azul (Figura 4). As alterações fenotípicas observadas são condizentes com mudanças profundas no padrão de desenvolvimento (Figuras 15 e 16) e não apenas a um efeito direto da maior intensidade luminosa sobre a taxa de fotossíntese das plantas.

A ativação de fotorreceptores distintos permite o controle de características específicas nas plantas (Carvalho & Folta, 2014; Fraser et al., 2016). As luzes vermelha e azul são importantes para o aumento de biomassa, encurtamento dos entrenós, biossíntese de pigmentos e redução da razão comprimento / largura foliar (Chen et al., 2004; Franklin, 2008; Li et al., 2010; Johkan et al., 2010; Fraser et al., 2016). Yorio et al. (2001), relataram que houve maior acúmulo de massa na alface cultivada sob luz vermelha suplementada com luz azul do que na alface cultivada somente sob luz vermelha. Além do mais, os efeitos da luz azul em combinação com alta intensidade luminosa foram importantes para impulsionar maior acúmulo de biomassa em comparação com plantas cultivadas sob menor intensidade (Muneer et al., 2014). Estes resultados podem estar associados à uma aclimatação da maquinaria fotossintética associada a maior disponibilidade de luz.

Em relação a morfologia das plantas sob R monocromático, as plantas apresentavam hastes longas e folhas tortuosas, enquanto as folhas de alface com radiação monocromática B pareciam eretas e planas (Figura 3) semelhante ao fenótipo descrito por Chen et al., (2014).

Os comprimentos de onda 500 – 600 nm (luz verde– G) tem sido relatado por gerar efeitos negativos no ganho MS (Went, 1957; Folta & Maruhnich, 2007; Wang et al., 2013). Pesquisas realizadas com plantas de pimenta mostraram que o G induz aumento nas taxas de crescimento do caule e levam a uma haste mais longa, maior área foliar específica (AFE) e menor espessura da mesófilo em comparação com R e B sozinhas (Folta, 2004; Snowden et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que as combinações de luzes R + B + G em plantas de alface exibiram um fenótipo com entrenós mais alongados, folhas com maior área foliar específica e menor espessura em comparação com a R + B (Kim et al., 2004). Estudos realizados com tomate, pepino, pimenta e alface nos quais foram aumentando a intensidade de G a concentração de clorofila tendeu a diminuir (Snowden et al., 2016). Redução nos teores de clorofilas por unidade de área foliar são comuns em condições de pouca luz (Cope et al., 2014) que normalmente são acompanhadas de menor concentração de RuBisCO (Seemann,

1989) e menores níveis energéticos em seus tecidos (Onoda et al., 2017; Falcioni et al., 2018; Moriwakai et al., 2019). Os dados coletados em plantas de alface são evidentes quanto aos efeitos da luz verde sobre o padrão de desenvolvimento das plantas, no qual evidencia-se menor ganho de MS (Figura 4A), folhas extremamente finas (Figura 11A), com entrenós alongados (Figura 5C), maior razão comprimento / largura foliar (Figura 6C), menor teor de pigmentos por unidade de área (Figura 8) e elevada AFE (Figura 6B). Apesar dos altos valores da AFE em G, esses dados indicam que menos biomassa foi particionada para as folhas particularmente na formação de uma parede celular muito fina (Figura 13). Os valores da RAF (Figura 7A) mostram que a alocação de C na formação de área foliar permanece relativamente constante entre os tratamentos, evidenciando que o conteúdo de pigmentos possa ter maior relevância na absorção da luz do que uma alteração morfológica em particular. Sugere-se que em 555 nm, como pico de emissividade dos LEDs usados, tanto os criptocromos como os fitocromos permaneceram inativos (ou com baixo grau de ativação) devido a ineficiência de absorção nesse comprimento de onda (Cope et al., 2014; Kong & Okajima, 2016; Fraser et al., 2016). Assim, no G não ocorre estímulo ao desestiolamento promovendo a formação de plantas muito estioladas (Figura 2).

Em ambientes de sub-bosque ocorrem alta relação FR:R (Martínez-García et al., 2014). As plantas sob os tratamentos FR + r (típico de um ambiente de sub-bosque) apresentaram significativamente maior comprimento caular e uma redução da DAF ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 5B e 6D) em comparação ao controle (W). Ainda, uma maior alocação de C para a formação de caule e redução da área foliar foram observadas (Figura 6A). Resultados semelhantes foram encontrados para a multiplicação *in vitro* de batata, indicando que o comprimento do hipocótilo foi o maior em FR (Kim et al., 2005). Além disso, o FR assim como o G, promoveram maiores particionamentos para a formação de pecíolo do que para tecido foliar. De modo geral, plantas crescidas em FR induzem o maior alongamento caular e de pecíolo (Figura 5B e 6C) (Mickens et al., 2018). Essas características típicas da SAS são desencadeadas pelo FR por sua promoção na desativação dos fitocromos quanto pelo G por ser uma faixa espectral de baixa absorção pelos fotorreceptores (fitocromos e criptocromos) como demonstrado nos tratamentos G e FR + r (Figura 5B e 6C) (Fraser et al., 2016). Ainda se atribui um papel relevante do PHYA nessas respostas uma vez que PHYA está presente em maior quantidade nessa condição e pode haver algum grau de ativação do PHYA pelo FR, sem, no entanto, estimular o PHYB (Nagy & Schafer, 2002). Sugere-se ainda aumento nos teores de giberelinas nas plantas estioladas (Casal et al., 2003).

A luz azul é um sinal essencial para processos de desestiolamento do hipocótilo, evitar a SAS além do fototropismo (Chen et al., 2004; Cope et al., 2014). Em todas essas respostas, a luz azul exerce influência no alongamento das células (Yu et al., 2010). Na ausência de B (como em G), algumas plantas exibem uma resposta profunda de SAS, que é provavelmente mediada pela falta de atividade combinada de fitocromos e criptocromos (Pedmale et al., 2016). Ao suplementar luz azul ao tratamento G o crescimento excessivo do caule foi reduzido à ponto de não se diferenciar do controle (W) (Figura 5B). No entanto, quando a suplementação ocorreu nos tratamentos FR + r a redução foi significativa ( $p \leq 0,05$ ), mas com comprimento caulinar superior ao controle (W). Em *Arabidopsis*, a luz azul age através do CRY1 que atua nas auxinas e giberelinas que, por sua vez, irão promover modificações na parede celular, bem como também, afetam a expressão de vários genes envolvidos na repressão do crescimento do caule (Folta et al., 2003; Li et al., 2012). Por outro lado, quando a intensidade da luz azul cai, SAS se intensifica, a extensibilidade da parede celular do caule é aumentada devido a estimulação da atividade transcricional de genes relacionados à expansão celular, como os genes das expansinas (Keuskamp et al., 2011). Esses dados sugerem que a luz azul possa agir no sentido de ativação dos criptocromos e, estes na redução nos níveis de auxinas nas plantas.

Outros efeitos observados pela suplementação com luz azul no G e FR + r foram o aumento na área foliar total, redução do comprimento / largura foliar, redução da AFE, aumento dos pigmentos e aumento de MS. Porém, nos tratamentos com G na presença de B houve maior teor de pigmentos por área e por massa, e aumento da DAF. O benefício no ganho de MS pela luz azul nos tratamentos G também foi evidenciado no estudo de Johkan et al (2012) em que testaram 3 tipos de LEDs verdes (picos nos comprimentos de onda 510, 524 e 532 nm) e o maior incremento de MS foi obtido com o LED verde que possuía a maior proporção de luz azul (o LED com pico em 510 nm e base larga de emissividade). No entanto, os efeitos da luz azul nos tratamentos com FR foram menos evidentes, ou seja, não promoveram uma reversão completa das características relacionadas ao estiolamento, havendo apenas um leve aumento do teor de clorofilas e nenhuma alteração da DAF, possivelmente devido a uma interferência negativa dos fitocromos sob os criptocromos. Sob influência do FR, a menor DAF e o maior comprimento / largura foliar associadas ainda a maior RMC e comprimento dos entrenós propiciaram possivelmente uma maior interceptação de luz mesmo com menores teores de pigmentos (FR) (Fraser et al., 2016). Já as respostas do B sobre o G promoveram maior adensamento de folhas (6D), porém o aumento do teor de

pigmentos foi mais relevante (Figuras 8 e 9) do que a própria interceptação de luz (Figura 6) ocorrendo uma maximização da captura de luz por meio do aumento nos teores de pigmentos fotossintéticos e um sistema mais robusto de coleta de luz que representam estratégias significativas para melhorar a eficiência fotossintética e a produção de biomassa (Jin et al., 2016; Moriwaki et al., 2019).

As respostas de crescimento em FR + r e G são descritas por serem mediadas por mecanismos inicialmente distintos (Zhang & Folta, 2012) mas que podem ter algum *crosstalk* na cascata de sinalização. Estudos moleculares têm mostrado que os genes associados a SAS tradicionalmente induzidos por FR (como HAT4 e PIL1) não são expressos nas respostas SAS induzidos pela luz verde (Wang & Folta, 2013). As diferenças de expressão gênica estão em concordância com os dados apresentados aqui e analisados estatisticamente de maneira conjunta pela análise de componentes principais focando-se no PC2 (Figura 18C). Pelo PC2 há a completa separação das respostas induzidas por B sobre o G das respostas de B sobre o FR + r e R (Figura 18A e C). Além disso, os dados referentes a regressão múltipla multivariada demonstram a separação dos grupos R e FR + r com suplementação de B dos grupos representados por G como luz de base (Figura 17 e 18). Uma possível explicação seria que os criptocromos atuariam anulando ou induzindo a degradação do PHYA ou alguma interferência negativa desencadeada pelo PHYA sobre o CRY. Isso poderia resultar na semi ou completa degradação/inibição do PHY's pelos criptocromos (ou vice-versa) enquanto que no FR + r há maior concentração de mRNA phyA induzindo maior acúmulo de PHYA e assim ocasionando respostas menos evidentes que no tratamento G, no qual esperaríamos respostas intermediárias induzidas tanto por CRY's quanto por PHY's.

## 5.2 Ação da luz azul sobre o desestiolamento

Considera-se que as respostas fotomorfogênicas desencadeadas pela luz branca seja uma colaboração de todos os fotorreceptores ativos uma vez que a luz branca é composta por diferentes comprimentos de onda que variam de 350 a 700 nm (Figura 2) possibilitando que as plantas se desenvolvam desestioladas (Figura 3) (Darko et al., 2014; Kircher et al., 2002). No entanto, não é claro qual é papel de cada um dos diferentes comprimentos de onda no processo de indução e consequentemente sinalização de vias de regulação do desenvolvimento (Folta & Maruhnich, 2007; Smith et al., 2017). A percepção das qualidades espectrais nos comprimentos de onda do azul e vermelho são realizados majoritariamente

pelos criptocromos e fitocromos, respectivamente (Kang, et al., 2009; Fraser et al., 2016; Liu et al., 2016). Mais detalhadamente, esses fotorreceptores apresentam uma ampla faixa espectral de absorção tendo picos no azul e vermelho respectivamente, mas eles podem absorver em outras bandas espectrais. Considera-se que também são sensíveis a luz verde, mas sua eficiência em assimilar e utilizar o sinal é pobre em relação à sua capacidade de responder ao azul e vermelho (Folta & Maruhnich, 2007).

A co-ação de fitocromos e criptocromos tem sido relatada por pelo menos dois mecanismos. Em primeiro lugar, os fitocromos podem interagir diretamente com os criptocromos para coordenar a respostas da luz vermelha / vermelha-distante e as respostas de luz azul. Interações físicas responsivas à luz entre PHYA e CRY1, PHYB e CRY2, ou PHYB e CRY1 foram relatadas (Hughes et al., 2012; Wang et al., 2018). Esses autores ainda observaram que o CRY1 aumenta a sensibilidade da sinalização sobre PHYB e que o CRY1 não se liga ao PHYB no escuro, sugerindo que o CRY1 possa regular negativamente a atividade do PHYB (Hughes et al., 2012). Em segundo, fitocromos e criptocromos podem interagir com os *Fatores de Interação a Fitocromos* (PIFs) como adjuvantes à coordenação e sinalização de diferentes respostas fisiológicas e bioquímicas (Wang et al., 2018). Além desses mecanismos previamente descobertos, foi introduzido recentemente os inibidores de criptocromo de luz azul (BIC's) (Wang et al., 2016). As proteínas BIC's interagem com criptocromos fotoexcitados para suprimir todas as reações fotoquímicas presentemente conhecidas de criptocromos (Wang et al., 2016; Wang et al., 2018), sendo, portanto, um regulador transcricional chave para compreender a interação de CRY's e PHY's em resposta a luz verde ou a interferência do B sobre o R ou FR + r, por exemplo.

Diferentes respostas bioquímicas, fisiológicas e morfológicas sugerem que a luz verde impulsiona a redução e inativação dos criptocromos (Chen et al., 2004; Fraser et al., 2016). Considera-se que os criptocromos que possuem o cromóforo (FAD) ligado podem se converter para uma forma semi-reduzida (FADH') ou totalmente reduzido (FADH). A forma semi-reduzida é a forma ativa dos criptocromos, enquanto a totalmente reduzida é uma forma inativa para os fotorreceptores (Bouly et al., 2007; Folta & Maruhnich, 2007). Os tratamentos com luz azul aumentam a forma ativa dos CRY's e não há evidências de fitocromos ativos nessa condição (Yu et al., 2010; Liu et al., 2016). Bouly et al. (2007) mostram que a luz verde (563 nm) pode reverter o efeito da luz azul no alongamento do hipocótilo durante o desenvolvimento de plântulas e que esse efeito é dependente do CRY, apoiando o modelo de reversibilidade verde-azul. Nos dados apresentados, pode-se evidenciar consequências

morfológicas de muitas dessas interações e evidenciados na Figura 3, particularmente o alto grau de estiolamento das plantas crescidas em G e intenso desestiolamento promovido pelo aumento de B sobre o G (Figuras 17, 5B, 8C). Sugere-se que a ativação dos criptocromos pela luz azul seja um mecanismo chave na promoção do desestiolamento das plantas cultivadas no verde. Assim, a luz verde é considerada como “inerte” sobre a atividade dos criptocromos.

Pela análise de regressão múltipla multivariada (Figura 17) observa-se que sob G as plantas apresentaram menores teores de clorofilas totais por unidade de área e elevados por massa ao passo que apresentaram alta relação comprimento / largura das folhas. Ainda sob R, baixos teores de clorofilas por área e massa simultaneamente. Salienta-se que sobre R haveria alto grau de ativação dos fitocromos, particularmente com o acúmulo de PHYB (Nagy & Schafer, 2002). A presença de azul sobre os diferentes tratamentos (incluindo o W) promove gradativamente aumento nos teores de clorofilas por unidade de área e massa. No entanto, quanto maiores os percentuais de azul na composição espectral da luz de crescimento das plantas, maiores seriam os graus de ativação dos CRY's, bem como maior fluência de R promoveria aumento do grau de ativação de PHYB. Cultivo em R teria, portanto, alto grau de ativação de PHYB, mas as plantas de alface apresentaram baixos teores de clorofilas (Figura 8 e 9) e com algum grau de estiolamento (Figura 3). Portanto, PHYB isoladamente possui limitada capacidade de promoção do desestiolamento. Ainda, se o modo de co-ação fosse positiva, R suplementada de B seria completamente desestiolado, o que não foi demonstrado experimentalmente. A presença do R limita a ação do B, enquanto tratamentos ausentes de R estão associados a maiores teores de clorofilas por unidade de área e massa, maiores espessuras das paredes celulares, maiores adensamentos dos cloroplastos e menores comprimentos dos entrenós quando na presença de B. Todas essas características foram presentes no B puro bem como nos tratamentos G + b. Plantas crescidas no G foram consideradas as mais estioladas por apresentarem baixo teor de clorofilas por unidade de área e alta por massa além de limbo foliar muito fino e perda de identidade do parênquima paliçádico. Ainda, paredes celulares muito finas e baixo acúmulo de conteúdo citoplasmático propiciaram uma planta de baixo teor de clorofila por área ter alta por massa, simplesmente por ter baixo acúmulo de MS em seus tecidos, mas não por uma resposta direta no acúmulo de clorofilas e formação de um cloroplasto com tilacóides adensados e eletrodensos. A presença de B sobre o G muda drasticamente esse fenótipo e sugere-se que os maiores graus de ativação das proteínas CRY, sem interferência negativa dos PHY's, resultaram em fenótipos desestiolados similares ao B. O B, por sua vez, apresentou alto teor de clorofila por massa e

por área (assim como o G) com cloroplastos adensados. Sugere-se indução direta na biossíntese e acúmulo de clorofilas e a formação de um aparato coletor de luz robusto. Circunstancialmente, paredes celulares espessadas (Figura 13) reduziram a razão clorofilas/MS (Figura 9). A presença de B sobre o R induz apenas parcialmente o desestiolamento. De maneira ainda menos efetiva foi a ação do B sobre o FR + r (Figuras 3 e 17).

As respostas biológicas desencadeadas pela luz azul resultam num conjunto de cromoproteínas semi-reduzidas (ativas) enquanto no verde resultam em totalmente reduzidas (inativas) (Folta & Maruhnich, 2007). Desse modo, quanto maior o grau de ativação desencadeada pela luz azul, teoricamente promoveria a transição de um estado estiolado para um desestiolado.

A luz verde assim como a luz vermelha-distante contribui para a SAS (Fraser et al., 2016). Para determinar se esta resposta do verde foi mediada por uma classe conhecida de fotorreceptores (especialmente a reversão conhecida das respostas de CRY), múltiplos mutantes *cry* e *phy* foram testados em diferentes intensidades de luz verde adicionadas a um fundo vermelho e azul constante. Os resultados mostraram que esses mutantes, incluindo duplos mutantes, também exibiam SAS induzidos por verde. Assim, foi sugerido pelos autores da pesquisa que a resposta SAS induzida pelo verde possa ser mediada por uma nova via de sinalização (Zhang & Folta, 2012). Como citado anteriormente, os estudos genéticos trouxeram avanços para essa hipótese, visto que os genes que são fortemente expressos pela baixa razão R:FR na presença de luz verde não apresentam o mesmo padrão de expressão, indicando um mecanismo de sinalização diferente (Wang & Folta, 2013). Os resultados aqui demonstrados indicam vias inicialmente distintas que possam ter um *crossstalk*. Em primeiro lugar, ao suplementar luz azul em ambas as qualidades de luz (G e FR+ r) a reversão de respostas ligadas ao estiolamento foram diferentes, como por exemplo o comprimento do caule que teve o alongamento extremamente inibido em G + b, no entanto não promoveu uma intensa redução do crescimento deste órgão no FR + r + b (Figuras 5B, 17 e 18). Em segundo, a suplementação de FR sobre o B (B + FR) promoveu mudanças sutis em parâmetros univariados do crescimento das plantas (Figuras 5B, 5C, 6C) que, agrupados, mostraram algum grau de estiolamento promovido pelo FR sobre o B. Enfatiza-se a redução de densidade de área foliar (Figura 6D), que se traduz numa copa da planta menos compacta quando comparada ao B. Ademais, os parâmetros anatômicos demonstram perda da identidade do parênquima paliçádico (Figura 12) e presença de paredes celulares mais finas (Figura 13),

mas com a presença de tilacóides ricamente adensados nos cloroplastos (Figura 16) e elevados teores de pigmentos fotossintéticos (Figura 8). Assim sugere-se que algumas dessas respostas que resultam na SAS são governadas exclusivamente pela falta de ação dos criptocromos e outras pela falta de ação dos fitocromos. PHYA é o principal fotorreceptor responsável por perceber e mediar várias respostas à luz FR e o PHYB é o fitocromo predominante que regula o desestiolamento em R (Li et al., 2011). Deste modo, no tratamento B + FR esperaria-se que tivesse mais PHYA do que PHYB, pois FR inibe a atividade do PHYB (Nagy & Schafer, 2002). O estiolamento promovido pelo FR sobre o B sugere um *crossstalk* entre vias promovidas por CRY e PHY e possivelmente uma ação negativa forte do PHYA sobre os CRY. Ainda, apoiando essa ação negativa, a atuação de B sobre FR + r resulta em desestiolamento parcial em FR + r + b100 e em plantas mais estioladas com menor fluência do azul. Cultivo em FR + r resultam em altos níveis de PHYA que interagem negativamente com CRY, resultando em baixa ação do CRY na promoção do desestiolamento. Um componente quantitativo CRY ativo livre é apontado como relevante nestes processos (desestiolamento).

Plantas crescidas em puro vermelho também se apresentam estioladas (Figura 3). Embora menos estioladas que as crescidas em FR + r, claramente no R apresentam alta relação de comprimento / largura foliares e baixos teores de clorofilas quando comparado ao controle crescida na luz branca (W). A suplementação de B sobre o R, promove algum grau de desestiolamento que ainda é inferior ao G + b100 (Figuras 3 e 17). Considerando que ambos tratamentos têm níveis similares de B ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) o grau de ativação dos criptocromos deveria ser também similar. Então o que explica plantas sob os tratamentos R + b100 serem mais estioladas que as G + b100? Adiciona-se nessa pergunta o fato de que G não ativa nem PHY e nem CRY. Os dados coletados sugerem também que o PHYB possa interagir negativamente com as proteínas CRY. No entanto, essa interação deve ser mais fraca uma vez que plantas FR + r + b100 são mais estioladas que as R + b100. Os dados fortemente sugerem uma ação negativa dos PHY (PHYA e PHYB) sobre os CRY. No entanto, não se sugere que a ação de PHYB possa induzir o estiolamento. Apenas, e isoladamente, PHYB possui ação fraca na promoção do desestiolamento. Embora estioladas, plantas crescidas no R eram bem diferentes das crescidas no G. Tanto no R como no G puros não há ação de CRY. Diferenças entre as plantas crescidas no R e G são decorrentes de PHYB no R apenas.

Usando-se de análises de regressão múltipla multivariada nos quais incorpora efeitos do azul, verde, vermelho, vermelho-distante e as interações vermelho:azul, verde:azul e



azul:vermelho-distante bem como de uma PCA e por meio de seus componentes principais 1 e 2, evidenciam que nos quadrantes do *Scatter Plot* da PCA é possível observar a completa separação do tratamento com a luz verde (Figura 17 e 18). Contudo a suplementação com luz azul acrescido de diferentes intensidades (G + b25; G + b50) mostram-se aumentos progressivos em direção, possivelmente, a maior atividade de criptocromos, separando as respostas estimuladas pela luz verde da azul. Os dados ainda sugerem que mesmo a menor intensidade de azul promoveu a ativação dos criptocromos, e mesmo havendo inibição pelo FR (PHYA), as respostas morfológicas condicionam para uma intensa redução do comprimento dos entrenós e aumento no acúmulo de pigmentos, além do aumento DAF e redução de AFE. Assim sendo, sugere-se que há uma saturação da resposta estimulada pela luz azul mesmo em baixas intensidades, o que não acontece quando da presença de R ou FR+r, suplementado de B.

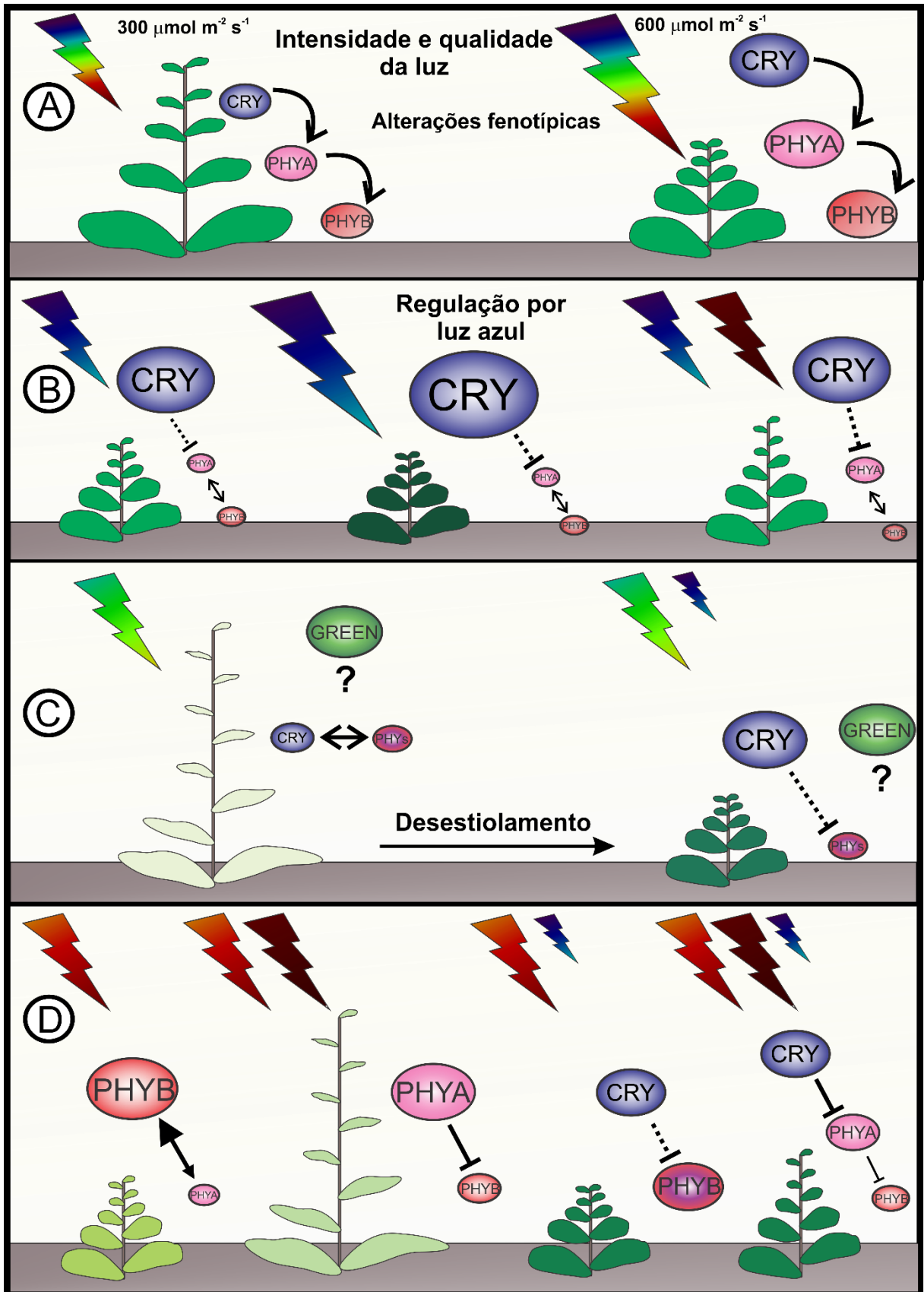
Ao interpretar conjuntamente os dados da PCA e regressão múltipla multivariada fica evidente que as análises estatísticas discriminam os efeitos morfo-fisiológico que as plantas adotaram em resposta a luz R e FR + r que são distintas do G. O PC1 apresenta maiores correlações com os dados fenotípicos representados por crescimento primário (comprimento/largura da folha, DAF), crescimento derivado (AFE) e anatomia (espessura do mesófilo). O PC2 houve a separação entre dois grupos com maior explicação para o grupo de pigmentos (Chla+b por unidade de área e massa). Claramente, todos os tratamentos em que houve fornecimento de “R” foram discriminados daqueles que não o continham. Sabe-se que R estimula a atividade dos fitocromos, independente se há ou não a presença de FR, que por sua vez poderia levar a aumentos diferenciais de PHYA ou PHYB e interferência dos fitocromos é discriminada daquela promovida pelos criptocromos pelo PC2. Ainda pelo PC2, a intensidade e a qualidade proporcionados por B podem estar associadas com as alterações das características fenotípicas e aos dos pigmentos (Figura 3, 8 e 9).

Um possível modelo de co-ação (Figura 19) em que os PHY's podem inativar/inibir as respostas desencadeadas pelos CRY (ou vice-versa) pode ser observado pelo fenótipo que as plantas apresentaram (Figura 3) e esquematizado na Figura 19 e Tabela 4 nos quais a luz branca (W) promove a ativação tanto dos fitocromos quanto dos criptocromos e o aumento da intensidade (2W) faz aumentar ambos. Os criptocromos são ativados na presença de luz azul (B) e o aumento da intensidade (2B) também aumenta o grau de ativação dessas proteínas e características mais desestioladas são apresentadas pelas plantas nessas condições. Na presença de luz verde (G) pressupõe-se que ambas as proteínas estejam inativas, de modo que

a adição de azul propicia a ativação dos CRY's nos tratamentos G +b. Na luz vermelha (R) há prevalência de PHYB, cuja presença inibe o PHYA e aumento da irradiância vermelha (2R) aumenta os produtos do gene phyB. Ao adicionar luz azul (B) no vermelho há uma limitada ação desestioalizante promovida pelo B, assim, sugere-se que nessa condição haja limitada ação dos CRY's. Há prevalência de PHYA nos tratamentos com vermelho-distante (FR) em relação a PHYB e ao adicionar B também há ativação de CRY's, que é fortemente reprimida por PHYA. Assim a ação negativa do PHYA sobre o CRY é considerada mais intensa que a do PHYB sobre o CRY (Figura 3).

**Tabela 4** – Qualidades luminosas e o possível grau de ativação dos fotorreceptores. Mínima ativação (-); baixa ativação (+); média ativação (++); alta ativação (+++); muito alta ativação (++++). G, luz verde; G + b, luz verde acrescida de azul; R, vermelho; 2R Vermelho a 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; R + b, Vermelho acrescido de azul; FR + r, vermelho-distante com vermelho; FR + r + b, vermelho-distante com vermelho e acrescido de azul; W, luz branca; 2W, luz branca a 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; B, azul; 2B, luz branca a 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para mais detalhes dos tratamentos consulte Tabela 1. Todos os tratamentos totalizam 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , excetuando-se o 2R, 2W e 2B.

Qualidades de luz	Fitocromos		Criptocromos
	PHYA	PHYB	
G	-	-	-
G + b	-	-	+
R	-	+++	-
2R	-	++++	-
R + b	-	++	+
FR + r	+++	+	-
FR + r + b	++	+	+
W	+	+	+
2W	++	++	+++
B	-	-	+++
2B	-	-	++++



**Figura 19** – Representação esquemática das possíveis respostas fotomorfológicas em relação aos tratamentos de luz empregados. A luz branca é composta por diferentes comprimentos de onda possibilitando a ativação de todos os fotorreceptores e o aumento da intensidade luminosa aumenta a ativação desses fotorreceptores promovendo desenvolvimento de plantas mais desestioladas na maior irradiância (A). As respostas biológicas

desencadeadas pela luz azul resultam num conjunto de cromoproteínas CRY's ativas promovendo formação de plantas desestioladas. Aumento da intensidade do azul aumenta o grau de desestiolamento via aumento de CRY ativa. A adição de FR ocorre ativação de PHYA e promoção de algum grau de estiolamento. Sugere-se que as proteínas PHYA atuam antagonizando a atividade de CRY como mostrado no tratamento no qual houve fornecimento de vermelho-distante sobre níveis similares de azul (300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (B). A luz verde possui mínima ativação dos fotorreceptores prevalecendo o fenótipo altamente estiolado, enquanto o fornecimento da luz azul promove a ativação e prevalência dos efeitos dos criptocromos com mínima resposta dos fitocromos e promoção do desestiolamento com baixos níveis de azul (C). Luz vermelha ocorre prevalência de PHYB e promoção de limitado grau de desestiolamento quando comparado ao verde. Enquanto no vermelho-distante tem-se um aumento de PHYA que inibe o PHYB e promoção de maior grau de estiolamento que no tratamento com vermelho puro. Após suplementação com azul há ativação do CRY mas esse é inativado pelos PHY's. A suplementação de azul sobre o vermelho promove ativação de CRY e de PHYB, no entanto existe uma ação negativa (fraca) de PHYB sobre o CRY de modo que o desestiolamento não seja completo. Em paralelo, o fornecimento de azul sobre o Vermelho e vermelho-distante os criptocromos não são eficientes para a completa inativação e reversão do fenótipo estiolado, devido a mais intensa atuação do PHYA na inibição das respostas estimuladas pelo CRY (D).

### 5.3 Alterações estruturais e ultraestruturais nas folhas em resposta a luz

A forma e o tamanho das folhas bem como a disposição delas no corpo da planta (Tsukaya, 2005; Sarlikioti et al., 2011) são fatores de essencial importância para o sucesso das plantas, pois são órgãos fotossintéticos. Para uma melhor eficiência na captação de energia luminosa as folhas devem ser largas, e para facilitar as trocas gasosas elas devem ser finas (Zheng & Van Labeke, 2017). Quando as plantas crescem em ambientes de alta luminosidade, suas folhas são geralmente mais espessas, têm cutícula mais espessa e menor área foliar específica, sendo geralmente mais verticais que folhas de sombra (Sanches & Valio, 2006). Todos os tratamentos ao serem suplementados com luz azul exibiram aumento da espessura foliar (Figura 11). De modo similar, Schuerger et al. (1997) relataram que a espessura da folha aumentou quando a luz vermelha foi suplementada com a luz azul. Folhas desenvolvidas em baixa irradiância possuem alta AFE contribuindo para produzir superfícies para captura de energia a um custo metabólico menor (Sanches & Valio, 2006). Ainda, frequentemente, exibem aumento de seus espaços intercelulares em baixa irradiância (Lee et al., 1990). Esses espaços espalham aleatoriamente a luz dentro da folha, aumentando a probabilidade de absorção (Lee et al., 1990). Maiores espaços intercelulares foram observados nos tratamentos com as luzes verde e vermelho-distante (Figura 12).

A expansão foliar envolve dois eventos de desenvolvimento: proliferação celular e expansão celular. A expansão bidimensional (comprimento e largura) das folhas é determinado primariamente pelo estabelecimento dorso-ventral, (Tsukaya, 2002, 2006). As características morfológicas dos lados abaxiais e adaxiais das folhas são governadas por muitos genes. Os genes REVOLUTA (REV), PHABUBOLA (PHB) e PHAVOLUTA (PHV)

estão envolvidos na adaxialização, enquanto a família de genes KANADI e YABBY estão envolvidos na abaxialização (Tsukaya, 2005). Em *Arabidopsis* sob condições de baixa luminosidade, as células do parênquima paliçádico são redondas e desenvolvem-se em uma camada. Em contraste, sob condições de alta luminosidade as células do parênquima paliçádico se desenvolvem em duas ou três camadas e são colunares como resultado do crescimento polarizado na direção da folha (Tsukaya, 2005). Os tratamentos com a presença de FR perderam a identidade das células adaxiais evidenciados na Figura 12, no entanto não é possível distinguir entre uma abaxialização do parênquima paliçádico ou uma perda da identidade adaxial daquelas células.

Em relação ao crescimento longitudinal, ele é governado por genes ROTUNDIFOLIA3 (ROT3), que regula o crescimento polarizado das células foliares em relação ao comprimento, e o gene ROTUNDIFOLIA4 (ROT4), que especifica o número de células no eixo longitudinal, (Narita et al., 2004). O crescimento transversal (largura) é influenciado pelo gene ANGUSTIFOLIA (AN) (Tsuge et al., 1996). Plantas de *Arabidopsis* que desenvolvem características de SAS apresentam pecíolos mais alongados em relação ao limbo foliar em resposta à luz vermelha e vermelha-distante percebidas pelos fitocromos (PHYA a E). Essas diferenças entre os tamanhos dos pecíolos das folhas de plantas cultivadas sob condições de baixa luminosidade e alta luminosidade são atribuíveis ao comprimento de cada célula no pecíolo, enquanto as diferenças entre os tamanhos das lâminas foliares sob luz fraca e alta luz representam a soma do número e tamanho de células na lâmina foliar (Tsukaya et al., 2002). Os tratamentos FR e G desenvolveram plantas com características de SAS evidenciando-se maiores razões comprimento / largura foliar e ao adicionar luz azul, mesmo em pequenas quantidades, promoveu uma redução no crescimento longitudinal das folhas resultado da possível ativação dos criptocromos e interferência no padrão de expressão daqueles genes.

A absorção de luz também dependerá dos teores de clorofilas (Zheng & Van Labeke, 2017). A luz azul induziu a formação de mais cloroplastos e com maior grau de empilhamento de tilacóides bem como uma membrana mais eletrodensa quando visualizada pela microscopia de transmissão. Em conjunto sugere que o azul possibilitou o aumento na expressão e acúmulo de diferentes enzimas que regulam a síntese de clorofila (Wang et al., 2010). A suplementação com luz azul propiciou o incremento dos teores de clorofilas por unidade de área em todos os tratamentos, especialmente nos tratamentos com G. Desse modo, espera-se cloroplastos mais robustos e eficientes, resultante da maior eletrodensidade que, em

tese, estariam associados a maiores acúmulos de proteínas dos fotossistemas (Figura 15). Por consequência, esperaria maiores capacidades fotossintéticas dessas plantas o que resultaria em maiores ganhos de biomassa por unidade de área foliar. Assim, folhas mais eficientes resultaram em maiores acúmulos de biomassa total das plantas suplementadas de B em comparação à respectiva luz de base. Salienta-se que todos os tratamentos (exceto o 2W, 2B e 2R, os quais eram cultivados em  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) estavam submetidos a irradiância fotossinteticamente ativa similar ( $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Tabela 1). Partindo-se do princípio que as plantas eram cultivadas em ambientes controlados, umidade relativa alta e sem limitações hídricas e difusivas para a fotossíntese, maiores acúmulos de biomassa seriam consequências de maiores taxas de absorção da luz em função de maiores teores de clorofilas (Moriwaki et al., 2019) e espessuras foliares (Falcioni et al., 2017) e resultando em maiores taxas de fixação e C.

Características de fotoproteção são encontradas quando as plantas são iluminadas com luz vermelha ou azul, principalmente em altas intensidades (Oguchi et al., 2011). As folhas são mais espessas como possível proteção do sistema fotossintético quando há excesso de intensidade da luz (Figura 11) (Slattery et al., 2016). Nos tratamentos de maiores intensidades e na presença de azul, as folhas desenvolveram paredes mais grossas nas células epidérmicas e também uma camada epicuticular mais grossa e eletrodensa (Figura 13). Folhas de pimenta na ausência de fótons azuis ou uma redução de R:FR diminuíram a espessura dos tecidos do mesofilo e reduziram essas características de fotoproteção (Slattery et al., 2016).

O desenvolvimento do cloroplasto influencia o desenvolvimento das plantas devido à sua função no fornecimento de energia, aminoácidos, lipídios, e outros metabolitos essenciais para o crescimento normal (Pogson et al., 2015). A ultraestrutura dos cloroplastos (Figura 15) muda conforme o tipo de luz aplicada durante o crescimento das plantas. Os efeitos da qualidade da luz no desenvolvimento dos cloroplastos têm profundas consequências na absorção da luz bem como no acúmulo de pigmentos fotossintéticos e de proteínas estromais relacionadas à fixação de C cuja ultraestrutura reflete um mecanismo integrante da composição foliar para maximizar a eficiência da absorção da luz (Moriwaki et al., 2019). Plantas de milho cultivadas em luz branca (W) e vermelha (R) apresentaram cloroplastos com características semelhantes, porém quando submetidas a vermelho-distante (FR) reprimiram a formação da proteína do centro de reação do fotossistema I e aumentaram as do fotossistema II tanto na bainha do feixe quanto nas células do mesofilo (Eskins et al., 1985). De modo geral, a suplementação de B nos diferentes tratamentos promoveu maior adensamento dos

tilacóides nos cloroplastos das plantas de alface (Figura 16) bem como em folhas de uva (*Vitis vinifera* L.) o desenvolvimento de lamelas de cloroplasto e tilacóides em comparação com a luz vermelha e verde (Poudel et al., 2008). As eletromicroscopias mostram evidências do aumento dessas estruturas com suplementação com a luz azul (Figura 16). Portanto, o conteúdo de pigmentos fotossintéticos e o desenvolvimento dos cloroplastos nas folhas de alface foram notavelmente promovidos pela luz azul, mas foram inibidos pela luz verde ou vermelha (Figuras 16 e 14).

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados fornecem suporte para a hipótese de que a luz azul é capaz de inibir ou reduzir respostas características do estiolamento em plantas de alface. No entanto, o efeito é dependente não apenas da qualidade como também da intensidade em que as plantas são submetidas. De maneira geral, as plantas submetidas as maiores intensidades de azul isoladamente ou em combinação obtiveram os maiores ganhos de MS e com características menos estioladas. Há evidências que as respostas fisiológicas da adição da luz azul sob a luz verde desencadeiem mecanismos distintos da luz azul sob luz vermelha ou do vermelho-distante, havendo uma possível interação negativa dos fitocromos sobre os criptocromos.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; YAMAMOTO, K.T.; NAGATANI, A.; FURUYA, M. Characterization of green tissue-specific phytochrome isolated immunochemically from pea Seedlings. **Plant Cell Physiology**, v.26, p.1387–1399, 1985.
- AHMAD, M.; CASHMORE, A.R. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with the characteristics of a blue-light photoreceptor. **Nature**, v.366, p.162–166, 1993.
- AHMAD, M.; CASHMORE, A.R. Seeing blue: the discovery of cryptochrome. **Plant Molecular Biology**, v.30, p.851–861, 1996.
- BOCCALANDRO, H.E.; MAZZA, C.A.; MAZZELLA, M.A.; CASAL, J.J.; BALLARÉ, C.L. Ultraviolet B radiation enhances a phytochrome-B-mediated photomorphogenic response in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.126(2), p.780–788, 2001.
- BOULY, J.P.; SCHLEICHER, E.; DIONISIO-SESE, M.; VANDENBUSSCHE, F.; STRAETEN, D.V.D.; BAKRIM, N.; MEIER, S.; BATSCHAUER, A.; GALLAND, P.; BITTL, R.; AHMAD, M. Cryptochrome blue-light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, p.9383–9391, 2007.
- BRIGGS, W.R.; HUALA, E. Blue-light photoreceptors in higher plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.15:1, p.33–62, 1999.
- BRITZ, J.S.; SAGER, J.C. Photomorphogenesis and photoassimilation in soybean and sorghum grown under broad spectrum or blue-deficient light sources. **Plant Physiology**, v.94, p. 448–454, 1990.
- BROWN, C.S.; SCHUERGER, A.C.; SAGER, J.C. Growth and photomorphogenesis of pepper plants under red light-emitting diodes with supplemental blue or far-red lighting. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.120, p.808–813, 1995.
- BUTLER, W.L.; NORRIS, K.H.; SIEGELMAN, H.W.; HENDRICKS, S.B. Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.45, p.1703–1708, 1959.
- CARVALHO, S.D.; FOLTA, K.M. Environmentally modified organisms expanding genetic potential with light. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.33, p.486–508, 2014.
- CASAL, J.J. Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. **Annual Review of Plant Biology**, v.64, p.403–27, 2013.
- CASAL, J.J.; LUCCIONI, L.G.; OLIVERIO, K.A.; BOCCALANDRO, H.E. Light, phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v.2, p.625–36, 2003.

CHEN, M.; CHORY, J.; FANKHAUSER, C. Light signal transduction in higher plants. **Annual Review of Genetics**, v.38, p.87–117, 2004.

CHEN, X.; GUO, W.; XUE, X.; WANG, L.; QIAO, X. Growth and quality responses of ‘Green Oak Leaf’ lettuce as affected by monochromic or mixed radiation provided by fluorescent lamp (FL) and light-emitting diode (LED). **Scientia Horticulturae**, v.172, p.168–175, 2014.

CLACK, T.; MATHEWS, S.; SHARROCK, R.A. The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. **Plant Molecular Biology**, v.25, p.413–427, 1994.

COLE, B.; KAY, S.A.; CHORY, J. Automated analysis of hypocotyl growth dynamics during shade avoidance in Arabidopsis. **Plant Journal**, v.65,6, p.991–1000, 2011.

COPE, K.R.; BUGBEE, B. Spectral effects of three types of white light-emitting diodes on plant growth and development: absolute versus relative amounts of blue light. **HortScience**, v.48, p.504-509, 2013.

COPE, K.R.; SNOWDEN, M.C.; BUGBEE, B. Photobiological interactions of blue light and photosynthetic photon flux: effects of monochromatic and broad-spectrum light sources. **Photochemistry and Photobiology**, v.90, p.574–584, 2014.

CROCE, R.; AMERONGEN, H. Natural strategies for photosynthetic light harvesting. **Nature Chemical Biology**, v. 10, p.492–501, 2014.

DARKO, E.; HEYDARIZADEH, P.; SCHOEFS, B.; SABZALIAN, M.R. Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism. **Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences**, v.369, p.1640– 20130243, 2014.

ESKINS, K.; DUYSEN, M.; DYBAS, L.; MCCARTHY, S. Light quality effects on corn chloroplast development. **Plant Physiology**, v.77, p.29–34, 1985.

FALCIONI, R.; MORIWAKI, T.; BONATO, C.M.; DE SOUZA, L.G.; NANNI, M.R.; ANTUNES, W.C Distinct growth light and gibberellin regimes alter leaf anatomy and reveal their influence on leaf optical properties. **Environmental and Experimental Botany**, v.140, p.86–95, 2017.

FALCIONI, R.; MORIWAKI, T.; BENEDITO, E.; BONATO, C.M.; DE SOUZA, L.G.; ANTUNES, W.C. Increased gibberellin levels enhance the performance of light capture efficiency in tobacco plants and promote dry matter accumulation. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v.30, p.235–250, 2018.

FANKHAUSER, C.; BATSCHAUER, A. Shadow on the plant: a strategy to exit. **Cell**, v.164, p.15–17, 2016.

FLINT, L.H.; MCALISTER, E.D. Wave lengths in the visible spectrum inhibiting the germination of light-sensitive lettuce seeds. **Smithsonian Miscellaneous Collections**, v.96, p.1–8, 1937.

- FOLTA, K.M. Green light stimulates early stem elongation, antagonizing light-mediated growth inhibition. **Plant Physiology**, v.135, p.1407–1416, 2004.
- FOLTA, K.M.; CARVALHO, S.D. Photoreceptors and control of horticultural plant traits. **HortScience**, v.50, p.1274–1280, 2015.
- FOLTA, K.M.; MARUHNICH, S.A. Green light: a signal to slow down or stop. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.3099–3111, 2007.
- FOLTA, K.M.; PONTIN, M.A.; KARLIN-NEUMANN, G.; BOTTINI, R.; SPALDING, E.P. Genomic and physiological studies of early cryptochrome 1 action demonstrate roles for auxin and gibberellin in the control of hypocotyl growth by blue light. **The Plant Journal**, v.36, p.203–214, 2003.
- FRANKLIN, K.A. Shade avoidance. **New Phytologist**, v.179, p. 930–944, 2008.
- FRASER, D.P.; HAYES, S.; FRANKLIN, K.A. Photoreceptor crosstalk in shade avoidance. **Current Opinion in Plant Biology**, v.33, p.1–7, 2016.
- FURUYA, M. Molecular properties and biogenesis of phytochrome I and II. **Advances in Biophysics**, v.25, p.133–67, 1989.
- FURUYA M. Phytochromes: their molecular species, gene family and functions. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.44, p.617–45, 1993.
- HENDRICKS S.B.; VAN DER WOUDE W.J. How Phytochrome Acts – Perspectives on the Continuing Quest. In: Shropshire W., Mohr H. (eds) **Photomorphogenesis**. Encyclopedia of Plant Physiology (New Series), vol 16. Springer, Berlin, Heidelberg, 1983.
- HOANG, N.; BOULY, J.; AHMAD, M. Evidence of a light-sensing role for folate in *Arabidopsis* cryptochrome blue-light receptors. **Molecular Plant**, v.1, p.68–74, 2008.
- HOFFMAN, P.D.; BATSCHAUER, A.; HAYS, J.B. PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. **Molecular Genetics and Genomics**, v.253, p. 259–265, 1996.
- HOFFMANN, W. A.; POORTER, H. Avoiding bias in calculations of relative growth rate. **Annals of Botany**, v.90, v.1, p.37–42, 2002.
- HUGHES, R.M.; VRANA, J.D.; SONG, J.; TUCKER, C.L. Light-dependent, darkpromoted interaction between *Arabidopsis* Cryptochrome 1 and Phytochrome B proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.287, p.22165–22172, 2012.
- JIN, H.; LI, M.; DUAN, S.; FU, M.; DONG, X.; LIU, B.; FENG, D.; WANG, J.; WANG, H-B. "Optimization of light-harvesting pigment improves photosynthetic efficiency." **Plant Physiology**, v.172.3 p.1720–1731, 2016.

JOHKAN, M.; SHOJI, K.; GOTO, F.; HASHIDA, S.; YOSHIHARA, T. Blue light-emitting diode light irradiation of seedlings improves seedling quality and growth after transplanting in red leaf lettuce. **HortScience**, v.45, p.1809–1814, 2010.

JOHKAN, M., SHOJI, K., GOTO, F., HAHIDA, S. E YOSHIHARA, T. Effect of green light wavelength and intensity on photomorphogenesis and photosynthesis in *Lactuca sativa*. **Environmental and Experimental Botany**, v.75, p.128–133, 2012.

KAMI, C.; LORRAIN, S.; HORNITSCHKE, P.; FANKHAUSER, C. Light-regulated plant growth and development. **Current Topics in Developmental Biology**, v.91, p.29–66, 2010.

KANG, C. Y.; LIAN, H. L.; WANG, F. F.; HUANG, J. R.; YANG, H. Q. Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in Arabidopsis. **The Plant cell**, v.21, p.2624–41, 2009.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cellular Biology**, v.27, p.137–8A, 1965.

KELLER, M.M.; JAILLAIS, Y.; PEDMALE, U.V.; MORENO, J.E.; CHORY, J.; BALLARE, C.L. Cryptochrome 1 and phytochrome B control shade-avoidance responses in Arabidopsis via partially independent hormonal cascades. **The Plant Journal**, v.67, p.195–207, 2011.

KENDRICK, R.E.; KRONENBERG, G.H.M. **Photomorphogenesis in Plants**. 1. ed., Springer Science + Business Media, Dordrecht, 1986.

KEUSKAMP, D.H.; SASIDHARAN, R.; VOS, I.; PEETERS, A.J.M.; VOESENEK, L.A.C.J.; PIERIK, R. Blue-light-mediated shade avoidance requires combined auxin and brassinosteroid action in Arabidopsis seedlings. **The Plant Journal**, v.67, p.208–217, 2011.

KIM, H-H.; GOINS, G.; WHEELER, R.; SAGER, J. Green light supplementation for enhanced lettuce growth under red and blue light-emitting diodes. **HortScience** v.39, p.1617–1622, 2004.

KIM, S.J.; HAHN, E.J.; HEO, J.W.; PAEK, K.Y. Effects of LED on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets in vitro. **Scientia Horticulturae**, v.101, p.143–151, 2005.

KIRCHER, S.; GIL, P.; KOZMA-BOGNÁR, L.; FEJES, E.; SPETH, V.; HUSSELSTEIN-MULLER, T.; BAUER, D.; ADAM, E.; SCHAFFER, E.; NAGY, F. Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. **The Plant cell**, v.14, p.1541–55, 2002.

KONG, S.G.; OKAJIMA, K. Diverse photoreceptors and light responses in plants. **Journal of Plant Research**, v.129, p.111–114, 2016.

LABOURIAU, L.G. Fotoblastismo. In: A Germinação das Sementes. Washington DC: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Série de Biologia. **Monografia**, v.24, p.79-99, 1983.

LEE, D.W.; BONE, R.A.; TARSIS, S.L.; STORCH, D. Correlates of leaf optical properties in tropical forest sun and extreme-shade plants. **American Journal of Botany**, v.77, p.370–380, 1990.

LI, H.; XU, Z.; TANG, C. Effect of light emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.103, p.155–163, 2010.

LI, J.; LI, G.; WANG, H.; WANG DENG, X. Phytochrome signaling mechanisms. **The arabidopsis book**, v.9, e0148, 2011.

LI, L.; LJUNG, K.; BRETON, G.; SCHMITZ, R.J.; PRUNEDA-PAZ, J.; COWING-ZITRON, C.; COLE, B.J.; IVANS, L.J.; PADMALLE, U.V.; JUNG, H.S.; ECKER, J.R.; KAY, S.A.; CHORY, J. Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. **Genes and Development**, v.26, p.785–790, 2012.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology**, v.148, p.350–382, 1987.

LIN, C.; AHMAD, M.; CASHMORE, A.R. Arabidopsis cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. **The Plant Journal**, v.10, p.893–902, 1996.

LIN, C.; AHMAD, M.; GORDON, D.; CASHMORE, A.R. Expression of an Arabidopsis cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue , UV-A , and green light. **Plant Biology**, v.92, p.8423–8427, 1995.

LIN, C.; SHALITIN, D. Cryptochrome structure and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.54, p.469–496, 2003.

LIU, B.; YANG, Z.; GOMEZ, A.; LIU, B.; LIN, C.; OKA, Y. Signaling mechanisms of plant cryptochromes in Arabidopsis thaliana. **Journal of Plant Research**, v.129, p. 137–148, 2016.

LUO, Y.; SHI, H. Direct regulation of phytochrome actions by photoreceptors. **Trends in Plant Science**, v.20, p.7–9, 2018.

MARTÍNEZ-GARCÍA, J.F.; GALLEMÍ, M.; MOLINA-CONTRERAS, M. J.; LLORENTE, B.; BEVILAQUA, M.R.; QUAIL, P.H. The shade avoidance syndrome in Arabidopsis: the antagonistic role of phytochrome A and B differentiates vegetation proximity and canopy shade. **PloS one**, v.9(10), e109275, 2014.

MICKENS, M.A.; SKOOG, E.J.; REESE, L.E.; BARNWELL, P.L.; SPENCER, L.E.; MASSA, G.D.; WHEELER, R.M. A strategic approach for investigating light recipes for ‘Outredgeous’ red romaine lettuce using white and monochromatic LEDs. **Life Sciences in Space Research**, v.19, p.53–62, 2018.

- MONTGOMERY, B.L.; LAGARIAS, J.C. Phytochrome ancestry : sensors of bilins and light. **Trends in Plant Science**, v.7, p.357–366, 2002.
- MORIWAKI, T.; FALCIONI, R.; TANAKA, F.A.O.; CARDOSO, K.A.K.; DE SOUZA, L.A.; BENEDITO, E.; NANNI, M.R.; BONATO, C.M.; ANTUNES, W.C. Nitrogen-improved photosynthesis quantum yield is driven by increased thylakoid density, enhancing green light absorption. **Plant Science**, v. 278, p. 1 – 11, 2019.
- MUNEER, S.; KIM, E.J.; PARK, J.S.; LEE, J.H. Influence of green , red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p.4657–4670, 2014.
- NAGY, F.; SCHAFFER, E. Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.329–55, 2002.
- NARITA, N.N.; MOORE, S.; HORIGUCHI, G.; KUBO, M.; DEMURA, T. Over-expression of a novel small peptide *ROTUNDIFOLIA4* decreases of cell proliferation and alters leaf shape in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v.38, p.699–713, 2004.
- OGUCHI, R.; DOUWSTRA, P.; FUJITA, T.; CHOW, W.S.; TERASHIMA, I. Intra-leaf gradients of photoinhibition induced by different color lights: implications for the dual mechanisms of photoinhibition and for the application of conventional chlorophyll fluorometers. **The New Phytologist**, v.191, p.146–159, 2011.
- ONODA, Y.; WRIGHT, I.J.; EVANS, J.R.; HIKOSAKA, K.; KITAJIMA, K.; NIINEMETS, Ü.; POORTER, H.; TOSENS, T.; WESTOBY, M. Physiological and structural tradeoffs underlying the leaf economics spectrum. **The New Phytologist**, v.14, p.1447–1463, 2017.
- PEDMALE, U.V.; HUANG, S.C.; ZANDER, M.; COLE, B.J.; HETZEL, J.; LJUNG, K.; REIS, P.A.B.; SRIDEVI, P.; NITO, K.; NERY, J.R.; ECKER, J.R.; CHORY, J. Cryptochromes interact directly with PIFs to control plant growth in limiting blue light. **Cell**, v.164, p.233–245, 2016.
- POGSON, B.J.; GANGULY, D.; BORTH, V.A. Insights into chloroplast biogenesis and development. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1847, p.1017–1024, 2015.
- POUDEL, P.R.; KATAOKA, I.; MOCHIOKA, R. Effect of red- and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, v.92, p.147–153, 2008.
- QUAIL, P.H. Photosensory perception and signal transduction in plants. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.4, p.652–661, 1994.
- RAGAEI, S.; ABDEL-AAL, E.M.; NOAMAN, M. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. **Food Chemistry**, v.98, p.32–38, 2006.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v.17, p.208–212, 1963.

ROCKWELL, N.C.; SU, Y.S.; LAGARIAS, J.C. Phytochrome structure and signaling mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.837–58, 2006.

ROIG-VILLANOVA, I.; MARTÍNEZ-GARCÍA, J.F. Plant responses to vegetation proximity: A whole life avoiding. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p.1–10, 2016.

RUSSO, V.E.A.; CHAMBERS, J.A.A.; DEGLI-INNOCENTI, F.; SOMMER, T. Photomorphogenesis in microorganisms. In: Colombetti, G.; Lenci, F.; Song, P.S **Sensory Perception and Transduction in Aneural Organisms**, v.89, Plenum Press, New York, 1985.

SANCHES, M.C; VALIO, I.F.M. Leaf optical properties of two liana species *Canavalia parviflora* Benth. and *Gouania virgata* Reissk in different light conditions. **Revista brasileira de botânica**, v.29, n.2, p.319-330, 2006.

SARLIKIOTI, V.; VISSER P. H. B.; BUCK-SORLIN G. H.; MARCELIS L. F. M. How plant architecture affects light absorption and photosynthesis in tomato: towards an ideotype for plant architecture using a functional–structural plant model. **Annals of Botany**, v.108, p.1065–1073, 2011.

SCHUERGER, A.C.; BROWN, C.S.; STRYJEWSKI, E.C. Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) grown under red light-emitting diodes supplemented with blue or far-red light. **Annals of Botany**, v.79, p.273–282, 1997.

SEEMANN, J.R. Light adaptation/acclimation of photosynthesis and the regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in sun and shade plants. **Plant Physiology**, v.91, p.379–86, 1989.

SHARROCK, R.A; CLACK T. Patterns of expression and normalized levels of the five *Arabidopsis* phytochromes. **Plant Physiology**, v.130, p.442–56, 2002.

SHARROCK, R.A.; QUAIL, P.H. Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: Structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. **Genes and Development**, v.3, p.1745–1757, 1989.

SHINOMURA, T.; UCHIDA, K.; FURUYA, M. Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.122, p.147–56, 2000.

SIEGELMAN, H. W; BUTLER, W. L. Properties of phytochrome. **Annual Review of Plant Physiology**, v.16, p.383–392, 1965.

SILVA, P. E. M.; CAVATTE, P. C.; MORAIS, L. E.; MEDINA, E. F.; DAMATTA, F. M. The functional divergence of biomass partitioning, carbon gain and water use in *Coffea canephora* in response to the water supply: implications for breeding aimed at improving drought tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v.87, p.49–57, 2013.

SLATTERY, R.A.; GRENNAN, A.K.; SIVAGURU, M.; SOZZANI, R.; ORT, D.R. Light sheet microscopy reveals more gradual light attenuation in light-green versus dark-green soybean leaves. **Journal of experimental botany**, v.67, p.4697–4709, 2016.

SMITH, H.L.; MCAUSLAND, L.; MURCHIE, E.H. Don't ignore the green light: exploring diverse roles in plant processes. **Journal of Experimental Botany**, v.68, p.2099–2110, 2017.

SNOWDEN, M.C.; COPE, K.R.; BUGBEE, B. Sensitivity of seven diverse species to blue and green light: interactions with photon flux. **PLoS ONE**, v.11, e0163121, 2016.

TEPPERMAN, J.M.; HWANG, Y.S.; QUAIL, P.H. PhyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of Arabidopsis seedling de-etiolation. **Plant Journal**, v.48, p.728–742, 2006.

TSUKAYA, H. The leaf index: Heteroblasty, natural variations, and genetic control of polar processes of leaf expansion. **Plant Cell Physiology**, v.43, p.372–378, 2002.

TSUKAYA, H. Leaf shape: genetic controls and environmental factors. **The International Journal of Developmental Biology**, v.49, p.547–55, 2005.

TSUKAYA, H. Mechanism of leaf-shape determination. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.477–496, 2006.

TSUGE, T.; TSUKAYA, H.; UCHIMIYA, H. Two independent and polarized processes of cell elongation regulate leaf blade expansion in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Development**, v.122, p.1589–1600, 1996.

WANG, Q.; LIU, Q.; WANG, X.; ZUO, Z.; OKA, Y.; LIN, C. New insights into the mechanisms of phytochrome – cryptochrome coaction. **New Phytologist**, v.217, p. 547–551, 2018.

WANG, Q.; ZUO, Z.; WANG, X.; GU, L.; YOSHIZUMI, T.; YANG, Z.; YANG, L.; LIU, Q.; LIU, W.; HAN, Y-J.; KIM, J-I.; LIU, B.; WOHLSCHLEGEL, J.A.; MATSUI, M.; OKA, Y.; LIN, C. Photoactivation and inactivation of Arabidopsis cryptochrome 2. **Science**, v.354, p. 343–347, 2016.

WANG, W.J.; SUN, X.T.; WANG, G.C.; XU, P.; WANG, X.Y.; LIN, Z.L.; WANG, F.J. Effect of blue light on indoor seedling culture of *Saccharina japonica* (Phaeophyta). **Journal of Applied Phycology**, v.22, p.737–744, 2010.

WANG, Y.; FOLTA K.M. Contributions of green light to plant growth and development. **American Journal of Botany**, v.100, p.70–78, 2013.

WANG, Y.; MARUHNICH, S.; MAGEROY, M.; JUSTICE, J.; FOLTA, K. Phototropin 1 and cryptochrome action in response to green light in combination with other wavelengths. **Planta**, v.237, p.225–237, 2013.

WENT FW. The experimental control of plant growth. Waltham, MA: **Chronica Botanica**, 1957.



- WHITELAM, G. A green light for cryptochrome research. **Current Biology**, v.5, p.1351–1353, 1995.
- WU, G.; SPALDING, E. P. Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of Arabidopsis seedlings. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104,47, p.18813–8, 2007.
- YANG, H.Q.; WU, Y.J.; TANG, R.H.; LIU, D.; LIU, Y.; CASHMORE, A.R. The C termini of Arabidopsis cryptochromes mediate a constitutive light response. **Cell**, v.103, p.815–827, 2000.
- YANG, Z.; LIU, B.; SU, J.; LIAO, J.; LIN, C.; OKA, Y. Cryptochromes orchestrate transcription regulation of diverse blue light responses in plants. **Photochemistry Photobiology**, v.93, p.112–127, 2017.
- YORIO, N.C.; GOINS, G.D.; KAGIE, H.R.; WHEELER, R.M.; SAGER, J.C. Improving spinach, radish, and lettuce growth under red light-emitting diodes (LEDs) with blue light supplementation. **Horticultural Science**, v.36, p.380–383, 2001.
- YU, X.; KLEJNOT, J.; ZHAO, X.; SHALITIN, D.; MAYMON, M.; YANG, H., LEE, J.; LIU, X.; LOPEZ, J.; LIN, C. Arabidopsis cryptochrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nucleus. **Plant Cell**, v.19,1, p.3146–3156, 2007.
- YU, X.; LIU, H.; KLEJNOT, J.; LIN, C. The cryptochrome blue light receptors, In: **The Arabidopsis Book**, v.8, The American Society of Plant Biologists, Los Angeles, EUA, 2010.
- ZHANG, T.; FOLTA, K.M. Green light signaling and adaptive response. **Plant Signal Behavior**, v.7, p.75–78, 2012.
- ZHENG, L.; VAN LABEKE, M.C. Long-term effects of red- and blue-light emitting diodes on leaf anatomy and photosynthetic efficiency of three ornamental pot plants. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.01-12, 2017.