

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

THAISE MORIWAKI

Estudo das propriedades ópticas da folha: fatores que afetam a absorvância da luz e a efetiva participação de diferentes qualidades espectrais no perfil fotossintético

Maringá

2020

THAISE MORIWAKI

Estudo das propriedades ópticas da folha: fatores que afetam a absorvância da luz e a efetiva participação de diferentes qualidades espectrais no perfil fotossintético

Tese 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 Doutora em Agronomia.
Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Werner Camargos Antunes

Maringá

2020

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

M862e

Moriwaki, Thaise

Estudo das propriedades ópticas da folha: fatores que afetam a absorvência da luz e a efetiva participação de diferentes qualidades espectrais no perfil fotossintético / Thaise Moriwaki. -- Maringá, PR, 2020.

96 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Werner Camargos Antunes Camargos Antunes.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2020.

1. Absorvência. 2. Qualidade espectral. 3. Pigmentos. 4. Fotossíntese. I. Camargos Antunes, Werner Camargos Antunes, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 23.ed. 631.4

THAISE MORIWAKI

Estudo das propriedades ópticas da folha: fatores que afetam a absorvância da luz e a efetiva participação de diferentes qualidades espectrais no perfil fotossintético

Tese apresentada a Universidade Estadual de Maringá como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2020

Prof. Dr. Werner Camargos Antunes

Presidente

Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Alan Carlos Costa

Membro

Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde

Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira

Membro

Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Marcos Rafael Nanni

Membro

Universidade Estadual de Maringá

Prof^ª. Dra. Rosimar Maria Marques

Membro

Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

À Deus, pela essência da vida,
Aos meus pais, Natalina e Toshio (*in
memorian*) por todo o amor gratuito a
mim concedido,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Aos meus pais.

A família.

A Universidade Estadual de Maringá, e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao Laboratório de Ecofisiologia Vegetal.

Ao Grupo Aplicado ao Levantamento e Espacialização de Solos (GALES).

Ao Grupo de Pesquisa em Espectroscopia Óptica e Propriedades Térmicas.

Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP).

Ao meu orientador Professor Doutor Werner Camargos Antunes.

Aos colegas Renan Falcioni e demais integrantes do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

“Uma paixão forte por qualquer objeto assegurará o sucesso, porque o desejo pelo objetivo mostrará os meios.”

William Hazlitt

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	2
1.1 INTRODUÇÃO.....	4
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	7
1.2.1 Material vegetal e delineamento experimental.....	7
1.2.2 Propriedades ópticas foliares	9
1.2.3 Conteúdo de pigmentos cloroplásticos foliares	9
1.2.4 Análises por microscopia óptica	9
1.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão	10
1.2.6 Microscopia de epifluorescência de fragmentos epidérmicos	10
1.2.7 Análise de fluorescência da clorofila nas folhas	10
1.3 RESULTADOS	12
1.3.1 Reflectância, absorvância e transmitância foliar e conteúdo de pigmentos fotossintéticos.....	12
1.3.2 Anatomia de folhas verdes e regiões albinas e amarelas	15
1.3.3 Ultraestrutura das células do mesofilo	17
1.3.4 Estômatos na face abaxial.....	19
1.3.5 Espectros de fluorescência em folhas	22
1.4 DISCUSSÃO.....	25
1.5 CONCLUSÃO	33
1.6 REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO 2	39
2.1 INTRODUÇÃO.....	41
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.2.1 Material vegetal e condições de crescimento	44
2.2.2 Análise de crescimento.....	45
2.2.3 Determinação dos teores de pigmentos foliares.....	46
2.2.4 Determinação dos dados de reflectância, absorvância e transmitância da luz.....	46
2.2.5 Análise dos parâmetros fotossintéticos e de fluorescência da clorofila <i>a</i>	47
2.2.6 Medições com a câmara de topo transparente	49
2.2.7 Microscopia eletrônica de transmissão	50

2.2.8 Identificação dos polipeptídeos das membranas dos tilacoides por SDS-PAGE.....	51
2.2.9 Análises estatísticas	52
2.3 RESULTADOS	53
2.3.1 Análise de crescimento, teores de pigmentos foliares e parâmetros espectrais das folhas	53
2.3.2 Parâmetros fotossintéticos e de fluorescência da clorofila	57
2.3.3 Microscopia eletrônica de transmissão	66
2.3.4 Identificação dos polipeptídios das membranas dos tilacoides por SDS-PAGE.....	68
2.4 DISCUSSÃO.....	70
2.5 CONCLUSÃO	78
2.6 REFERÊNCIAS.....	79

RESUMO GERAL

Estudo das propriedades ópticas da folha: fatores que afetam a absorbância da luz e a efetiva participação de diferentes qualidades espectrais no perfil fotossintético

Este trabalho teve como objetivo investigar os fatores que afetam os parâmetros ópticos da folha, abrangendo o espectro da luz visível (400 a 700 nm), e como as diferentes qualidades espectrais atuam discriminadamente na capacidade fotossintética de uma planta. Para tanto, no Capítulo 1 discute-se sobre quais atributos, sejam eles anatômicos, estruturais, ou mesmo, ultraestruturais, distinguindo os efeitos dos pigmentos fotossintéticos (cloroplastídico) e dos componentes estruturais (extra-cloroplastídicos), que influenciam nos parâmetros espectrais e contribuem nas frações que são efetivamente absorvidas, transmitidas e refletidas pela folha. Testou-se a hipótese de que há pouca interferência dos componentes extra-cloroplastídicos nos parâmetros de absorbância da folha, na faixa que corresponde ao espectro da luz visível. Na segunda etapa referente ao Capítulo 2, realizou-se uma avaliação minuciosa dos parâmetros fotossintéticos em função da partição da luz incidente, considerando os respectivos padrões de absorção da folha, além das alterações fenotípicas promovidas pelo ambiente em que as plantas se desenvolveram. Nesta etapa testou-se a hipótese de que a luz verde conduz eficientemente a fotossíntese desde que seja absorvida. Buscou-se a melhor compreensão de como as plantas utilizam o espectro da luz visível e as proporções relativas de energia (diferentes qualidades espectrais) para ajustar sua estrutura, fisiologia e crescimento em condições de luminosidade adversas.

Palavras-chaves: Absorbância, fotossíntese, pigmentos, qualidade espectral.

GENERAL ABSTRACT

Study of leaf optical properties: factors affecting light absorbance and the effective participation of the different wavelengths on photosynthetic profile in plants.

This work aims to investigate the factors that affect the optical parameters of the leaf covering the visible light spectrum (400 to 700 nm), and how different spectral qualities act discriminately on the photosynthetic capacity of a plant. Therefore, in Chapter 1 discusses which attributes, whether anatomical, structural or even ultrastructural, separating the effects of photosynthetic pigments (chloroplast) and structural components (extra-chloroplast), that distinguishing the spectral parameters and contribute to the fraction that are effectively absorbed, transmitted or reflected by leaves. The hypothesis was tested that there is little interference of the extra-chloroplastid components in the absorbance parameters of the leaf in the range that corresponds to the spectrum of visible light. In the second step following to Chapter 2, a detailed evaluation of photosynthetic parameters was performed as a function of the incident light partition considering the respective absorption patterns of the leaf in addition to the phenotypic changes promoted by the environment in which the plant developed. In this stage, the hypothesis that the green light efficiently conducts photosynthesis if it is absorbed, was tested. We attempt to find a better understanding of how plants use the spectrum of visible light and the relative proportions of energy (different spectral qualities) to adjust their structure, physiology, and growth in adverse light conditions.

Keywords: Absorbance, photosynthesis, pigments, spectral quality.

INTRODUÇÃO GERAL

Entre os fatores ambientais, a luz exerce papel fundamental no crescimento e no desenvolvimento das plantas. Características como intensidade, qualidade espectral, direção e duração da exposição a luz, fornecem importantes informações que são utilizadas pelas plantas na regulação de uma gama de processos fisiológicos, bioquímicos, morfológicos e na regulação da expressão de genes. Como parte de uma estratégia evolutiva, as plantas desenvolveram mecanismos com alto grau de plasticidade que lhes permite modular seu crescimento e desenvolvimento em resposta a tais sinais externos, em especial, modificar sua estrutura, fisiologia e metabolismo em função dos distintos ambientes. A capacidade de ajuste destes processos durante o ciclo de vida da planta é crucial para sua sobrevivência, além de maximizar a eficiência no acúmulo de biomassa em condições ambientais adversas.

Os diodos emissores de luz (LEDs) foram desenvolvidos, e têm sido utilizados como uma fonte de luz alternativa para plantas devido à sua especificidade de comprimento de onda, largura de banda estreita, melhor eficiência energética e aquecimento mínimo, além de maior vida útil em comparação às lâmpadas incandescentes ou fluorescentes. De tal forma, os LEDs podem oferecer uma combinação do espectro da luz visível para otimizar a fotossíntese e o crescimento das plantas. Além disso, a aplicação de LEDs com faixas de emissividade estreitas auxilia nos estudos fisiológicos, e pode contribuir para melhor compreensão de como diferentes qualidades de luz atuam nos processos fotossintéticos (fotoquímicos e carboxilativos) das plantas. O conhecimento do comportamento fisiológico das plantas em relação a qualidade espectral incidente sobre a folha, pode ser uma importante ferramenta auxiliar no aumento de produção por unidade de área, por possibilitar o desenvolvimento de práticas agrícolas mais sustentáveis que maximizam a fixação de carbono pelas plantas.

Neste trabalho, investigou-se os fatores que afetam os parâmetros ópticos da folha, e como as diferentes qualidades espectrais atuam discriminadamente na capacidade fotossintética de uma planta. O objetivo foi de compreender o comportamento da luz no perfil foliar e sua participação sobre o crescimento das plantas, em relação as diferentes qualidades espectrais, dentro da faixa da luz visível do espectro eletromagnético. Buscou-se aprimorar o conhecimento sobre os mecanismos que controlam os processos de eficiência da captura e absorção de luz e a conversão da energia em biomassa vegetal para os diferentes comprimentos de onda.

CAPÍTULO 1

INTERFERÊNCIA DOS COMPONENTES CLOROPLASTÍDICOS E EXTRA-CLOROPLASTÍDICOS NA ASSINATURA ESPECTRAL DAS FOLHAS

RESUMO

Setores verdes, albinos e amarelos de plantas variegadas de diferentes espécies foram estudados, para compreender o comportamento da luz no perfil foliar. Em especial, separando os efeitos decorrentes da interação da luz, com os pigmentos nos cloroplastos, e a parte estrutural (extra-cloroplastídica), sobre os padrões espectrais da folha. Para tanto, foram analisados dados hiperespectrais de alta resolução dos parâmetros ópticos de refletância, absorvância e transmitância foliar, dados anatômicos, estruturais e ultraestruturais, conteúdo de clorofila *a*, *b* e carotenoides, além do perfil de fluorescência *in vivo*, com excitação nos comprimentos de onda fortemente (azul) e fracamente (verde) absorvidos pelos pigmentos fotossintéticos, em setores verdes e albinos da espécie *Hibiscus rosa-sinensis* “variegata” L. Mediante a implantação e viabilização das diferentes técnicas de análise, concluiu-se que os pigmentos presentes nos cloroplastos respondem pela maior parte da absorvância foliar da luz visível do espectro eletromagnético, sendo mínima a absorção dos componentes extra-cloroplastídicos nessa faixa espectral. A penetrabilidade da luz no perfil de uma folha verde é fortemente influenciada pelos coeficientes de absorção das clorofilas, relativos aos diferentes comprimentos de onda. Em geral, o alto coeficiente de absorção da luz azul pelas clorofilas diminui a sua penetrabilidade ao longo do perfil foliar. Por outro lado, a interação da luz com as próprias moléculas de pigmentos, particularmente para a faixa espectral do verde (menor absorvância), aumenta o grau de espalhamento da luz no perfil foliar e, conseqüentemente, a penetração da luz nessa faixa do espectro.

Palavras-chaves: Absorvância, luz, pigmentos fotossintéticos, qualidade espectral, refletância, transmitância.

Abreviações:

A - absorvância; Chl_a - clorofila *a*; Chl_b - clorofila *b*; Chl_{a+b} - clorofilas totais; Fr - pico de emissão da fluorescência da clorofila no vermelho (685 nm); Ffr - pico de emissão da fluorescência da clorofila no vermelho distante (730 nm); PAR - radiação fotossinteticamente ativa; R - reflectância; T - transmitância.

1.1 INTRODUÇÃO

A luz é essencial como fonte de energia que conduz a fotossíntese. No entanto, a luz que incide sobre a superfície da folha não é totalmente absorvida, sendo uma fração refletida e outra transmitida através do perfil foliar. Ainda, quando a luz incidente é absorvida pelas clorofilas, por exemplo, as folhas exibem emissividade de fótons com comprimentos de onda mais longos (fluorescência) (BUSCHMANN, 2007; LANG; STOBER; LICHTENTHALER, 1991; PEDRÓS et al., 2008). De tal forma, compreender os padrões espectrais de reflectância, transmitância e da fluorescência da clorofila pode contribuir para o melhor entendimento do comportamento da luz e, conseqüentemente, sobre o perfil de penetrabilidade e absorção no interior das folhas (BALDINI et al., 1997; DAVIS et al., 2011; FALCIONI et al., 2017; GATES et al., 1965; REDDY et al., 2001; WOOLLEY, 1971; XIAO; THOLEN; ZHU, 2016).

Embora a absorção da luz seja um dos fatores mais importante associado as respostas fisiológicas das plantas, é também um dos parâmetros mais difíceis de mensurar, pelo menos a nível de sistema *in vivo* diretamente na folha (VOGELMAN; HAN, 2000; HATIER; GOULD, 2007; BRODERSEN; VOGELMANN, 2010a). A principal dificuldade na determinação da radiação absorvida, é que as folhas, como a maioria dos outros sistemas biológicos, são bastante complexas do ponto de vista óptico, e não apenas absorvem, mas também espalham a radiação que incide sobre elas. Isso pode promover alterações dos padrões de difração e refração, e da interação da energia eletromagnética (luz) com os componentes foliares, refletindo em uma complexa resposta espectral das folhas.

A lâmina foliar é constituída por diversos componentes estruturais como celulose e lignina nas paredes celulares, proteínas e lipídios, compostos fenólicos, água, solutos dissolvidos no citosol e nos vacúolos, além de uma estrutura compartimentalizada de organelas, incluindo os próprios cloroplastos onde estão concentrados os pigmentos fotossintéticos. Cada um deles tem suas próprias características químicas e a luz pode interagir individualmente (mas não exclusivamente), afetando o espectro de absorção (FOURTY et al., 1996). No entanto, essa complexa interação físico-química e estrutural dificulta a análise da absorbância, e as interpretações dos resultados do ponto de vista óptico, em especial, quando pretende-se separar os efeitos decorrentes da interação da luz com os pigmentos presentes nos cloroplastos e a parte estrutural (extra-cloroplastídicas) das folhas.

Os pigmentos fotossintéticos são responsáveis pela maior parte da absorção da luz no espectro do visível (MORIWAKI et al., 2019; VOGELMANN, 1993). Não obstante, os componentes estruturais têm grandes dimensões, quando comparados com as clorofilas e carotenoides que ficam agrupados em pequenas estruturas (complexos de antenas) em alta concentração nas membranas dos tilacoides dos cloroplastos. A natureza espectroscópica das células vegetais é muito diferente de uma solução típica de pigmentos extraídos e diluídos. A presença de componentes estruturais associados a grandes espaços intercelulares presentes no perfil foliar, podem potencializar os fenômenos de difração/reflexão e, em decorrência disso, aumentar o caminho óptico percorrido pela luz. Isso aumenta a probabilidade de a luz encontrar um pigmento prontamente disponível para receber essa energia, levando ao aumento da absorção (GATES et al., 1965). Esse fenômeno físico está intimamente ligado ao espalhamento da luz no interior da folha (ATRASHEVSKII et al., 1999; GATES et al., 1965). Em geral, quanto menor o coeficiente de absorvidade, maiores são os índices de espalhamento no interior da folha e o padrão de reflexão pode ser considerado difuso (ATRASHEVSKII et al., 1999). Entretanto, o comportamento da luz em função dos diferentes comprimentos de onda, bem como a interferência de componentes extra-cloroplastídicos nos padrões ópticos das folhas são temas pouco explorados (BUSCHMANN; LANGSDORF; LICHTENTHALER, 2008; HATIER; CLEARWATER; GOULD, 2013; LUZ, 2006).

Neste sentido, plantas variegadas podem fornecer particularidades sobre as propriedades ópticas das folhas, distinguindo os efeitos dos componentes estruturais foliares, que normalmente são mascarados pela presença de pigmentos nos cloroplastos. A variegação de plantas é caracterizada pela presença de setores que exibem variação na coloração em tecidos e órgãos normalmente verdes. Nas folhas, setores albinos contêm alterações a níveis de plastídios e não apresentam pigmentos fotossintéticos, enquanto nos setores verdes, ocorre à presença de pigmentos e cloroplastos estruturalmente normais (ALURU et al., 2006; GLIŃSKA; GABARA, 2011). As variegações são geralmente induzidas por mutações que impedem a formação de cloroplastos, ou pela presença de plastídios com algum comprometimento na biossíntese de pigmentos (exemplo: clorofilas e carotenoides) (SAKAMOTO et al., 2009; YU et al., 2007). Em adição, folhas variegadas com setores amarelos apresentam carotenoides, mas não clorofilas (MOLLICK et al., 2011). Plantas deficientes em clorofila (albinas) também podem ser obtidas através da aplicação de compostos químicos inibidores da síntese de carotenoides (MAAS; DUNLAP, 1989) como o clomazone (2-[(2-chlorophenyl)-methyl]-4,4-dimethyl-3-

isoxazolidinone), uma classe de herbicida de aplicação direta no solo que atua na enzima 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (DXS; E.C 2.2.1.7), enzima chave na via do metil-eritritol fosfato (MEP), responsável pela síntese de isoprenoides plastídicos, como os carotenoides e da cadeia de fitol. Um papel importante dos carotenoides é de proteger as clorofilas da fotooxidação. O pigmento, atua na dissipação da formação de clorofilas nos estados mais reativos (singlet e triplet). Quando os carotenoides não estão presentes no cloroplasto, as clorofilas no estado triplet iniciam reações de degradação entre os quais estão a própria destruição das clorofilas. Este processo resulta no aparecimento do fenótipo albino das plantas. Assim, o herbicida interfere no desenvolvimento de cloroplasto e acúmulo de pigmentos cloroplastídicos em espécies suscetíveis (DAYAN; ZACCARO, 2012; FERHATOGLU; BARRETT, 2006).

O objetivo deste trabalho foi investigar o comportamento da luz no perfil foliar, especialmente, separar quais são os efeitos decorrentes da interação da luz com os pigmentos presentes nos cloroplastos e a parte estrutural (extra-cloroplastídicas) das folhas. Para tanto, foi realizado um cruzamento de dados das análises não destrutivas dos parâmetros espectrais de reflectância, transmitância e absorvância da folha, com dados anatômicos, estruturais e ultraestruturais, além do conteúdo de clorofila *a*, *b* e carotenoides de setores verdes, albinos e amarelos das folhas variegadas de diferentes espécies. Os parâmetros foram avaliados em cinco espécies de plantas com variegação natural da sua coloração e uma espécie tratada com o herbicida clomazone. Os perfis de fluorescência *in vivo* com excitação nos comprimentos de onda fortemente (azul) e fracamente (verde) absorvidos pelos pigmentos fotossintéticos, em setores verdes e albinos da espécie *Hibiscus rosa-sinensis* “variegata” L. também foram incluídos às análises. As espécies foram especificamente selecionadas de forma a abranger uma ampla variação anatômica (estrutural e ultra-estrutural) e do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos. Dados hiperespectrais de alta resolução foram utilizados para obter uma descrição mais acurada e detalhada das propriedades ópticas das folhas *in situ*.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Material vegetal e delineamento experimental

Foram selecionadas cinco espécies de plantas variegadas. Plantas de milho foram incluídas e tratadas com o herbicida clomazone (Fig. 1). Folhas saudáveis de *Pseuderanthemum carruthersii* var. *variegatum* (W. Bull) Radlk, *Hibiscus rosa-sinensis* “variegata” L., *Graptophyllum pictum* (L.) Griff., *Bougainvillea spectabilis* var. *variegatum* Willd, *Codiaeum variegatum* (L.) A. Juss, e *Zea mays* L. foram utilizadas de forma a incluir nas análises amplas variações anatômicas e estruturais e no conteúdo de pigmentos, em espécies Eudicotiledôneas e Monocotiledôneas. As plantas albinas de *Zea mays* foram obtidas imergindo sementes em solução de clomazone 1% (v/v) durante 2 minutos e então transferidas para substrato comercial MecPlant® para germinação. Folhas jovens, saudáveis e completamente expandidas de cada espécie das plantas variegadas foram coletadas no Jardim Botânico da Universidade Estadual de Maringá, para realização desse trabalho.



Figura 1 – Imagem representativa das plantas avaliadas neste estudo, exibindo variação das folhas. (A) *Pseuderanthemum carruthersii* var. variegatum (W. Bull) Radlk, (B) *Hibiscus rosa-sinensis* “variegata” L., (C) *Graptophyllum pictum* (L.) Griff., (D) *Bougainvillea spectabilis* var. variegatum Willd, (E) *Codiaeum variegatum* (L.) A. Juss, and (F) *Zea mays* L. sob tratamento de clomazone (plantas verdes e albinas).

1.2.2 Propriedades ópticas foliares

Folhas jovens, completamente expandidas e visualmente sadias das plantas dos diversos tratamentos (que incluem setores verdes, amarelos e albinos) foram coletadas e imediatamente avaliado o espectro da reflectância (R) e transmitância (T). Os dados foram obtidos por meio de acoplamento de dois espectrorradiômetros (ASD inc; Fild Spec® 3) colimados, e calibrados antes do uso com um disco padrão Spectralon® como referência da reflectância a 100%. Aplicou-se um feixe de luz de aproximadamente $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ partindo do *probe* posicionado na face adaxial e então efetuou-se as leituras do espectro de 350 a 2500 nm. No *probe* posicionado na face abaxial manteve-se a fonte de luz desligada de modo que o sinal capturado pelo sensor fosse considerado como o que foi transmitido através da folha. De tal forma, este procedimento experimental permite medições diretas e simultâneas de R e T. Considerou-se a absorbância como sendo a fração calculada pela equação $A = 1 - (R+T)$ (FALCIONI et al., 2017). O equipamento foi programado para realizar 30 leituras para cada amostra, gerando assim uma curva espectral média.

1.2.3 Conteúdo de pigmentos cloroplásticos foliares

Clorofilas e carotenoides foram extraídos de segmentos de 4 cm^2 da região medial foliar. Os setores verdes, albinos e amarelos das espécies foram extraídos em acetona 80% (v/v) saturada com CaCO_3 à $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Os espectros de absorbância das soluções foram mensurados com espectrofotômetro Lambda 1050 UV/VIS/NIR (PerkinElmer, Inc., Massachusetts, USA). As concentrações de clorofilas e carotenoides foram estimadas conforme Lichtenthaler et al., (1987). Diluições foram realizadas quando necessário.

1.2.4 Análises por microscopia óptica

Cortes transversais de folhas frescas (mão livre) foram utilizados para estudos histológicos, particularmente para observar onde os pigmentos estavam distribuídos ao longo do perfil foliar. Adicionalmente, foram utilizados os mesmos blocos de corte obtidos na análise de microscopia eletrônica de transmissão descrito abaixo, para análise anatômica e estrutural das folhas. Os cortes foram obtidos com auxílio do ultramicrotomo MTX Powertome X (Boeckeler Instruments RMC Products, Egham, UK; espessura de $1 \mu\text{m}$). Em seguida realizou-se a montagem das lâminas que foram posteriormente coradas com azul de toluidina tampão borax pH 4,0 (FALCIONI et al., 2018). As imagens foram obtidas com um microscópio de luz Leica ICC50 (Nußloch, Germany).

1.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Secção do limbo foliar de aproximadamente 2 mm² dos setores verdes, albinos e amarelos foram coletados e fixados em solução Karnovsky modificada contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05 M (pH 7,0) (KARNOVSKY, 1965). As amostras foram mantidas na solução por pelo menos 24 horas. 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 (em bloc) com acetato de uranila 0,5% (overnight). Em seguida, procedeu-se a desidratação em série de soluções com concentração crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%), e posterior infiltração e inclusão em resina epóxi *Spurr low viscosity*. As amostras foram então transferidas para moldes específicos para polimerização da resina, em estufa de temperatura controlada (65-70 °C) por 72 horas para posterior obtenção dos blocos de corte. Os cortes semi-finos (800-1000 nm) em navalha de vidro e ultra-finos (65-70 nm) em navalha de diamante foram obtidos com auxílio de um ultramicrotomo MTX Powertome X. Os cortes ultra-finos foram coletados em grades de cobre específicas (300 mesh), contrastados com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). As análises foram realizadas com um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400 (Leica Microsystems Inc., Illinois, USA) em 80 kV.

1.2.6 Microscopia de epifluorescência de fragmentos epidérmicos

Fragmentos epidérmicos foram isolados (cortes a mão livres) das regiões verdes e variegadas das superfícies superior (adaxial) e inferior (abaxial) das folhas. Posteriormente, aplicou-se FDA (diacetato de fluoresceína; 5 mg mL⁻¹ diluídos em acetona) (HUANG et al., 1986) nos fragmentos epidérmicos para visualização dos estômatos e células epidérmicas pavimentosas com microscopia de epifluorescência EKB-2F (Eikonal, São Paulo, Brasil). Realizou-se a excitação com azul (λ 460-470 nm) utilizando filtro B para a detecção da fluorescência do FDA. Este procedimento mantém a integridade das células guardas das folhas.

1.2.7 Análise de fluorescência da clorofila nas folhas

As análises espectroscópicas de emissão da fluorescência da clorofila *in vivo* foram registradas em setores verdes e albinos da *Hibiscus rosa-sinensis* “variegata” L. As medições foram realizadas com excitação e detecção da emissão na mesma face (adaxial-adaxial e abaxial-abaxial) e com excitação e detecção da emissão em faces opostas das

folhas (adaxial-abaxial e abaxial-adaxial). Os comprimentos de onda selecionados para excitação foram em $\lambda 435$ e $\lambda 532$ nm e as curvas espectrais de emissão coletadas entre 630 a 800 nm conforme Lichtenthaler *et al.*, 1998. Foi utilizado um sistema de medições com feixes de Laser (ThorLabs, New Jersey, USA), com um sistema duplo de fibras ópticas acoplados à detectores (sensores) colimados, com o feixe incidente do laser sob temperatura ambiente (25 °C). Os espectros de fluorescência individuais das folhas foram ajustados com curvas gaussianas, após procedimentos de normalização pela área, em detrimento da padronização em um dos picos. O intuito foi de avaliar as possíveis variações dos componentes das amostras que se encontram sobrepostos nos espectros, possibilitando as comparações dos picos de emissão de fluorescência na banda do vermelho (Fr) e do vermelho distante (Ffr). Este tratamento matemático foi realizado fixando os centros das bandas em 665, 685, 706 e 740 nm. As bandas centradas em torno de 665 e 706 nm foram utilizadas apenas para que a curva teórica representasse de forma símil os dados experimentais (curvas de ajustes). Nas bandas 685 e 740 nm as larguras e as áreas permaneceram como parâmetros ajustáveis.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Reflectância, absorvância e transmitância foliar e conteúdo de pigmentos fotossintéticos

O perfil espectral dos setores verdes (Fig. 2A, 2C e 2E) foram distintos dos setores variegados (Fig. 2B, 2D e 2F). Nos setores albinos e amarelos foram observados elevados índices de reflectância e transmitância em comprimentos de onda maiores que 530 nm (Fig. 2B e 2F). Por outro lado, observou-se maiores taxas de absorção entre 400-500 nm nos setores amarelos das espécies *G. pictum* e *B. spectabilis* *C. variegatum* em relação aos setores albinos das espécies *P. carruthersii*, *H. rosa-sinensis* e *Z. mays* (Fig. 2D). Ainda, em comprimentos de onda superiores a 600 nm setores amarelos e albinos das diferentes espécies estudadas, exibiram perfil espectral de absorvância similar demonstrando baixa interferência espectral dos carotenoides nas bandas do amarelo ao vermelho (Fig. 2B).

Na região do vermelho (660-680 nm) dos espectros, observou-se nos setores variegados, pequeno pico de absorção característico da presença de clorofilas (Fig. 2D *inset*). As quantificações Chl_a, Chl_b e Chl_{a+b} mostraram valores que variam de 0,31 a 0,29 mg m⁻², (Fig 3D), e 0,04 a 4,1 mg g⁻² (Fig. 3F) entre as espécies. Ressalta-se que esses valores são inferiores a 1% dos valores encontrados nas porções verdes dessas folhas (Fig. 3C e 3E). De fato, o conteúdo de clorofilas detectada na análise pode ser atribuído a presença das clorofilas residuais encontradas nas células guardas dos setores variegados.

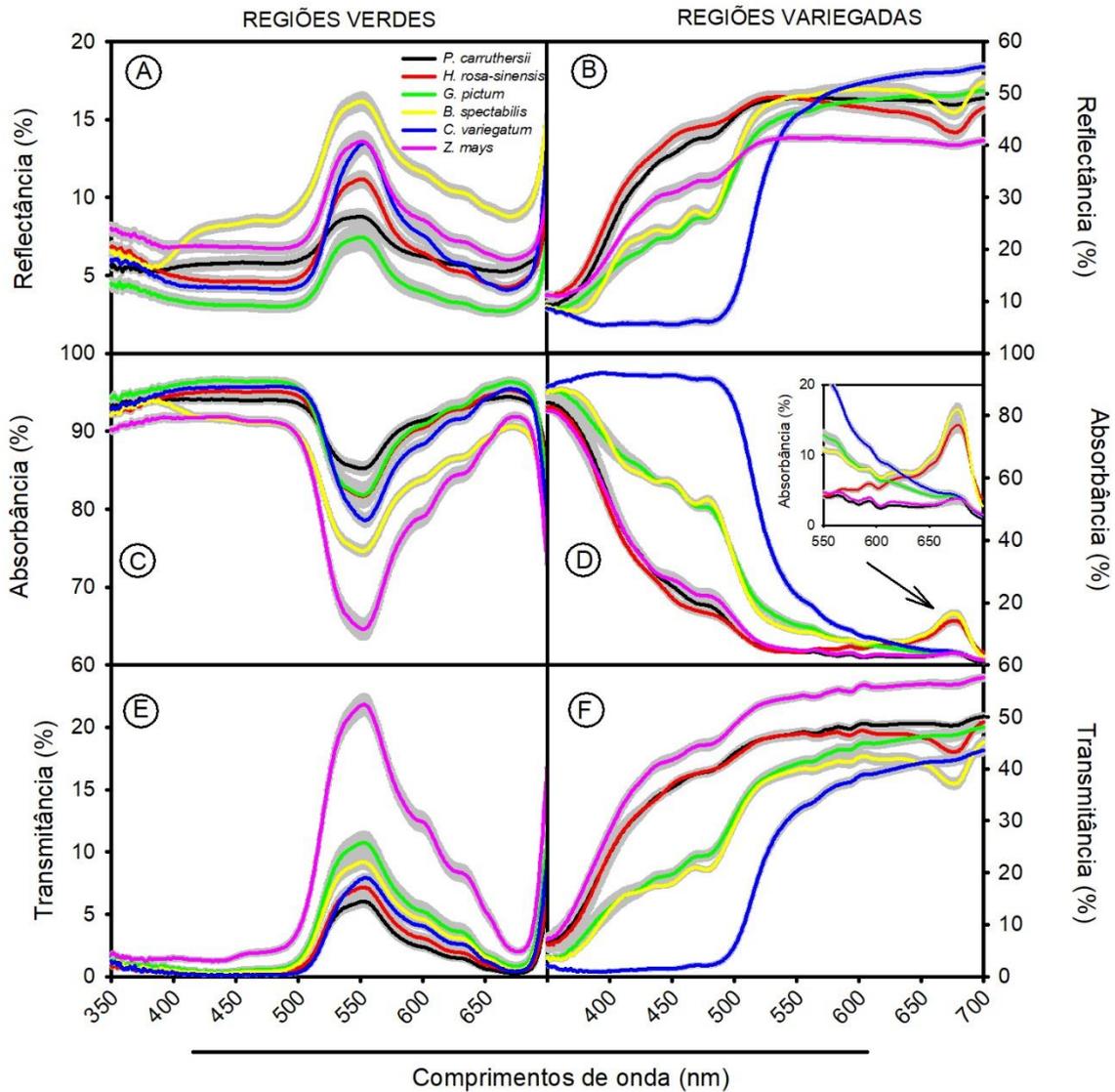


Figura 2 – Curvas espectrais foliares (*in vivo*) de 350 a 700 nm das espécies avaliadas. (A, B) reflectância, (C, D) absorvância e (E, F) transmitância. (A, C, E) medições realizadas em regiões verdes e (B, D, F) medições realizadas em regiões variegadas. Cada repetição foi calculada com a média de duas medições a partir de duas folhas diferentes da mesma planta. *Inset* indica o pico de absorvância na região do vermelho nas regiões variegadas. O erro padrão é mostrado em cinza. (n=6-8±SE).

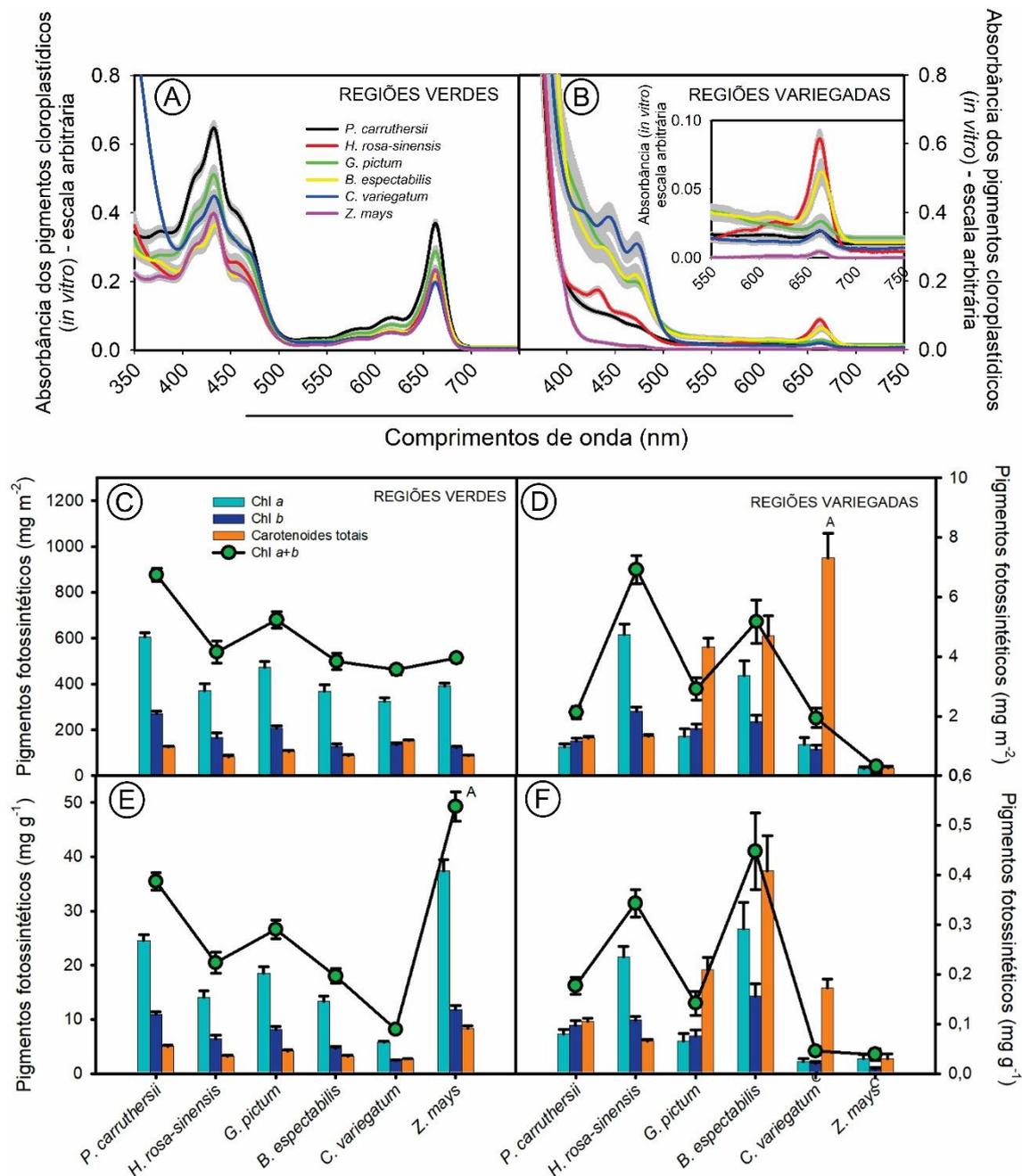


Figura 3 – Curva espectral e conteúdo dos pigmentos fotossintéticos extraídos em solução. (A, B) curvas espectrais de absorvância dos pigmentos fotossintéticos totais (350–750 nm). (A) regiões verdes e (B) regiões variegadas. (C, D) conteúdo de pigmentos cloroplastídicos (fotossintéticos) expressos por unidade de área foliar e (E, F) unidade de massa. Inset representa detalhes dos picos de absorção da região do vermelho. Cada repetição foi produzida através das médias calculadas para seis folhas diferentes. O erro padrão é mostrado em cinza nas curvas espectrais. (n=6±SE).

1.3.2 Anatomia de folhas verdes e regiões albinas e amarelas

Porções variegadas (amarelas ou albinas) e folhas de milho tratadas com clomazone, apresentaram a parte estrutural com células e tecidos similares aos das respectivas partes verdes (parênquimas paliçádico e lacunoso, hipoderme, camada subepidérmica, epidermes adaxial e abaxial uniestratificadas) (Fig. 4). Por outro lado, observou-se alterações anatômicas entre as espécies. Por exemplo, ocorreram diferenças no tamanho, forma e distribuição das células do parênquima paliçádicos e lacunoso, quantidade de espaços intercelulares, além de diferenças na espessura foliar (Fig. 4). Cortes a fresco, demonstram clorofilas dispostas nos parênquimas paliçádicos e esponjoso nas regiões verdes (Fig. 4) mas não em albinas.

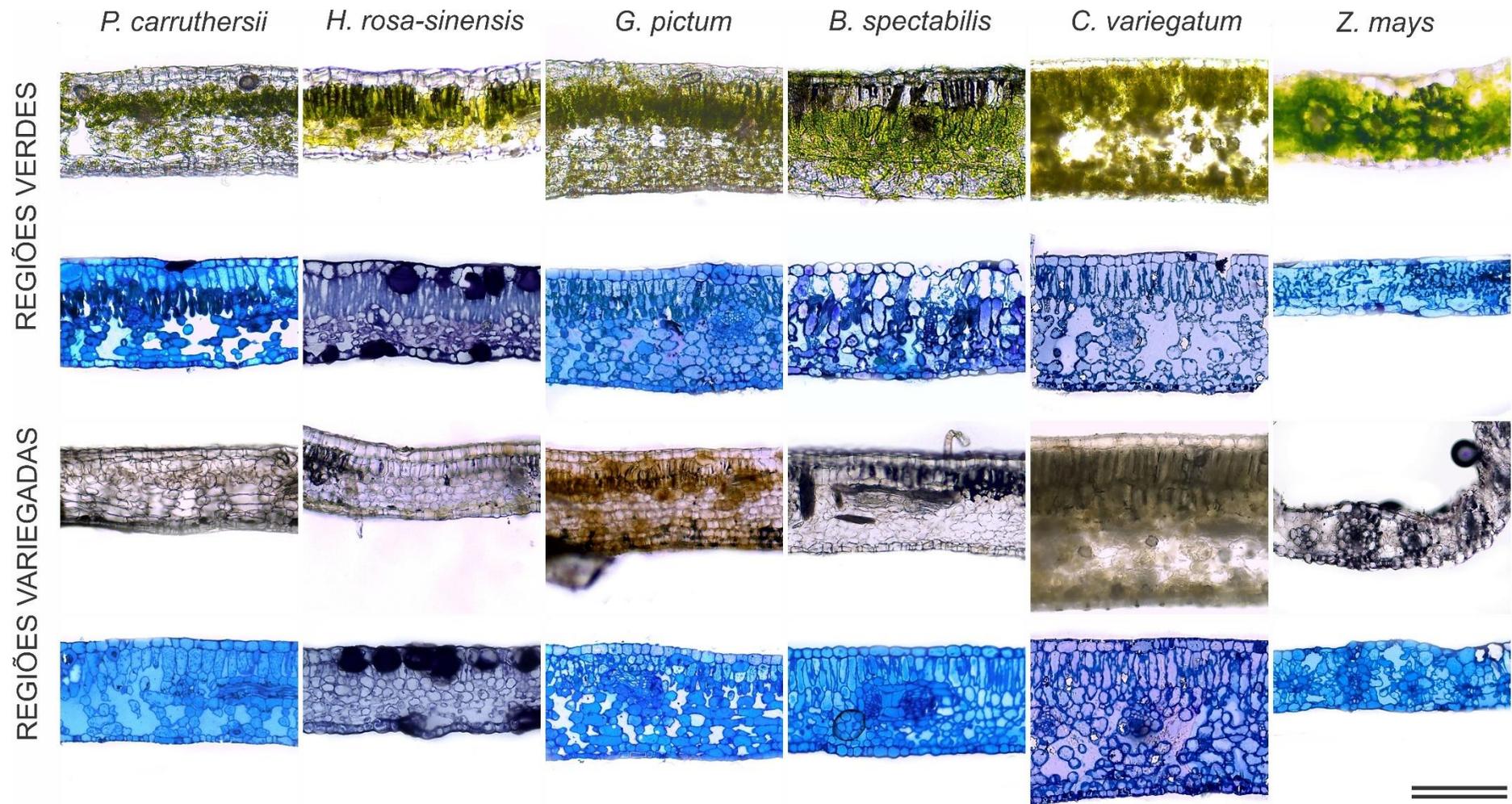


Figura 4 – Microscopia de luz de seções transversais (cortadas à mão, em cima) e fixadas com historesina (abaixo em coloração azul) de folhas representativas de seis espécies diferentes. Barra de escala = 200 μ m.

1.3.3 Ultraestrutura das células do mesofilo

Cloroplastos tipicamente bem desenvolvidos, com presença de amido, plastoglóbulos e sistema de tilacoides altamente empilhados formando extensos conjuntos de *grana*, foram observados nos setores verdes das espécies avaliadas (Fig. 5). Por outro lado, os setores albinos não apresentaram cloroplastos, apenas estruturas semelhantes a vesículas (Fig. 5). Nas células nos setores amarelos observou-se a presença de plastídios anormais e rudimentares.

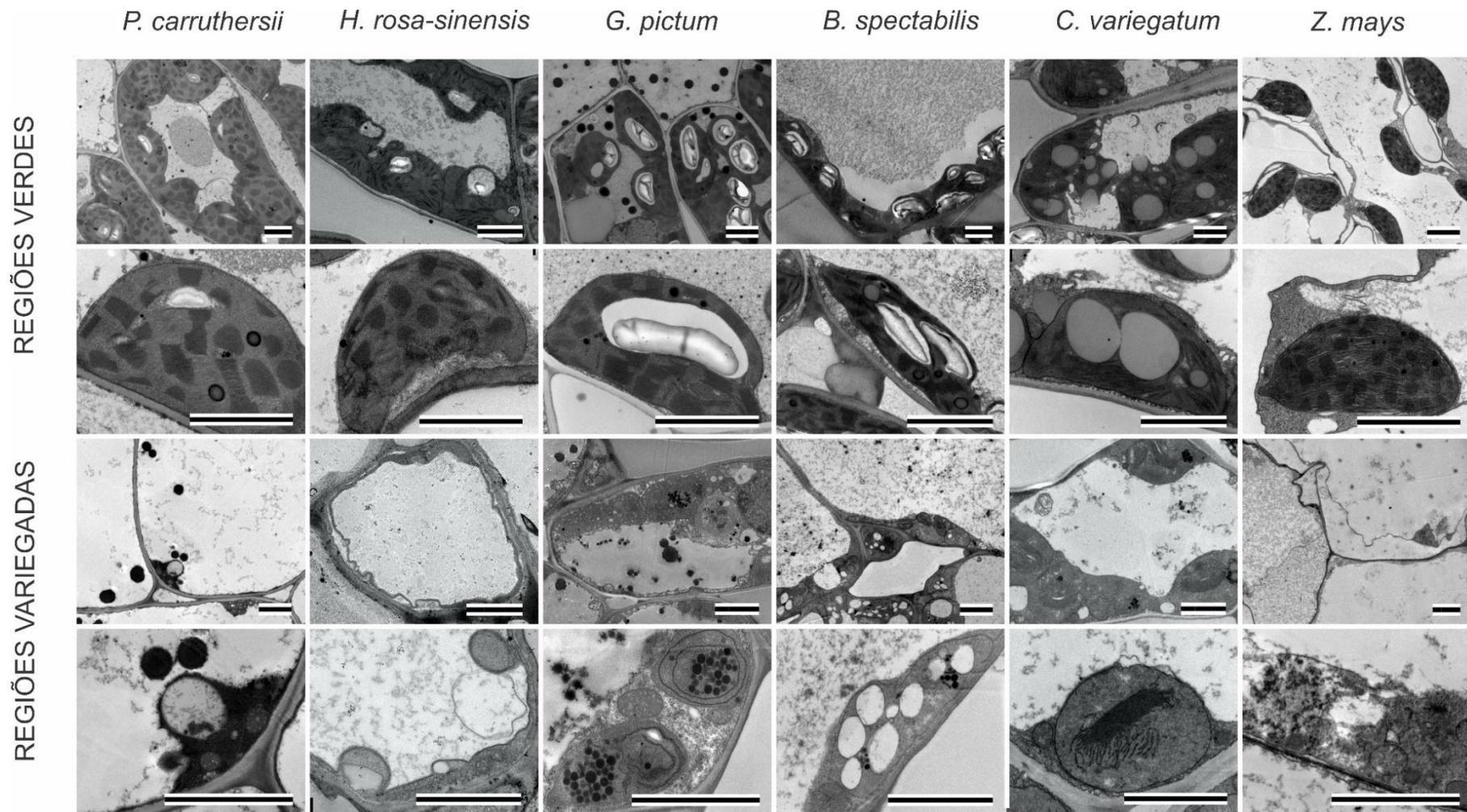


Figura 5 – Ultraestrutura de células do clorênquima ou mesofílicas de seis espécies diferentes analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. Destaca-se a ultraestrutura de cloroplastos (plastídios). Barra de escala = 3 µm.

1.3.4 Estômatos na face abaxial

Análises por microscopia de luz e epifluorescência revelaram estômatos presentes somente na face abaxial (hipoestomática) (exceto em *Z. mays* que apresentou em ambas as faces), nas regiões verdes e variegadas das espécies avaliadas (Fig. 6 e Fig. 7). As análises nas folhas variegadas mostraram a presença células-guarda íntegras e aparentemente funcionais, com aparência similar aos setores não mutantes (regiões verdes) com presença de cloroplastos contendo pigmentos (Fig. 6 e Fig. 7). Observou-se em média 6 a 8 cloroplastos em cada uma das células-guarda nas espécies Eudicotiledôneas (Fig. 7) e em *Z. mays* apenas dois cloroplastos localizados nas extremidades das células-guarda em formato de halteres (Fig. 7).

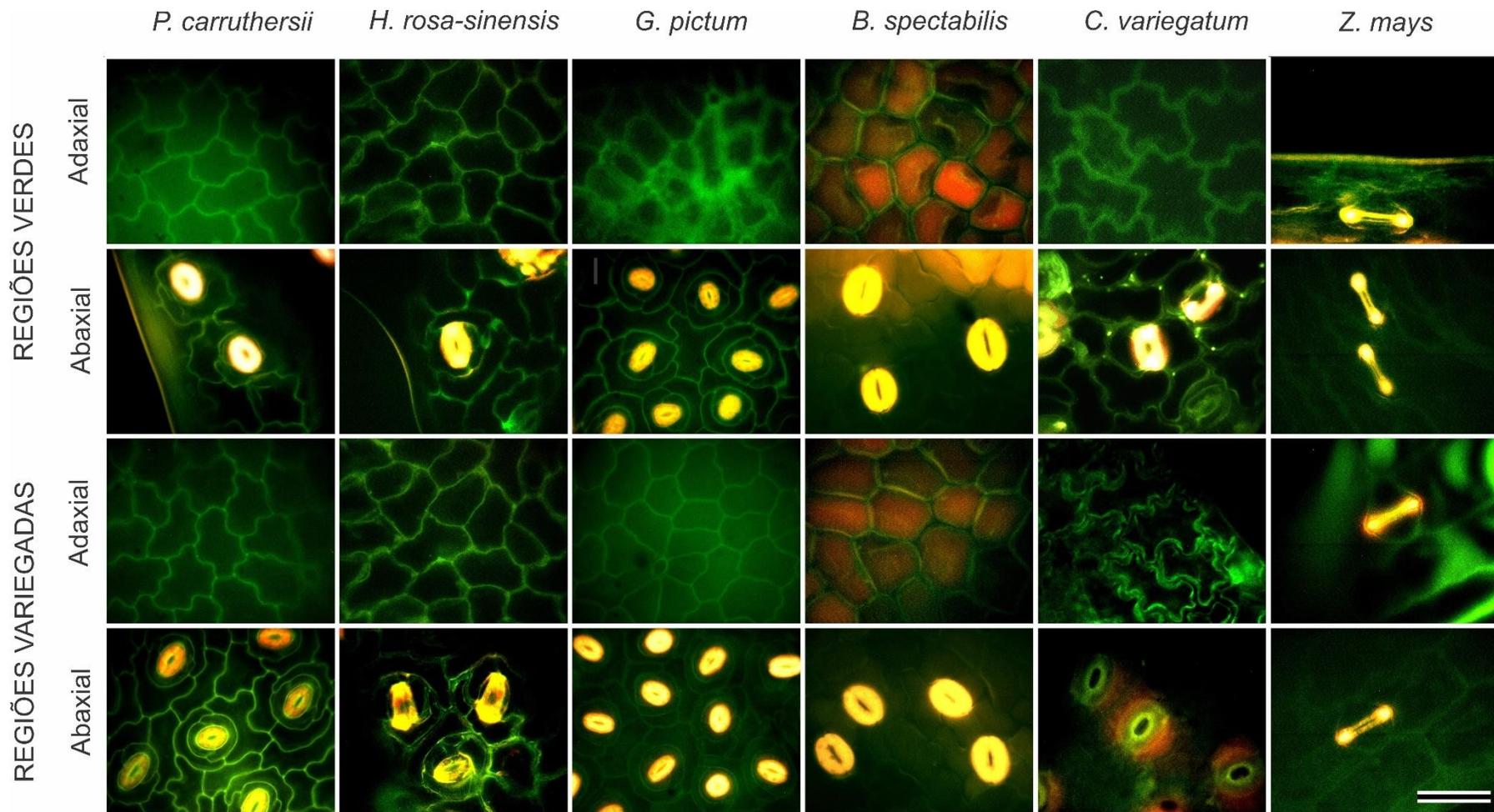


Figura 6 – Fragmentos epidérmicos visualizados pela microscopia de fluorescência usando amostras frescas (*in vivo*) com excitação em luz azul ($\lambda 460-470$ nm) na face adaxial e abaxial, corados com diacetato de fluoresceína (FDA – cor verde) evidenciando a presença de células integras (cor amarela). Barra de escala = 50 μ m.

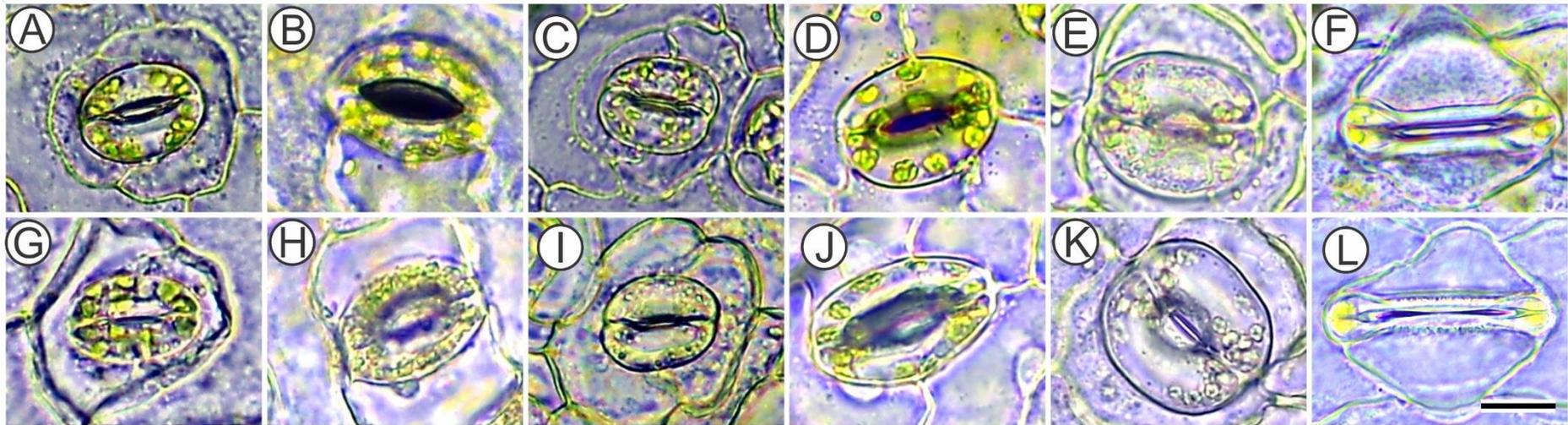


Figure 7 – Microscopia de luz de fragmentos frescos da epiderme abaxial, mostrando detalhes dos estômatos (*in vivo*) evidenciando a presença de pigmentos fotossintéticos. (A, G) *Pseuderanthemum carruthersii* var. *variegatum*, (B, H) *Hibiscus rosa-sinensis* “*variegata*”, (C, I) *Graptophyllum pictum*, (D, J) *Bougainvillea spectabilis* var. *variegatum*, (E, K) *Codiaeum variegatum.*, (F, L) *Zea mays*. (A, B, C, D, E, F) das regiões verdes e (G, H, I, J, K, L) regiões variegadas das folhas. Barra de escala = 10 μ m.

1.3.5 Espectros de fluorescência em folhas

As curvas de fluorescência da clorofila das regiões verde e albinas foram distintas (Fig. 8). Diferenças também foram observadas em relação a fonte de iluminação disponível na excitação ($\lambda 435$ ou $\lambda 532$ nm). Além disso, foram encontradas diferenças nas curvas em relação ao lado da folha em que ocorreu a excitação e detecção da emissão da fluorescência (adaxial ou abaxial).

Nas folhas verdes, a excitação e detecção na mesma face (adaxial-adaxial ou abaxial- abaxial), em $\lambda 435$ e $\lambda 532$ nm, promoveu dois picos principais de emissão da fluorescência [(Fr; 685 ± 10 nm e Ffr; 730 ± 6 nm, (Fig. 8A - D)] No entanto, com excitação em $\lambda 532$, observou-se o deslocamento do pico Fr para Ffr, associado a menor razão Fr/Ffr, em relação a excitação em $\lambda 435$. Ainda, quando a excitação e detecção ocorreram em faces opostas (adaxial-abaxial ou abaxial-adaxial), observou-se maior emissão da fluorescência em Ffr em relação a emissão em Fr, e redução expressiva das razões Fr/Ffr (Fig. 8E - H).

Folhas albinas exibiram forte pico de emissão da fluorescência em Fr, e em escala mínima o pico de emissão em Ffr, quando excitados em $\lambda 435$ ou $\lambda 532$ nm. Adicionalmente as razões das áreas obtidas pelos ajustes gaussianos mostraram um incremento significativo na razão entre bandas Fr/Ffr nos setores albinos em relação aos setores verdes (Fig. 8I - P). Ressalta-se que as diferenças observadas nos setores albinos, em relação as faces de excitação e detecção, e em função da qualidade da luz de excitação, foram pouco expressivas, quando comparadas com as diferenças observadas nas folhas verdes.

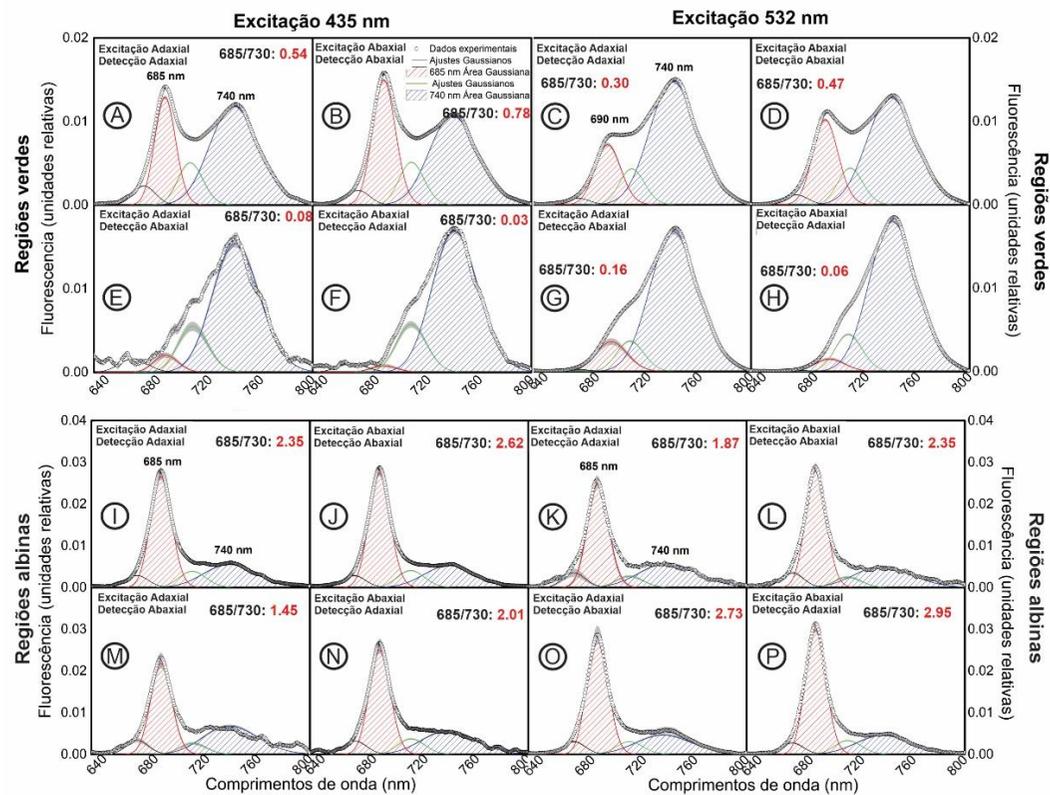


Figura 8 – Espectros de emissão da fluorescência nas folhas com excitação e detecção da emissão na mesma face (adaxial – adaxial e abaxial – abaxial) e excitação e detecção da emissão em faces opostas (adaxial – abaxial e abaxial – adaxial) da folhas, sob comprimentos de onda de excitação em $\lambda 435$ nm e $\lambda 532$ nm, nas regiões verdes e albinas da espécie *H. rosa-sinensis*. Áreas vermelhas e azuis sob os espectros de fluorescência representam as áreas dos picos máximos fixados em 685 nm e 730 nm, respectivamente. As linhas sólidas em preto e verde mostram as curvas de ajustes gaussianos (com flexibilidade para a largura) ajustados individualmente com 8 espectros distintos, seguido pelo cálculo da média. Espectros obtidos em temperatura ambiente (25 °C). (n=8±SE).

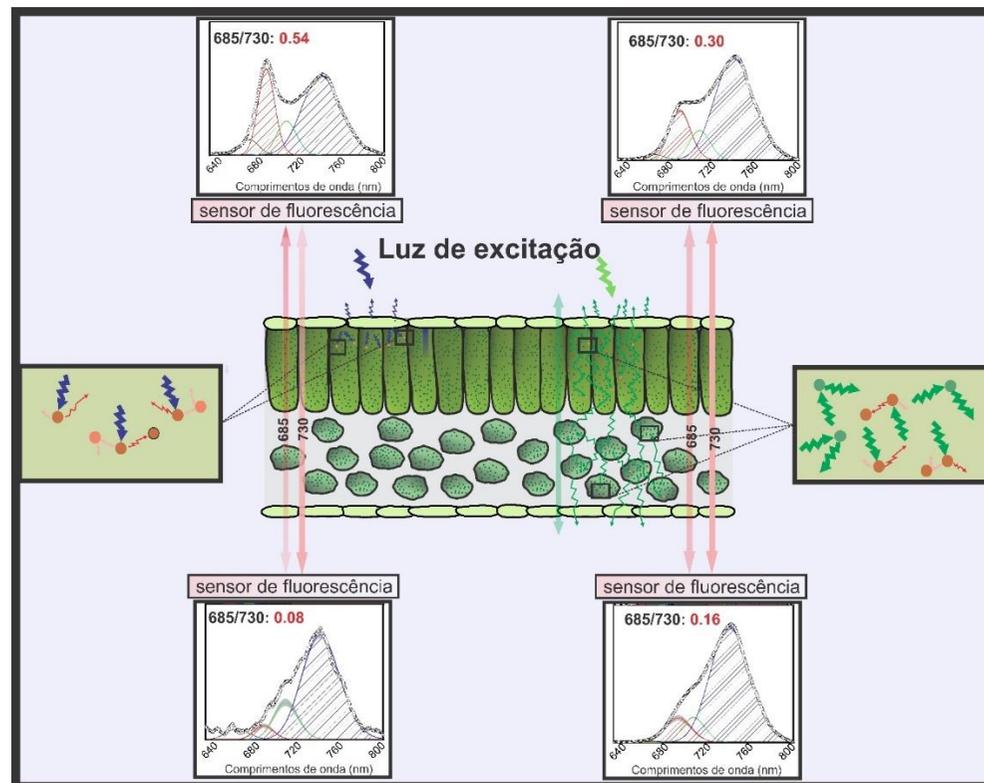


Figura 9 – Representação esquemática da emissão e absorção da fluorescência através do perfil óptico de uma folha verde típica com células epidérmicas, parênquima paliádico, lacunoso, espaços intercelulares e cloroplastos típicos contendo pigmentos (clorofilas e carotenoides), após a excitação com laser azul ($\lambda 435$ nm) e verde ($\lambda 532$ nm). As excitações estão representadas pelas setas maiores das respectivas cores. As setas menores indicam possíveis caminhos ópticos a serem percorridos e a interação com as moléculas de clorofilas com os respectivos comprimentos de onda. Setas retilíneas representam o caminho óptico da fluorescência até alcançarem os sensores posicionados nas faces adaxial e abaxial. As cores das setas, representam os picos máximos de fluorescência das folhas em 685 nm (Fr; seta vermelha) e 735 nm (Ffr; seta rosa) com um gradiente de intensidade da cor com tendência ao branco, indicando redução da intensidade.

1.4 DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que os pigmentos presentes nos cloroplastos são responsáveis pela maior parte da luz absorvida pela folha, em relação a radiação fotossinteticamente ativa (PAR; 400-700 nm). Por outro lado, nos componentes estruturais (extra-cloroplastídicos) a luz é minimamente absorvida, e conseqüentemente não há discriminação dos comprimentos de onda (picos de absorção) na interação da luz na região do visível com a parte estrutural da folha. Ainda, a reflectância e transmitância da luz desempenham papel indireto potencializando a absorção (quando há a presença de moléculas absorvedoras), mas não governam as características ou assinaturas ópticas em relação ao formato ou padrão das curvas espectrais nas espécies estudadas. Em outras palavras, os fenômenos de reflexão e transmissão da luz na folha tem influência em termos de magnitude da resposta, enquanto a absorção é o fenômeno que molda os padrões das curvas espectrais, uma vez que promove a extinção da luz dentro do perfil foliar (LICHTENTHALER, 1987; VOGELMANN, 1993).

Nas folhas a interação da radiação eletromagnética (reflexão, transmissão e absorção) depende basicamente das suas características físicas e químicas. Enquanto a presença de moléculas fortemente absorvedoras como as clorofilas e carotenoides governam majoritariamente a absorção, a porção estrutural apresenta forte influência sobre parâmetros de reflectância e transmitância no interior da folha. A luz que interage com os componentes estruturais foliares (extra-cloroplastídico) é minimamente absorvida sendo refletida e/ou transmitida. Isto pôde ser observado nas curvas espectrais dos setores albinos (Fig. 2B, 2D e 2F), em que ocorreu a ausência de cloroplastos contendo clorofilas e carotenoides nas células do mesófilo (Fig. 5). Além disso, os espectros de absorção dos setores albinos das espécies *P. carruthersii* e *H. rosa-sinensis* foram similares ao espectro das folhas de milho tratado com o herbicida inibidor da síntese de carotenoides (Fig. 2D). Ressalta-se que são folhas completamente distintas em níveis estruturais entre plantas Eudicotiledoneas e Monocotiledoneas. Por exemplo, no milho observou-se a característica anatômica do tipo “Kranz” com células distintas no mesofilo e na bainha do feixe vascular, típicas de plantas C4 (JOHANSEN, 1940), além de espessura foliar mais fina e células da bainha do feixe dispostas concentricamente (Fig. 4). Por outro lado, quando houve a presença de moléculas fortemente absorvedoras, como os carotenoides presentes nos setores amarelos das espécies *G. pictum*, *B. spectabilis* e *C. variegatum*, constatou-se alterações nos formatos das curvas de absorção em relação àquelas obtidas

dos setores albinos (Fig. 2D), evidenciando a influência de moléculas absorvedoras em detrimento dos componentes estruturais no formato das curvas espectrais.

Ressalta-se que nos setores albinos e amarelos ocorreu alta absorção da luz em comprimento de onda menores do que 400 nm. No entanto, é atribuída a presença de pigmentos não fotossintéticos como composto fenólicos, flavonoides e alcaloides que absorvem fortemente nessa faixa espectral (BAE et al., 2006; GITELSON et al., 2017; GITELSON; SOLOVCHENKO, 2018; LLORACH et al., 2008; NOGALES-BUENO et al., 2017). Porém, nos setores albinos, a absorbância em comprimentos de ondas maiores que 520 nm foi próxima de zero, onde observou-se elevados índices de transmitância e de reflectância da luz (Fig. 2B, 2D e 2F). Por outro lado, nos setores amarelos das espécies *C. variegatum* *G. pictum* e *B. spectabilis* ocorreu a absorção substancial da luz nas bandas próximas a 490 nm, atribuído a forte interferência dos carotenoides que absorvem nessa faixa do espectro. Ademais, ressalta-se a ocorrência de um pequeno pico de absorção característico de moléculas de clorofilas em 674 nm nos setores albinos e amarelos (Fig. 2D).

Corroborando com o que foi discutido acima, ao analisar detalhadamente a ultraestrutura foliar através de técnicas de microscopia eletrônica, observou-se que as células mesofilicas dos setores albinos das espécies *P. carruthersii*, *H. rosa-sinensis* e *Z. mays* mostraram-se ausentes de cloroplastos e, conseqüentemente, de clorofilas e carotenoides, contendo apenas algumas estruturas semelhantes a vesículas (Fig. 5). Por outro lado, os setores amarelos das espécies *G. Pictum*, *B. spectabilis* e *C. variegatum* apresentaram plastídios atípicos, aparentemente não funcionais, de formato irregular, em detrimento de cloroplastos com tilacoides empilhados, plenamente desenvolvidos que foram observados nas secções verdes das folhas (Fig. 5). Não obstante, essas espécies apresentaram acúmulo de carotenoides, mas não de clorofilas nas células do mesofilo, e isto pôde ser confirmado com os espectros de absorção da folha *in vivo* e dos pigmentos *in vitro* extraídos em solução de acetona (Fig. 2D, Fig. 3B, 3D e 3F).

Na epiderme abaxial dos setores foliares variegados (albino e amarelo) foram identificadas células-guarda com aparência similar aos setores não mutantes (regiões verdes) com presença de cloroplastos contendo pigmentos (Fig. 6 e Fig. 7). Logo, a presença do pico de absorção em 674 nm pôde ser atribuído as clorofilas residuais presentes nos cloroplastos das células-guardas nos setores albinos e amarelos. Ressalta-se ainda, que no tratamento com clomazone em milho, mesmo com a formação de folhas albinas, houve a presença de células-guarda com morfologia aparentemente inalterada,

incluindo cloroplastos contendo clorofila (ROELFSEMA et al., 2006). Detectou-se insensibilidade das células-guarda à ação do herbicida. Não se conhece nenhum mecanismo diferencial da biossíntese de carotenoides e fitol nas células-guarda e, possivelmente, essa insensibilidade ao clomazone seja decorrente da ausência de plasmodesmas (WILLE; LUCAS, 1984) e restrição ao influxo do herbicida nas células ou ainda a algum mecanismo desconhecido.

Parâmetros de fluorescência *in vivo* de plantas variegadas foram discutidos em diversos trabalhos (BRODERSEN; VOGELMANN, 2010; DAYAN; ZACCARO, 2012; LYSENKO, 2012; MATISHOV; LYSENKO; SOIER, 2010; ROELFSEMA et al., 2006; VILFAN et al., 2016; VOGELMANN; HAN, 2000; VOGELMANN; BORNMAN; YATES, 1996; ZHANG et al., 2016). Os autores concordam que setores albinos são considerados uma boa ferramenta para identificar as características fotossintéticas dos estômatos, evitando problemas de contaminação no isolamento dos cloroplastos das células-guarda com células decorrentes do mesófilo, mantendo a integridade das amostras em sistema *in vivo* (BRANCH et al., 2004; DAYAN; ZACCARO, 2012; EVANS, 1987; LI; NOTHNAGEL, 1988; LYSENKO, 2012; MATISHOV; LYSENKO; SOIER, 2010; ROELFSEMA et al., 2006; ZEIGER, 1982; ZEIGER; ARMOND; MELIS, 1981). Apesar de ser um tema um tanto quanto controverso em termos de eficiência fotossintética, a maior parte dos trabalhos revelam desvios cinéticos nos parâmetros de fluorescência dos setores albinos em relação aos setores verdes. Possivelmente isto está associado a um desarranjo ou perturbação no transporte linear de elétrons nos tilacoides nos cloroplastos das células-guarda (LYSENKO, 2012; NIELSEN; NIELSEN, 2006; ZEIGER; ARMOND; MELIS, 1981). Em nossos resultados, observou-se alterações no padrão da curva de fluorescência dos setores albinos em relação às regiões verdes (Fig. 8). Nos setores verdes, evidenciou-se os dois picos característicos da curva de fluorescência da clorofila, o primeiro entre 680-690 nm atribuído principalmente ao fotossistema II, e o segundo em 730-740 nm atribuído principalmente ao fotossistema I (CROCE; AMERONGEN, 2014; MATISHOV; LYSENKO; SOIER, 2010; VILFAN et al., 2016). Por outro lado, nos setores albinos observou-se majoritariamente o pico em 685 nm. Neste caso em particular, a curva de fluorescência pôde ser considerada um biomarcador espectral que indica a presença de clorofilas residuais nas células-guarda e ausência de contaminação por clorofilas nas células do mesófilo, corroborados com os dados obtidos por microscopia de luz, epifluorescência e eletrônica de transmissão.

Não obstante, o espectro de emissão de fluorescência da clorofila *a* também pode ser considerado uma ferramenta útil no entendimento dos padrões ópticos foliares. O padrão espectral de emissão de fluorescência da clorofila em folhas verdes, obtido em temperatura ambiente, exibe dois picos máximos de emissão em 675-690 nm (vermelho) e 730-740 nm (vermelho distante). No entanto, existe uma sobreposição do espectro de emissão da fluorescência na banda do vermelho (Fr) e o espectro de absorção das clorofilas que absorvem fortemente nessa região. De tal forma, a emissão em Fr é parcialmente reabsorvida pelas clorofilas, enquanto a emissão da fluorescência no vermelho distante (Ffr) não é influenciada pela reabsorção (BUSCHMANN, 2007; PEDRÓS et al., 2008). Desse modo, a razão Fr/Ffr diminui com o aumento do conteúdo de clorofila no sistema, pois aumenta a probabilidade de reabsorção, promovendo um deslocamento na posição de Fr em direção a Ffr (BUSCHMANN; LANGSDORF; LICHTENTHALER, 2008; BUSCHMANN, 2007; CHERIF et al., 2010; VOGELMANN; HAN, 2000). Ainda, diferenças no espectro de emissão da fluorescência podem ser observadas dependendo se a luz de excitação é posicionada na face superior (adaxial) ou na face inferior (abaxial) da folha, e isso pode ser atribuído a diferentes graus de reabsorção de Fr, devido a diferenças na densidade e distribuição dos cloroplastos e conseqüentemente clorofilas, entre as células do parênquima paliçádico e o parênquima lacunoso (BUSCHMANN; LANGSDORF; LICHTENTHALER, 2008; BUSCHMANN, 2007; LICHTENTHALER et al., 1998).

De fato, o comportamento espectral de emissão da fluorescência da clorofila em folhas verdes *in vivo*, pode ser atribuído principalmente ao conteúdo do pigmento, e em menor grau as características ópticas do sistema foliar e disposição das células no tecido da folha (BUSCHMANN; LANGSDORF; LICHTENTHALER, 2008; BUSCHMANN, 2007). Nossos resultados mostraram que as razões Fr/Ffr medidas na porção verde da espécie *H. rosa-sinensis*, aumentaram quando a luz de excitação foi posicionada na face abaxial da folha em relação a luz posicionada na face adaxial, independente do feixe de laser de excitação (azul ou verde; λ 435 e 532 nm), mostrando um leve deslocamento do pico Ffr em direção ao Fr (Fig. 8A-B e 8C-D). Isso pôde ser atribuído a menor densidade de distribuição dos cloroplastos e clorofilas nas células do parênquima lacunoso (Fig. 4). No entanto, a novidade relevante nesse trabalho encontra-se no fato metodológico da detecção da emissão na face oposta da excitação com iluminação sobre a face adaxial e detecção na face abaxial (ou vice-versa). Neste caso, observou-se forte redução na razão Fr/Ffr quando excitada com luz azul (Fig. 8E e 8F) e em menor grau quando excitada

com a luz verde (Fig. 8G e 8H). Sob excitação com luz azul, constatou-se forte deslocamento dos picos Fr em direção a Ffr, mas quando excitada com luz verde o deslocamento ocorreu de forma menos intensa. Isso demonstra uma forte influência da penetrabilidade da luz nos padrões espectrais da fluorescência da clorofila conforme modelo proposto na Figura 9, discutido a seguir.

Nos setores verdes das plantas de hibisco, quando a excitação e a detecção da emissão foram realizadas ambas na face adaxial, com luz azul (435 nm), nossos resultados mostraram um pico maior em 685 nm em relação ao pico em 730 nm (Fig. 8A). Quando a excitação foi promovida pela luz verde ($\lambda 532$), no entanto, a proporção Fr/Ffr reduziu significativamente (Fig. 8C). A luz azul é fortemente absorvida nos primeiros micrômetros no clorênquima, enquanto a luz verde tende a penetrar mais profundamente no perfil foliar (BRODERSEN; VOGELMANN, 2010). De tal forma, quando excitado com luz azul, a fluorescência emitida pela clorofila fica a uma curta distância para sair do sistema óptico foliar quando detectada na mesma face (adaxial-adaxial ou abaxial-abaxial). Assim, detectou-se maior emissão do pico Fr devido ao menor caminho óptico percorrido para que a luz saísse do sistema, o que promoveu a menor reabsorção de Fr e, conseqüentemente, maiores razões de Fr/Ffr. No entanto quando a folha foi excitada com a luz verde ocorreu maior penetrabilidade da luz, e a emissão ocorreu em camadas celulares mais profundas. De tal forma, o caminho óptico da fluorescência emitida em Fr até alcançar os limites da folha e sair do sistema para ser detectado pelo sensor posicionado na face adaxial foi mais longo. Isso aumentou a probabilidade de Fr ser reabsorvido promovendo o deslocamento em direção a Ffr e, conseqüentemente, reduzindo a razão de bandas (Fig. 8C).

Não obstante, quando a emissão da fluorescência foi detectada na face oposta à luz de excitação, quando excitada com a luz azul, ocorreu redução drástica da razão Fr/Ffr associado ao forte deslocamento de Fr em direção à Ffr (Fig. 8E). Uma vez que a excitação e emissão da fluorescência ocorrem principalmente nas clorofilas presentes nas primeiras camadas celulares da folha, o aumento do caminho óptico percorrido para que Fr saísse do sistema pela face abaxial, onde estava posicionado o sensor, aumentou a probabilidade dessa luz ser reabsorvida e diminuiu consideravelmente a intensidade de detecção de Fr. Por outro lado, quando a folha foi iluminada com a luz verde o deslocamento dos picos ocorreu de forma mais sutil, associado a menores intensidades da redução na razão Fr/Ffr (0,08 quando excitada com luz azul e 0,16 quando excitada com luz verde). Ressalta-se novamente, que a maior penetrabilidade da luz verde nas folhas

aumenta a possibilidade de dispersão da luz ao longo do perfil foliar onde ocorre a absorção e emissão da fluorescência. Dessa forma, o caminho óptico percorrido para que o Fr emitido saia do sistema na face adaxial não é muito diferente do caminho óptico percorrido para a que a luz saia do sistema pela face abaxial. Isso explica as diferenças nos padrões espectrais de emissão da fluorescência e, conseqüentemente, as diferenças de intensidades das razões Fr/Ffr quando a folha foi excitada com luz azul, em relação a excitação com a luz verde, quando a detecção ocorreu no lado oposto da excitação. Assim sendo, os dados apontam para uma maior penetrabilidade da luz verde em relação à luz azul. Em especial, a luz verde, embora penetre mais profundamente, é absorvida pelas clorofilas ao longo do perfil foliar e capaz de promover a fluorescência. Do ponto de vista fotossintético, a luz azul seria responsável pela fotossíntese em regiões mais superficiais da folha, enquanto a luz verde promove fotossíntese em regiões mais internas da folha (FALCIONI et al., 2017).

Ainda, ao analisar os espectros de emissão da fluorescência dos setores albinos da espécie *H. rosa-sinensis* (Fig. 8I–P), observou-se pouca alteração no padrão espectral de emissão da clorofila. Ressalta-se que, neste caso específico, a emissão da fluorescência decorreu exclusivamente das células guardas presentes na face abaxial das folhas e diferentemente das análises nos setores verdes, não houve a influência da reabsorção pelas clorofilas distribuídas ao longo do perfil foliar. De tal forma, a resposta espectral observada pôde ser atribuída principalmente a interação da luz com componentes estruturais e a presença de espaços intercelulares. As pequenas alterações no padrão espectral e nas razões Fr/Ffr, possivelmente estão associadas ao espalhamento promovido pela interação da luz com a porção estrutural da folha. Assim, evidencia-se que o padrão espectral de emissão de fluorescência das clorofilas é decorrente, principalmente, do conteúdo de clorofilas, mas também responde fortemente ao perfil de penetrabilidade da luz no sistema óptico (BUSCHMANN; LANGSDORF; LICHTENTHALER, 2008) e em menor escala, atribuído a interação da luz com a porção estrutural da folha.

Corroborando com os dados de fluorescência da clorofila, a luz azul que possui alto índice de absorvidade pelas clorofila é eficientemente absorvidas nas primeiras camadas celulares (BRODERSEN; VOGELMANN, 2010; FALCIONI et al., 2017; SUN; NISHIO; VOGELMANN, 1998; TERASHIMA et al., 2009) enquanto a luz verde tem maior possibilidade de ser refletida, uma vez que o coeficiente de absorção das moléculas é mais baixo. Em especial, a própria interação da luz com o pigmento aumenta o espalhamento da luz ao longo do perfil foliar nessa faixa do espectro.

Os dados das curvas de absorvância na faixa espectral do visível dos pigmentos fotossintéticos extraídos em solventes orgânicos (*in vitro*), evidenciaram que a maior parte da energia é absorvida seletivamente em comprimentos de onda em 430 nm e 460 nm no azul, e no vermelho em 663 nm correspondentes aos picos máximos de absorção característicos das moléculas de clorofila *a* e *b* em solução (CROCE; AMERONGEN, 2014). Contudo, a absorvância na faixa de 500 a 600 nm, correspondentes as bandas do verde e amarelo, foram próximas de zero (Fig. 3A). Por outro lado, os espectros de absorção característico de folhas verdes (*in vivo*) mostraram linearidade de absorção na faixa espectral do azul, com decaimento na faixa do verde, com vale máximo em 550 nm, seguido por alta absorção na faixa do vermelho (Fig. 2C). A linearidade observada na faixa do azul se deve a sobreposição da absorção por diferentes cromóforos (pigmentos fotossintéticos e não fotossintéticos). Na faixa do vermelho, observou-se certa similaridade no formato da curva em relação aos pigmentos *in vitro* (Fig. 2C e Fig. 3A). Ressalta-se que não existe evidências da presença de moléculas fortemente absorvedoras nessa faixa do espectro além das clorofilas (FANKHAUSER; CHORY, 1997).

Observa-se ainda que houve um deslocamento do pico máximo de 663 nm, no espectro dos pigmentos extraídos em solução *in vitro* para 674 nm observado no espectro de absorção das folhas *in vivo*, além de um evidente alargamento de suas bases (Fig. 2C e Fig. 3A). O deslocamento dos picos assim como o alargamento das bases, possivelmente ocorrem devido aos padrões espectrais das folhas, serem distintos daquele dos pigmentos fotossintéticos extraídos em solventes orgânicos. Em solução os pigmentos ficam uniformemente distribuídos. Por outro lado, na folha estão agrupados em alta concentração nos cloroplastos, especificamente nos complexos-antena nas membranas dos tilacoides. Isso cria um ambiente que fortalece a interação pigmentos-pigmentos e pigmentos-proteínas alterando as propriedades espectroscópicas dos sistemas ópticos foliares (SOMSEN; VAN GRONDELLE; VAN AMERONGEN, 1996).

Apesar da luz verde ser a fração mais refletida e mais transmitida pela folha dentro do chamado espectro PAR, ressalta-se que ocorre absorção substancial dessa faixa espectral (FALCIONI et al., 2017; MORIWAKI et al., 2019). No entanto, permanece a questão de como é possível que as plantas absorvam a luz verde mesmo quando o espectro de absorção dos pigmentos extraídos em solução revela baixa absorvância nesta faixa espectral. De fato, essa é uma questão muito controversa e que requer ainda muitos outros experimentos. No entanto, em nossos resultados de curvas de fluorescência *in vivo*, quando um pequeno setor da folha verde foi excitado com luz em $\lambda 532$ nm, observou-se

a aparecimento da curva típica de fluorescência da clorofila (Fig. 9C e 9D), ou seja, existiam moléculas deste pigmento que eram passíveis de absorção e emissão da fluorescência, naquele comprimento de onda específico do espectro, dentro do sistema *in vivo* na folha. Supostamente, isso ocorreu (ou foi potencializado) em função do ambiente altamente concentrado em que se encontravam as moléculas de clorofila.

A alta concentração de clorofilas nos complexos antenas aumenta os níveis de degenerescência quântica (mesma quantidade de energia, mas em estados quânticos distintos) devido à interação entre moléculas (energia vibracional) e campo elétrico entre as moléculas (MIRKOVIC et al., 2017). Em resumo, amplia a curva espectral de absorção *in vivo* quando os pigmentos se encontram altamente concentrados, mas não em solução diluída, cuja interação entre as moléculas é menor devido a presença do solvente entre elas. Esse fenômeno não está associado à interação clorofila-carotenoide ou clorofila-proteína podendo ser atribuído apenas à interação clorofila-clorofila (PARK et al., 2019). Ademais, a interação da luz verde com a própria molécula de clorofila quando não absorvida, aumenta ainda mais a difusividade e o caminho óptico percorrido pela luz (BRODERSEN; VOGELMANN, 2010; TERASHIMA et al., 2009; VOGELMANN; EVANS, 2002; VOGELMANN; HAN, 2000; VOGELMANN, 1993). Em outras palavras, quando a molécula de clorofila está num nível energético incompatível com a absorção de um comprimento de onda em particular, a luz interage com a molécula e é reemitida integralmente sem alterações no nível energético da luz. Isso ocorre de forma intensa na faixa do verde, aumentando consideravelmente a difusibilidade da luz dentro do sistema, possibilitando que a luz re-emitida possa encontrar as moléculas que estejam num nível quântico passíveis de absorverem nessa faixa do espectro (KUME, 2018). Isso explicaria o aumento considerável da absorção na folha, em relação a absorção dos pigmentos extraídos em solução, reafirmando a ideia dos pigmentos superconcentrados em estruturas supra-moleculares, como as membranas dos tilacoides, são passíveis de absorver essa fonte de energia. No sistema óptico foliar, a reflectância interna é um mecanismo físico importante que maximiza a absorção de comprimentos de onda de baixo coeficiente de absorvidade como no caso da luz verde.

1.5 CONCLUSÃO

Os pigmentos cloroplastídicos respondem pela maior parte da absorbância foliar da luz no espectro do visível, sendo baixa a absorção dos componentes extra-cloroplastídicos nessa faixa espectral. As assinaturas espectrais de setores albinos de plantas variegadas mostram alguma interferência de componentes extra-cloroplastídicos em comprimentos de onda abaixo de 400 nm (correspondentes ao azul e violeta), atribuído a presença de substâncias fenólicas contidas nas folhas das plantas. Ainda, em folhas amarelas demonstra-se o forte efeito dos carotenoides no espectro de absorção, em comprimentos de onda inferiores a 500 nm. De maneira inesperada, setores variegados apresentam células-guarda com pigmentos e morfologia similares às daquelas de folhas verdes, cuja interferência espectral pôde ser detectada.

Ainda, o padrão espectral de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* é fortemente influenciado pela reabsorção da luz emitida em Fr. O conteúdo de clorofilas, o perfil de penetrabilidade da luz no sistema óptico e, em menor escala, a interação da luz com a porção estrutural da folha interferem nos padrões de reabsorção da emissão da fluorescência dentro do perfil foliar. Os resultados também reafirmam a ideia de que a luz azul, que é uma faixa espectral com alto coeficiente de absorção pelas clorofilas, é eficientemente absorvida pelas folhas verdes, nos primeiros micrômetros das camadas celulares no parênquima paliádico (superfície adaxial), porém, isso diminui a absorção nas camadas inferiores, em vista que, a maior parte da luz será absorvida e pouco transmitida para essa camada. De modo contrário, a luz verde que possui menor índice de absorção pelos pigmentos, difunde-se pelas camadas celulares das folhas, aumentando a possibilidade de encontro da luz com as regiões de alta concentração dos pigmentos nos tilacoides, o que aumenta, de forma considerável, a absorção na folha em relação aos pigmentos extraídos em solução. Em especial, a própria interação da luz com as moléculas de clorofilas aumenta o espalhamento da luz ao longo do perfil foliar nessa faixa do espectro, aumentando a probabilidade de ser absorvida por uma molécula de clorofila passível de receber essa energia.

1.6 REFERÊNCIAS

- ALURU, M. R.; YU, F.; FU, A.; RODERMEL, S. Arabidopsis variegation mutants: New insights into chloroplast biogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 9, p. 1871–1881, 2006.
- ATRASHEVSKII, Y. I.; SIRKORSKII, A. V.; SIKORSKII, V. V.; STEL'MAKH, G. F. The reflection and scattering of light by a plant leaf. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 66, p. 101–108, 1999.
- BAE, R. N.; KIM, K. W.; KIM, T. C.; LEE, S. K. Anatomical observations of anthocyanin rich cells in apple skins. **HortScience**, v. 41, p. 733–736, 2006.
- BALDINI, E.; FACINI, O.; NEROZZI, F.; ARBOREE, C. Leaf characteristics and optical properties of different woody species. **Trees**, v. 12, p. 73–81, 1997.
- BRANCH, P. S.; GULLY, F.; CENTRE, D.; Agricultural. Ficus rubiginosa “Variegata”, a chlorophyll-deficient chimera with mosaic patterns created by cell divisions from the outer meristematic layer. **Annals of Botany**, n. 1996, 2004.
- BRODERSEN, C. R.; VOGELMANN, T. C. Do changes in light direction affect absorption profiles in leaves? **Functional Plant Biology**, v. 37, n. 5, p. 403–412, 2010.
- BUSCHMANN, C.; LANGSDORF, G.; LICHTENTHALER, H. K. Optical monitoring of fresh and processed agricultural crops. In: ZUDE, M. (org.). 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 576.
- BUSCHMANN, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. **Photosynthesis Research**, v. 92, p. 261–271, 2007.
- CHERIF, J.; DERBEL, N.; NAKKACH, M.; BERGMANN, H. V.; JEMAL, F. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 101, n. 3, p. 332–339, 2010.
- CROCE, R.; AMERONGEN, H. V. Natural strategies for photosynthetic light harvesting. **Nature Chemical Biology**, v. 10, p. 492–501, 2014.
- DAVIS, P. A.; CAYLOR, S.; WHIPPO, C. W.; HANGARTER, R. P. Changes in leaf optical properties associated with light-dependent chloroplast movements. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, n. 12, p. 2047–2059, 2011.
- DAYAN, F. E.; ZACCARO, M. L. M. Chlorophyll fluorescence as a marker for herbicide mechanisms of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, n. 3, p. 189–197, 2012.
- EVANS, J. R. The relationship between electron transport components and photosynthetic capacity in pea leaves grown at different irradiances. **Functional Plant Biology**, v. 14, p. 157–170, 1987.

FALCIONI, R.; MORIWAKI, T.; BONATO, C. M.; DE SOUZA, L. A.; 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.; DE OLIVEIRA, D. M.; ANDREOTTI, G. C.; DE SOUZA, L. A.; DOS SANTOS, W. D.; BONATO, C. M.; ANTUNES, W. C. Increased gibberellins and light levels promotes cell wall thickness and enhance lignin deposition in xylem fibers. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–13, 2018.

FANKHAUSER, C.; CHORY, J. Light control of plant development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 13, p. 203–229, 1997.

FERHATOGLU, Y.; BARRETT, M. Studies of clomazone mode of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, n. 1, p. 7–14, 2006.

FOURTY, T.; BARET, F.; JACQUEMOUD, S.; SCHMUCK, G.; VERDEBOUT, J. Leaf optical properties with explicit description of its biochemical composition: Direct and inverse problems. **Remote Sensing of Environment**, v. 56, p. 104–117, 1996.

GATES, D. M.; KEEGAN, H. J.; SCHLETER, J. C.; WEIDNER, V. R. Spectral properties of plants. **Applied Optics**, v. 4, p. 11–20, 1965.

GITELSON, A.; CHIVKUNOVA, O.; ZHIGALOVA, T.; SOLOVCHENKO, A. In situ optical properties of foliar flavonoids: Implication for non-destructive estimation of flavonoid content. **Journal of Plant Physiology**, v. 218, p. 258–264, 2017.

GITELSON, A.; SOLOVCHENKO, A. Non-invasive quantification of foliar pigments: Possibilities and limitations of reflectance- and absorbance-based approaches. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, p. 537–544, 2018.

GLIŃSKA, S.; GABARA, B. The effects of the anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on *Allium cepa* L. root tip cell ultrastructure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 93–98, 2011.

HATIER, J. H. B.; CLEARWATER, M. J.; GOULD, K. S. The functional significance of black-pigmented leaves: Photosynthesis, photoprotection and productivity in *Ophiopogon planiscapus* “Nigrescens”. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–13, 2013.

HUANG, C. N.; CORNEJO, M. J.; BUSH, D. S.; JONES, R. L. Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. **Protoplasma**, v. 135, p. 80–87, 1986.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co., 1940.

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

KUME, A. Importance of the green color, absorption gradient, and spectral absorption of chloroplasts for the radiative energy balance of leaves. **Journal of Plant Research**, v. 131, p. 501–514, 2018.

- LANG, M.; STOBER, F.; LICHTENTHALER, H. K. Fluorescence emission spectra of plant leaves and plant constituents. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 30, n. 4, p. 333–347, 1991.
- LI, Q.; NOTHNAGEL, E. A. Absence of variable fluorescence from guard cell chloroplasts of *Stenotaphrum secundatum*. **Plant Physiology**, p. 429–434, 1988.
- LICHTENTHALER, H. K.; WENZEL, O.; BUSCHMANN, C.; GITELSON, A. Plant stress detection by reflectance. **Annals New York Academy of Sciences**, p. 271–285, 1998.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350–382, 1987.
- LLORACH, R.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GIL, M. I.; FERRERES, F. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1028–1038, 2008.
- LUZ, R. B. Attenuated total reflectance spectroscopy of plant leaves: A tool for ecological and botanical studies. **New Phytologist**, v. 172, p. 305–318, 2006.
- LYSENKO, V. Fluorescence kinetic parameters and cyclic electron transport in guard cell chloroplasts of chlorophyll leaf tissues from variegated weeping (*Ficus benjamina* L.). **Planta**, v. 235, p. 1023–1033, 2012.
- MAAS, S. J.; DUNLAP, J. R. Reflectance, transmittance, and absorptance of light by normal, etiolated, and albino corn leaves. **Agronomy Journal**, v. 81, p. 105, 1989.
- MATISHOV, A. G. G.; LYSENKO, V. S.; SOIER, V. G. Cyclic electron transport around photosystems I and II in thylacoids of light green sectors of variegated *Ficus benjamina* L. leaves. **Doklady Biological Sciences**, v. 435, p. 425–427, 2010.
- MIRKOVIC, T.; OSTROUMOV, E. E.; ANNA, J. M.; VAN GRONDELLE, R.; GOVINDJEE; SCHOLE, G. D. Light absorption and energy transfer in the antenna complexes of photosynthetic organisms. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 2, p. 249–293, 2017.
- MOLLICK, A. S.; SHIMOJI, H.; DENDA, T.; YOKOTA, M.; YAMASAKI, H. Croton *Codiaeum variegatum* (L.) blume cultivars characterized by leaf phenotypic parameters. **Scientia Horticulturae**, v. 132, n. 1, p. 71–79, 2011.
- 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.
- NIELSEN, S. L.; NIELSEN, H. D. Pigments, photosynthesis and photoinhibition in two amphibious plants: Consequences of varying carbon availability. **New Phytologist**, v. 170, p. 311–319, 2006.

NOGALES-BUENO, J.; BACA-BOCANEGRA, B.; ROONEY, A.; MIGUEL HERNÁNDEZ-HIERRO, J.; JOSÉ-HEREDIA, F.; BYRNE, H. J. Linking ATR-FTIR and Raman features to phenolic extractability and other attributes in grape skin. **Talanta**, v. 167, n. February, p. 44–50, 2017.

PARK, S.; STEEN, C. J.; LYSKA, D.; FISCHER, A. L.; ENDELMAN, B.; IWAI, M.; NIYOGI, K. K.; FLEMING, G. R. Chlorophyll–carotenoid excitation energy transfer and charge transfer in *Nannochloropsis oceanica* for the regulation of photosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 9, p. 3385–3390, 2019.

PEDRÓS, R.; MOYA, I.; GOULAS, Y.; JACQUEMOUD, S. Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 7, n. 4, p. 498–502, 2008.

REDDY, G. S.; RAO, C. L. N.; VENKATARATNAM, L.; RAO, P. V. K. Influence of plant pigments on spectral reflectance of maize, groundnut and soybean grown in semi-arid environments. **International Journal of Remote Sensing**, v. 22, p. 3373–3380, 2001.

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, n. 1, p. 208–212, 1963.

ROELFSEMA, M. R. G.; KONRAD, K. R.; MARTEN, H.; PSARAS, G. K.; HARTUNG, W.; HEDRICH, R. Guard cells in albino leaf patches do not respond to photosynthetically active radiation, but are sensitive to blue light, CO₂ and abscisic acid. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 8, p. 1595–1605, 2006.

SAKAMOTO, W.; UNO, Y.; ZHANG, Q.; MIURA, E.; KATO, Y.; SODMERGEN. Arrested differentiation of proplastids into chloroplasts in variegated leaves characterized by plastid ultrastructure and nucleoid morphology. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, p. 2069–2083, 2009.

SOMSEN, O. J. G.; VAN GRONDELLE, R.; VAN AMERONGEN, H. Spectral broadening of interacting pigments: Polarized absorption by photosynthetic proteins. **Biophysical Journal**, v. 71, n. 4, p. 1934–1951, 1996.

SUN, J.; NISHIO, J. N.; VOGELMANN, T. C. Green light drives CO₂ fixation deep within leaves. **Plant and Cell Physiology**, v. 39, n. 10, p. 1020–1026, 1998.

TERASHIMA, I.; FUJITA, T.; INOUE, T.; CHOW, W. S.; OGUCHI, R. Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light: Revisiting the enigmatic question of why leaves are green. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 4, p. 684–697, 2009.

VILFAN, N.; VANDERTOL, C.; MULLER, O.; RASCHER, U.; VERHOEF, W. Fluspect-B: A model for leaf fluorescence, reflectance and transmittance spectra. **Remote Sensing of Environment**, v. 186, p. 596–615, 2016.

- VOGELMANN, T. C.; EVANS, J. R. Profiles of light absorption and chlorophyll within spinach leaves from chlorophyll fluorescence. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 1313–1323, 2002.
- VOGELMANN, T. C.; HAN, T. Measurement of gradients of absorbed light in spinach leaves from chlorophyll fluorescence profiles. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 1303–1311, 2000.
- VOGELMANN, T. C. Plant tissue optics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 231–251, 1993.
- VOGELMANN, T. C.; BORNMAN, J. F.; YATES, D. J. Focusing of light by leaf epidermal cells. **Physiologia Plantarum**, v. 98, p. 43–56, 1996.
- WILLE, A. C.; LUCAS, W. J. Ultrastructural and histochemical studies on guard cells. **Planta**, v. 160, n. 2, p. 129–142, 1984.
- WOOLLEY, J. T. Reflectance and transmittance of light by leaves. **Plant Physiology**, v. 47, p. 656–662, 1971.
- XIAO, Y.; THOLEN, D.; ZHU, X. G. The influence of leaf anatomy on the internal light environment and photosynthetic electron transport rate: Exploration with a new leaf ray tracing model. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 6021–6035, 2016.
- YU, F. E. I. et al. Variegation mutants and mechanisms of chloroplast biogenesis. **Plant Cell and Environment**, v. 30, p. 350–365, 2007.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 5. ed. Upper Saddle River - New Jersey: Pearson Education, 2010.
- ZEIGER, E. Fluorescence Transients., p. 642–647, 1982.
- ZEIGER, E.; ARMOND, P.; MELIS, A. Fluorescence properties of guard cell chloroplasts. **Plant Physiology**, v. 67, p. 17–20, 1981.
- ZHANG, Z. et al. Albino leaf 1 that encodes the sole octotricopeptide repeat protein is responsible for chloroplast development in rice. **Plant Physiology**, v. 171, p. 1182–1191, 2016.

CAPÍTULO 2

EFEITO DE DIFERENTES QUALIDADES ESPECTRAIS SOBRE O CRESCIMENTO E PERFIL FOTOSSINTÉTICO EM PLANTAS DE *NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA* L.

RESUMO

Neste trabalho buscou-se a compreensão detalhada sobre a participação e contribuição de diferentes bandas espectrais sobre os parâmetros fotossintéticos e de crescimento das plantas. Para tanto, plantas de tabaco (*Nicotiana plumbaginifolia* L.) foram cultivadas sob luz branca (400-700 nm), azul (450 nm), verde (555 nm) e vermelha (658 nm). Através de análise comparativa, e cruzamento de dados, obtidos com as diferentes fontes de luz nas medições das trocas gasosas, foi possível separar os efeitos distintos que influenciam nas respostas fotossintéticas: alterações fenotípicas influenciadas pelo ambiente em que as plantas se desenvolveram, e a qualidade da luz de excitação na condução da fotossíntese. Nas plantas cultivadas sob luz azul, alterações ultraestruturais a nível de cloroplasto, como menor empilhamento dos tilacoides, além de alterações bioquímicas na composição dessas membranas, estão associadas a maior eficiência na dissipação de energia de excitação e proteção do aparato fotossintético. Por outro lado, nas plantas cultivadas sob luz verde, às alterações estruturais e bioquímicas, como a maior proporcionalidade na relação entre membranas granais para estromais, e distribuição relativamente mais homogênea das proteínas do LHCII, contribuíram para o ajuste da partição de energia para os processos fotoquímicos em detrimento dos processos não-fotoquímicos. Ainda, os dados de trocas gasosas mostraram que a atividade fotossintética sob luz verde não é muito diferente da atividade fotossintética de plantas iluminadas com luz azul ou vermelha. Mesmo com redução significativa de absorção da luz na faixa espectral do verde em relação ao azul ou vermelho, sob alta disponibilidade de PPFD, as taxas fotossintéticas igualam-se ou mesmo são superiores dependendo da condição espectral (ambiente) de cultivo da planta. Sob alto PPFD, pressupõe maior eficiência da luz verde em governar a fotossíntese, em comparação a luz azul. Por fim, confirma-se que as plantas não discriminaram a luz verde do ponto de vista fotossintético, e que esta faixa espectral constitui uma importante fonte de energia para as plantas.

Palavras-chaves: Fluorescência da clorofila, fotossíntese, luz verde, qualidade espectral.

Abreviações:

α - rendimento quântico da fotossíntese; α_{abs} - rendimento quântico da fotossíntese sob luz absorvida; Φ_{PSII} - eficiência operacional do PSII; A - absorvância; A_{100} - taxa fotossintética líquida em $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; A_{max} - taxa fotossintética líquida máxima; BL - plantas crescidas sob luz azul; BM - fonte de luz azul na mediação das trocas gasosas; C_i - concentração intercelular de CO_2 ; F_m - fluorescência máxima medida na planta adaptada ao escuro; F_m' - fluorescência máxima medida na planta adaptada no claro; F_o - fluorescência mínima medida na planta adaptada ao escuro; F_o' - fluorescência mínima medida na planta adaptada no claro; F_s - fluorescência no estado estacionário; F_v - fluorescência variável; GL - plantas crescidas sob luz verde; GM - fonte de luz verde na mediação das trocas gasosas; g_s - condutância estomática; LHCI - complexo coletor de luz do PSI; LHCII - complexo coletor de luz do PSII; NPQ - quenching não fotoquímico; PAR - radiação fotossinteticamente ativa; PPFD - densidade de fluxo de fótons fotossintéticos; PS - ponto de saturação luminoso; PS_{abs} - ponto de saturação sob luz absorvida; PSI - fotossistema I; PSII - fotossistema II; qE - quenching dependente de energia; qN - fração da fluorescência variável dissipada no quenching não fotoquímico; qP - fração da fluorescência variável dissipada no quenching fotoquímico; qT - quenching do estado de transição; R - refletância; R_d - taxa de respiração no escuro; RL - plantas crescidas sob luz vermelha; RW - fonte de luz vermelha na mediação das trocas gasosas; T - transmitância; V_{cmax} - velocidade máxima de carboxilação da Rubisco; WL - plantas crescidas sob luz branca; WM - fonte de luz branca na mediação das trocas gasosas.

2.1 INTRODUÇÃO

A luz é a fonte de energia primordial para condução da fotossíntese. No entanto, a etapa fotoquímica só ocorre se houver pigmentos que absorvam a radiação eletromagnética, e promovam a transferência da energia até os centros de reação dos fotossistemas. Para capturar a luz disponível no ambiente e utilizá-la como fonte de energia, as plantas contêm pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenoides) que absorvem parte restrita do espectro solar entre 400 a 700 nm, conhecida como radiação fotossinteticamente ativa (PAR). O espectro padrão típico de absorção da luz pelas clorofilas em solução (*in vitro*) apresenta dois picos principais de maior absorvidade, o primeiro no azul (entre 430 e 460 nm para as clorofilas *a* e *b*, respectivamente) e outro no vermelho (640 e 662 nm para clorofila *b* e *a*, respectivamente) (CROCE; AMERONGEN, 2014). Na faixa espectral de 500 a 600 nm, correspondente principalmente ao verde e amarelo, muito pouco é absorvido pelas clorofilas (*in vitro*), sendo a maior parte da luz refletida e transmitida nessa faixa do espectro. Portanto, considera-se convencionalmente, que a luz vermelha e azul sejam as fotossinteticamente mais ativas (ARENA et al., 2016; EVANS; MORGAN; VON CAEMMERER, 2017).

De fato, a luz verde já foi considerada uma faixa espectral de baixa eficiência fotossintética, até mesmo opondo-se aos efeitos da luz vermelha e azul na condução da fotossíntese e crescimento das plantas (FOLTA; MARUHNICH, 2007; WANG; FOLTA, 2013; ZHANG; FOLTA, 2012). Por outro lado, estudos tem demonstrado que ao contrário dos pigmentos extraídos em solução (*in vitro*), as folhas verdes (*in vivo*) absorvem porção substancial da luz verde, que desempenha um papel fisiológico importante, possibilitando o aumento nas taxas fotossintéticas (FALCIONI et al., 2017; MORIWAKI et al., 2019; SUN; NISHIO; VOGELMANN, 1998; TERASHIMA et al., 2009). No entanto, ainda há escassez de informações, e muitas vezes contraditórias, sobre como a qualidade da luz, especialmente na faixa espectral que corresponde ao verde, influencia o crescimento, sobretudo, os processos fotossintéticos das plantas.

A fotossíntese inicia-se na captura de luz pelos pigmentos fotossintéticos. A energia de excitação é subsequentemente canalizada entre as moléculas de pigmentos até sua transferência para os centros de reação dos fotossistemas, onde ocorre a separação de cargas, e inicia-se a etapa da cadeia de transporte de elétrons. As reações fotoquímicas da fotossíntese ocorrem nos cloroplastos, especificamente nas membranas dos tilacóides, onde estão localizados os principais complexos fotossintéticos multiproteicos,

denominados de fotossistema I (PSI), fotossistema II (PSII), citocromo *b₆f* e ATP-sintase. Estes cooperam em série para conduzir a cadeia de transporte de elétrons acíclico e gerar o gradiente de potencial eletroquímico na membrana dos tilacoides, e a síntese de ATP pela ATP-sintase e formação do NADPH, para suprir a demanda energética no ciclo de Calvin-Benson, no qual ocorrem as reações carboxilativas de fixação de CO₂ pelas plantas. Ambos os fotossistemas I e II são compostos por um núcleo onde estão localizados os centros de reação, rodeado por uma porção constituída pelos seus respectivos complexos de coleta de luz denominados LHCI e LHCII, respectivamente (CAO et al., 2018; CROCE; AMERONGEN, 2014; HORTON, 2012; LONGONI et al., 2015; MIRKOVIC et al., 2017; WOOD et al., 2019).

Não obstante, os pigmentos não estão dispostos aleatoriamente na maquinaria fotossintética, mas sim formam um complexo altamente concentrado e estruturalmente organizado. Essa organização dos pigmentos em nanoescala pode variar em composição, número de moléculas e distribuição espacial dentro do complexo coletor de luz (MIRKOVIC et al., 2017). Ainda, o tamanho e a composição dos sistemas antenas podem sofrer mudanças dinâmicas em função do ambiente de luz disponível no crescimento das plantas (BOS et al., 2019; GRUSZECKI et al., 2010). Mecanismos adicionais que podem ocorrer na aclimatação da maquinaria fotossintética em resposta mudanças no ambiente de luz incluem alterações na organização e distribuição dos tilacóides nos cloroplastos (MORIWAKI et al., 2019), além de alterações estruturais e bioquímicas na composição das membranas, como variações na razão PSI/PSII, e composição proteica dos fotossistemas (CAO et al., 2018; DALL'OSTO et al., 2019; HOGEWONING et al., 2012).

Além das alterações relacionadas aos componentes estruturais fotossintéticos, outras características fisiológicas também podem ser alteradas em função do ambiente de luz. Por exemplo, as três vias de consumo da energia de excitação dos pigmentos são a dissipação fotoquímica, dissipação de calor e dissipação pela fluorescência da clorofila, em que ocorre a absorção e reemissão de fótons menos energéticos em comprimentos de ondas superiores aos fótons absorvidos (BAKER, 2008; MAXWELL; JOHNSON, 2000). Um ajuste fino na partição de energia de excitação entre esses processos pode contribuir para o uso eficiente da luz para conduzir a fotossíntese, ao mesmo tempo que evita danos fotooxidativos e fotoinibição na maquinaria fotossintética, especialmente em condições de alta luminosidade (CAO et al., 2018; MATSUDA et al., 2008; SUORSA et al., 2015).

É de amplo conhecimento que as plantas são capazes de responder à intensidade da luz, alterando suas características fenotípicas a fim de promover a máxima eficiência em seu crescimento, de acordo com a disponibilidade de luz que chega a sua superfície (EVANS; POORTER, 2001; FALCIONI et al., 2017, 2018; GIVNISH, 1988; MATHUR; JAIN; JAJOO, 2018; MORIWAKI et al., 2019; NIINEMETS, 2007). Por outro lado, faltam informações sobre como as plantas utilizam diferentes comprimentos de onda na faixa do visível e as proporções relativas de energia, para ajustar sua estrutura, composição, fisiologia e a partição dessa energia em condições de alterações espectrais adversas. Em geral, a maior parte dos trabalhos referentes ao estudo dos efeitos das qualidades espectrais sobre os parâmetros fotossintéticos avaliam somente as respostas em relação as alterações fenotípicas, promovidas por determinada condição espectral de crescimento da planta, mas não a efetiva participação das diferentes luzes de excitação na condução da fotossíntese (ARENA et al., 2016; EVANS; MORGAN; VON CAEMMERER, 2017; GILLMOR et al., 2002; KITAZAKI et al., 2018; YANG et al., 2018).

Neste trabalho, para uma investigação mais profunda e detalhada, na busca da real discriminação dos efeitos da qualidade espectral na condução dos processos fotossintéticos, foram realizadas análises comparativas, e um cruzamento de dados entre as repostas observadas em função das alterações fenotípicas, e as respostas em função das diferentes luzes de excitação, nas medições de trocas gasosas nas plantas. Através de viabilização técnica e implantação de uma metodologia multilateral, incluindo análises de crescimento, análises do perfil fotossintético das plantas substituindo as luzes de excitação nas medições das trocas gasosas, parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, parâmetros ópticos foliares *in vivo* e *in vitro* (pigmentos), técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, além da análise da composição bioquímica da membrana dos tilacoides, buscou-se a melhor compreensão sobre a participação e contribuição de diferentes bandas espectrais sobre os parâmetros fotossintéticos e de crescimento das plantas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Plantas de tabaco (*Nicotiana plumbaginifolia* L.) foram cultivadas no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal na Universidade Estadual de Maringá (UEM). As sementes foram dispostas em placa de *petri* e germinadas para obtenção das plântulas com 4 folhas desenvolvidas que foram selecionadas pela uniformidade, sanidade e vigor, sendo posteriormente transferidas para potes de 300 mL contendo substrato comercial Macplant[®]. As plantas foram então cultivadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro) à 25 °C em concentração de CO₂ ambiente (aproximadamente 400 ppm) e intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A intensidade de luz foi ajustada individualmente e aferida frequentemente com auxílio de sensor quantum (sensor PAR, Li-190R, LiCor, Nebraska, USA) 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 das plantas.

As plantas foram cultivadas sob LEDs de alta eficiência em faixa pancromática [branco; (400-700 nm)] e monocromática de banda estreita com diferentes qualidades de luz [azul (450 nm), verde (555 nm) e vermelha (658 nm)] (Fig. 1), em caixas individuais de MDF com revestimento branco de 30 x 30 x 30 cm de dimensões internas. Todas as plantas foram frequentemente irrigadas conforme necessidade e fertirrigadas com 50 mL de solução nutritiva de Hoagland completa (pH 5,3) a cada 2 dias, durante o período de crescimento e imposição dos tratamentos com os LEDs. A qualidade espectral dos LEDs foi monitorada com auxílio de um espectrorradiômetro (ASD Inc.; Fieldspec 3 Jr., Colorado, USA).

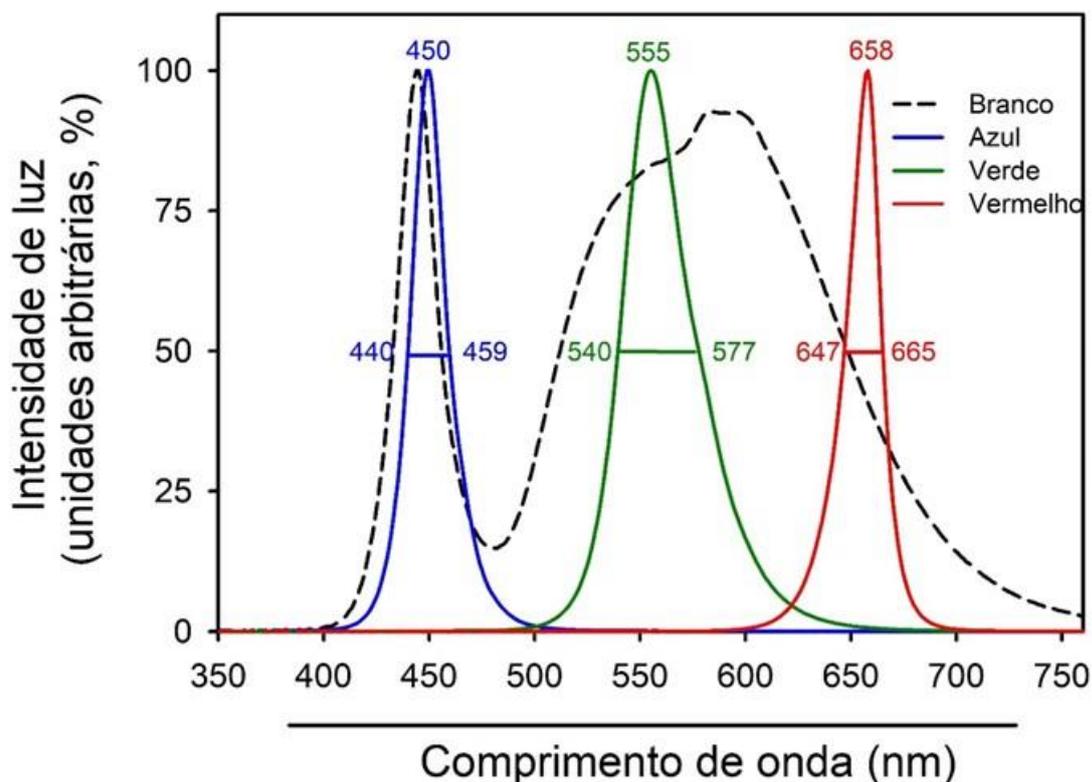


Figura 1 – Qualidade espectral dos LEDs utilizados no experimento com os seus respectivos picos da luz branca (400 - 750 nm), luz azul (450 nm), luz verde (555 nm) e luz vermelha (658 nm) e a dispersão sob metade da largura de banda em relação à altura do pico máximo, discriminados na região central, com um intervalo mínimo e máximo da faixa espectral correspondente a cada um dos LEDs monocromáticos. Os dados foram normalizados para 100% de intensidade nos respectivos picos de emissividade dos LEDs.

2.2.2 Análise de crescimento

Os parâmetros de crescimento foram avaliados durante a fase vegetativa das plantas. Foram coletadas 8 plantas por tratamento aos 20 dias após o início do crescimento nas diferentes qualidades de luz. Quantificou-se a matéria seca das raízes, caules, folhas e total das plantas pela soma das frações anteriores. Ainda, a área foliar foi obtida pelo escaneamento das folhas. Para obtenção da matéria seca as frações foram colocadas em estufa de circulação forçada, a temperatura de 70 °C por no mínimo 48 horas e as frações quantificadas em balança digital analítica. Os parâmetros e eficiência de crescimento [taxa de assimilação líquida (TAL) e taxa de crescimento relativo (TCR)] foram estimados segundo método descrito em FALCIONI et al., 2018; HOFFMANN; POORTER, 2002; SILVA et al., 2013.

2.2.3 Determinação dos teores de pigmentos foliares

Segmentos de 2 cm² do limbo, da quarta ou quinta folha totalmente expandida a partir do ápice caulinar foram utilizados para quantificação dos teores de clorofilas (Chl *a*, *b* e totais) e carotenoides (carotenos e xantofilas). 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% (v/v) saturada com CaCO₃. Para leitura do espectro de absorção (400 a 700 nm) dos pigmentos foliares extraídos (*in vitro*) utilizou-se espectrofotômetro (Shimadzu UV-2450 com software UV-Probe v.2.34, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). 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. Diluições foram realizadas quando necessário. As fórmulas para estimativa dos pigmentos são apresentadas abaixo:

$$Chl\ a = 12,25 \times Abs_{663} - 2,79 \times Abs_{647}$$

$$Chl\ b = 21,50 \times Abs_{647} - 5,10 \times Abs_{663}$$

$$Chl\ (a + b) = 7,15 \times Abs_{663} + 18,71 \times Abs_{647}$$

$$Car\ (carotenos + xantofilas) = \frac{1000 \times Abs_{470} - 1,82 \times Chl\ a - 85,02 \times Chl\ b}{198}$$

2.2.4 Determinação dos dados de reflectância, absorbância e transmitância da luz

Dados de reflectância (R) e transmitância (T) foram obtidos diretamente por meio do acoplamento de dois espectrorradiômetros (ASD Inc.; Fieldspec 3 Jr., Colorado, USA) calibrados e colimados imediatamente antes do uso com placa padrão Spectralon[®]. Aplicou-se um feixe de luz de aproximadamente 2.000 μmol m⁻² s⁻¹ em um dos sensores (aquele posicionado na face adaxial da folha) e então efetuado as leituras de 400 a 700 nm simultâneas, tanto de reflectância quanto de transmitância. Considerou-se então a absorbância (A) como sendo a fração calculada pela equação [A = 1 - (R + T)] (FALCIONI et al., 2017). Foram realizadas duas leituras por folha (uma de cada lateral do limbo da face adaxial) e considerou-se a média da folha como unidade experimental. Selecionou-se os pontos da curva espectral da luz visível referentes ao azul (450 nm),

verde (555 nm) e vermelho (658 nm) e o branco (considerado como a média de 400 a 700 nm) e da fonte de luz do equipamento Licor Li-6800 (90% em 625 nm e 10% em 475 nm; 90:10) e estimou-se os parâmetros de absorção das folhas (Abs), utilizando esses dados posteriormente para as devidas correções dos parâmetros fotossintéticos.

2.2.5 Análise dos parâmetros fotossintéticos e de fluorescência da clorofila *a*

Para as análises dos parâmetros fotossintéticos das plantas crescidas nas diferentes qualidades de luz foram selecionadas a 4^o ou 5^o folha, a partir do ápice para a base, e realizadas as medidas de trocas gasosas em um sistema de concentração de gases no infravermelho (IRGA; Li-6800, LiCor, Nebraska, USA; Gax Exchange System), acoplado com o módulo de fluorescência Multiphase Flash™ Fluorometer (Li-6800-01F, LiCor, Nebraska, USA). Parâmetros como taxa fotossintética líquida (*A*), condutância estomática (*g_s*), concentração intercelular de CO₂ (*C_i*) foram avaliados nas plantas estudadas. Foram realizadas curvas de resposta fotossintética à luz com imposição de diferentes intensidade luminosas [(0, 25, 50, 75, 100, 150, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 1800, 2000 e 2500 μmol m⁻² s⁻¹ de PAR; proporção de vermelho e azul (90:10)); tempo mínimo 60 e máximo de 120 segundos, para cada leitura e CO₂ na concentração de 400 μmol mol⁻¹ fixada na câmara de amostra (CO_{2_s})]. As curvas *A-C_i* (taxa fotossintética *versus* concentração interna de CO₂) foram realizadas com as seguintes concentrações [(400, 300, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 1800, 2000 μmol mol⁻¹ de CO₂ fixados na câmara de referência (CO_{2_r}); luz fixada em 2000 μmol m⁻² s⁻¹ PAR; tempo mínimo de 50 e máximo 90 segundos, para cada leitura]. Ressalta-se que as medições das curvas de luz foram realizadas simultaneamente com as medições da fluorescência da clorofila *a* usando o módulo de fluorescência Multiphase Flash™ Fluorometer (Li-6800-01F, LiCor, Nebraska, USA). As demais condições de medições foram realizadas com uma câmara foliar de 6 cm², taxa de fluxo de 600 μmol s⁻¹, umidade relativa na amostra (RH_s) de 60%, Fan speed (10.000 rpm) e temperatura da folha na câmara de amostra em 25 °C, para cada uma das medidas.

A partir dos dados obtido da curva de resposta a luz foram estimados a respiração (Rd), e saturação (PS) de luz, rendimento quântico da fotossíntese (α) utilizando-se de modelos matemáticos obtidos na análise de regressão dos dados:

$$y = ax + b$$

onde:

y = taxa fotossintética líquida;

a = coeficiente angular ou inclinação da reta (rendimento quântico da fotossíntese);

x = níveis de luz (limitado de zero a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR);

b = constante do modelo (respiração no escuro).

O ponto de saturação fotossintético foi estimado pelo modelo hiperbólico:

$$y = y_0 + \frac{ax}{(b + x)}$$

Onde:

y = taxa fotossintética líquida;

y₀ = constante do modelo;

a e b = parâmetros do modelo;

x = níveis de luz.

Calculou-se o limite de y para x tendendo ao infinito $\left[\lim_{x \rightarrow \infty} y \right]$, em seguida, calculou-se 90% desse valor, e então estimou a irradiância correspondente àquela taxa fotossintética. Graficamente (e empiricamente) esses valores foram individualmente verificados e testados correspondendo ao ponto intuitivo de saturação da fotossíntese para cada uma das curvas.

Para obtenção dos parâmetros fotossintéticos com base na luz absorvida procedeu-se a correção das curvas de respostas a luz, corrigindo cada uma das intensidades (25, 50, 75, 100, 150, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 1800, 2000 e $2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR) pelos respectivos parâmetros de absorção da folha, obtidos conforme descrito no tópico acima. Após a obtenção das curvas de luz corrigidas pela absorção foram estimados os parâmetros α_{abs} (rendimento quântico da fotossíntese sob luz efetivamente absorvida) e PS_{abs} (ponto de saturação sob luz efetivamente absorvida) utilizando os modelos matemáticos também descrito acima.

A estimativa dos parâmetros de velocidade máxima de carboxilação da RuBisCO (V_{cmax}), foram calculados com o script “PCE_Calculator Curve_Fitting_Model 2.0” desenvolvido para plantas de tabaco e disponibilizado na “Plant Cell & Environment 2016” (Sharkey, 2016). As constantes utilizadas foram temperatura da folha a 25 °C, P_{atm} 101 kPa e O_2 21 kPa (Sharkey, 2016).

A fluorescência da clorofila *a* foi determinada aplicando um pulso de luz saturante de 15.000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com duração de 1 segundo e *output rate* de 500 Hz em plantas aclimatadas no escuro (overnight) e durante as medições com luz actínica (curvas de luz). Os dados de fluorescência foram utilizados para calcular a eficiência máxima do PSII (rendimento quântico potencial; F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do PSII (F_v'/F_m'), eficiência operacional dos centros de reação do PSII (Φ_{PSII}), quenching não fotoquímico (NPQ), fração do quenching não fotoquímico (qN), fração do quenching fotoquímico (qP), conforme equações, calculados de acordo com Baker, 2008:

$$\left[\Phi_{PSII} = \frac{(Fm' - Fs)}{(Fm')} \right];$$

$$\left[NPQ = \frac{(Fm - Fm')}{(Fm')} \right];$$

$$\left[qN = \frac{(Fm - Fm')}{(Fm)} \right];$$

$$\left[qP = \frac{(Fm' - Fs)}{(Fm' - Fo')} \right];$$

Onde:

fluorescência mínima (F_o), fluorescência máxima (F_m), fluorescência no estado estacionário (F_s), fluorescência variável ($F_v = F_m - F_o$). Os dados referentes a medições obtidas na planta aclimatada na presença de luz foram acrescido com “'”.

2.2.6 Medições com a câmara de topo transparente

As curvas de resposta a luz, curvas A/C_i e as estimativas dos parâmetros fotossintéticos em função das diferentes qualidades espectrais foram obtidos de modo semelhante ao descrito no tópico acima substituindo a fonte de luz disponível no módulo de fluorescência Multiphase Flash™ Fluorometer (Li-6800-01F, LiCor, Nebraska, USA) pelo módulo 3x3 cm Câmara de Topo Transparente (Li-6800-12, LiCor, Nebraska, USA) no qual utilizou-se como fonte de luz os LEDs utilizados no crescimento das plantas. Avaliou-se as trocas gasosas nas plantas crescidas nos seus respectivos LEDs e em

seguida nos demais LEDs formando uma combinação fatorial 4x4 relativo à condição de crescimento vs fonte de luz de excitação (qualidade dos LEDs).

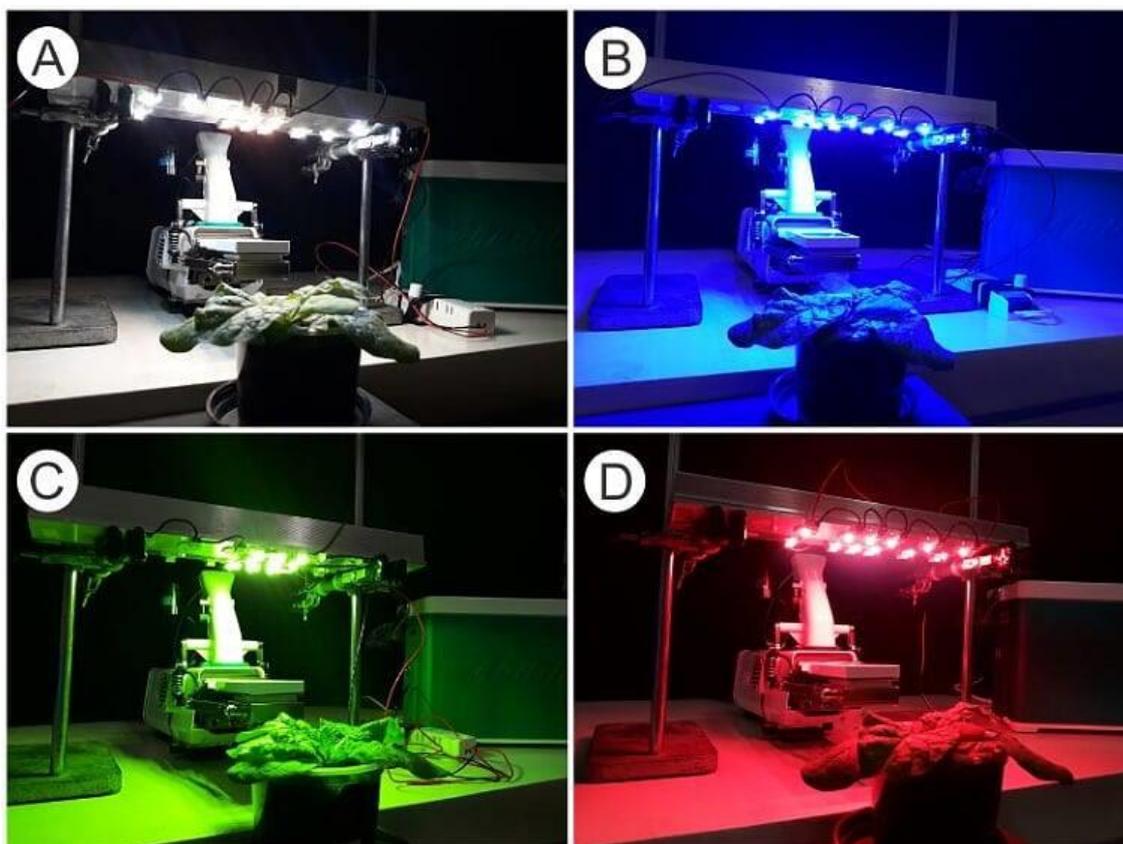


Figura 2 – Imagem representativa da análise de trocas gasosas obtida com os LEDs de diferentes qualidades espectrais. (A) luz branca (400 - 750 nm), (B) luz azul (450 nm), (C) luz verde (555 nm) e, (D) luz vermelha (658 nm).

2.2.7 Microscopia eletrônica de transmissão

Foram coletadas secções transversais de limbo de aproximadamente 2 mm² da última folha totalmente expandida a partir do ápice caulinar e fixadas em solução Karnovsky modificada contendo glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,05 M (KARNOVSKY, 1965) e armazenadas a 4 °C para procedimentos posteriores. As amostras foram lavadas em tampão cacodilato (0,05 M) e 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 de séries com concentrações crescente de acetona [30, 50, 70, 90 e 100% (3x)], e posterior infiltração e inclusão em resina *Spurr low viscosity* (Sigma Aldrich Inc.). As amostras foram transferidas para moldes específicos para polimerização da resina, em estufa de

temperatura controlada (65 °C - 70 °C) por 72 horas. Foram realizados cortes semi-finos (1500 nm de espessura) e ultrafinos (70 nm de espessura) em ultramicrotomo (MTX Powertome X, Boeckeler Instruments RCM Products, Egham, UK) 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 em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-1400, Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, Illinois, 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 específicos para grau microscopia eletrônica de alto padrão Sigma Aldrich (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA) ou EMS (Electron Microscopy Science, Industry Road Hatfield, Pensilvânia, USA).

2.2.8 Identificação dos polipeptídeos das membranas dos tilacoides por SDS-PAGE

Foram isolados cloroplastos usando o método da Tricina. Para isso 4 g de folhas frescas foram trituradas em grau e pistilo com um tampão de isolamento gelado (300 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM Tricine/NaOH, pH 7,5). Após triturados, o homogenato foi filtrado e a solução centrifugada a 300 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo e novamente centrifugado a 3000 xg por 10 minutos. O *pelet* resultante foi suspenso em tampão de isolamento e novamente procedeu-se a centrifugação em 3000 xg. Após a centrifugação, descartou o sobrenadante e o *pelet* foi novamente resuspenso em um tampão *low-salt* (2 mM MgCl₂, 5 mM Tricine/NaOH, pH 7,5) para remover cloroplastos e outras membranas e então novamente procedeu-se centrifugação em 6000 xg por 10 minutos. Descartou o sobrenadante e o *pelet* resultante foi resuspenso, armazenado no tampão de isolamento e definido como membrana de tilacoides conforme Miller e Cushman, 1979 e Miller, 1980. Realizou a quantificação dos teores de proteínas pelo método da razão 260/280 nm e colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras foram submetidas à análises por eletroforese de gel de SDS-poliacrilamida de acordo com Laemmli, 1970. Foram padronizados a mesma quantidade de proteínas para a corrida no SDS-PAGE. Um gel de 8,5 cm contendo um gradiente superior de 6 e inferior de 12% de acrilamida foram usados para separação dos constituintes dos fotossistemas extraídos, sob corrente constante de 20 mA a 25 °C durante 4 horas. Os polipeptídios foram visualizados por meio de coloração com Coomassie Blue G-250 *overnight*, seguido por sucessivas lavagens em ácido acético 7% para remoção do excesso de corante e a

imagem fotodocumentada em um Transluminador UV-A (254 nm, L-PIX HE, Loccus Biotechnology São Paulo, Brazil). As bandas foram comparadas e analisadas segundo um padrão com peso molecular (Precision Plus Protein – Dual Xtra Prestained Biorad) e os dados obtidos analisados com banco de dados disponível (RCSB – Protein Data Base). Para isso usou a rotina “Gels” disponível no Software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij>). Para confirmação dos pesos moleculares e análises do peptídeos, as amostras foram analisadas qualitativamente por espectrometria de massas conforme (VILLÉN; GYGI, 2008) e adaptado pelo Laboratório Nacional de Biociências – LNBio (<https://lnbio.cnpem.br/facilities/mass-spectrometry/sample-preparation/>). Utilizou-se um UHPLC M-Class Waters nanoLC acoplado a um espectrômetro de massas Waters Xexo G2-si (Q-TOF), utilizando modo de aquisição MSe. Após análise, os arquivos RAW foram processados utilizando ProteinLynx Global Server versão 3.0.3 (Waters) com banco de dados para proteínas de *N. tabacum* (L.) do Uniprot, considerando um *High.Protein.Score*, definida automaticamente pelo software (VILLÉN; GYGI, 2008).

2.2.9 Análises estatísticas

Os dados obtidos dos respectivos tratamentos foram submetidos à análise estatística ANOVA *One-Way* para média e erro padrão da média ($p \leq 0,05$). Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em comparações múltiplas entre os efeitos da qualidade de luz analisados utilizando testes estatísticos de Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*). Os dados dos parâmetros fotossintéticos foram submetidos à análise de regressão. Análises das plantas crescidas nos respectivos LEDs (branco, azul, verde e vermelho) assim como as avaliações fotossintéticas nos diferentes LEDs foram submetidos a análise de variância em comparação dentro (plantas crescidas nos LEDs) e entre (crescimento de plantas nos LEDs e taxas fotossintéticas com medições em todos os LEDs). Os dados para análises estatísticas foram analisados com os softwares Statistica 10.0 (Statsoft Inc., California, USA) e Sisvar v.5.6 (Brasil). Com os dados obtidos foram elaborados os gráficos com auxílio do software Sigma Plot 10.0 (Systat Inc., California, USA).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Análise de crescimento, teores de pigmentos foliares e parâmetros espectrais das folhas

Nas plantas crescidas sob luz verde (GL) ocorreu redução do acúmulo de biomassa [19%, 29% e 16%, em relação as plantas crescidas no branco (WL), no azul (BL) e vermelho (RL), respectivamente], mas não houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as plantas WL, BL e RL (Fig. 3 e Fig. 4). Os resultados das curvas espectrais demonstraram que ocorreu absorção de uma porção substancial da luz verde nas folhas, diferentemente do que ocorreu nos pigmentos extraídos em solução (*in vitro*; Fig. 5). No entanto, observou-se menor absorção do verde, em comparação as faixas espectrais do azul e vermelho em todos tratamentos. Quando comparados a absorção das folhas em suas respectivas condições de crescimento, observou-se que os índices de absorbância médio das folhas foram de 81% da faixa espectral do branco na planta WL, 88% de absorção do azul na planta BL, 60% de absorção do verde na planta GL e 88 % na faixa do vermelho na planta RL (Tabela 1), o que representou incremento de absorção de luz de aproximadamente 46% do azul e vermelho, e 34% da luz branca, em relação a absorção do verde disponível para o crescimento das plantas. Analisando as curvas de absorção das folhas, observou-se que nas plantas BL ocorreu redução da absorbância em todo o espectro da curva (Fig. 5), associado a menores conteúdos de pigmentos fotossintéticos por unidade de área e massa nessas plantas (Fig. 6).



Figura 3 – Imagem representativa de plantas de *Nicotiana plumbaginifolia* L. (tabaco) cultivados em diferentes qualidades de luz no 15º dia após imposição dos tratamentos. Da esquerda para a direita, plantas crescidas em luz branca, azul, verde e vermelha, respectivamente.

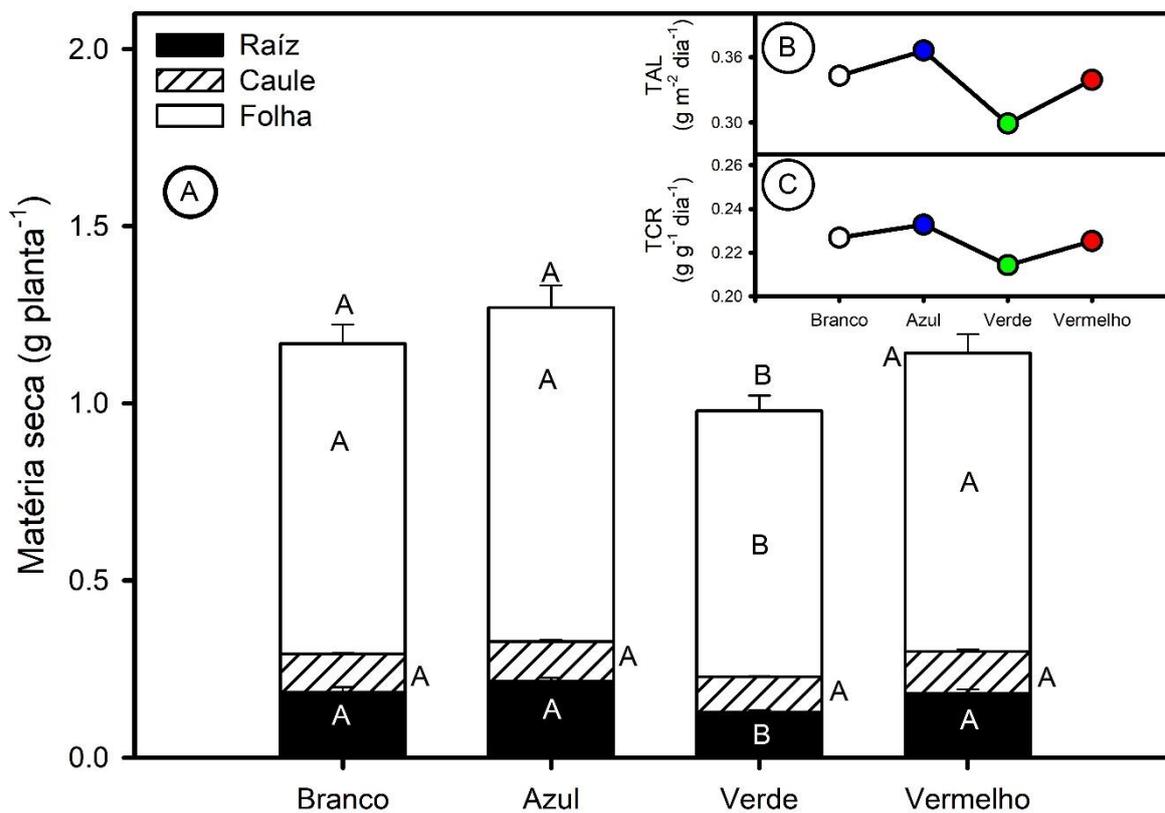


Figura 4 – (A) Parâmetros de crescimento da matéria seca das raízes, caules e folhas e total de plantas de tabaco cultivadas em diferentes qualidades de luz (branca, azul, verde e vermelho, respectivamente), (B) taxa assimilatória líquida (TAL) e (C) taxa de crescimento relativo (TCR) em plantas de tabaco submetidos ao crescimento em diferentes qualidades de luz ao 15º dia após imposição dos tratamentos. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas representam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). $n=8 \pm SE$.

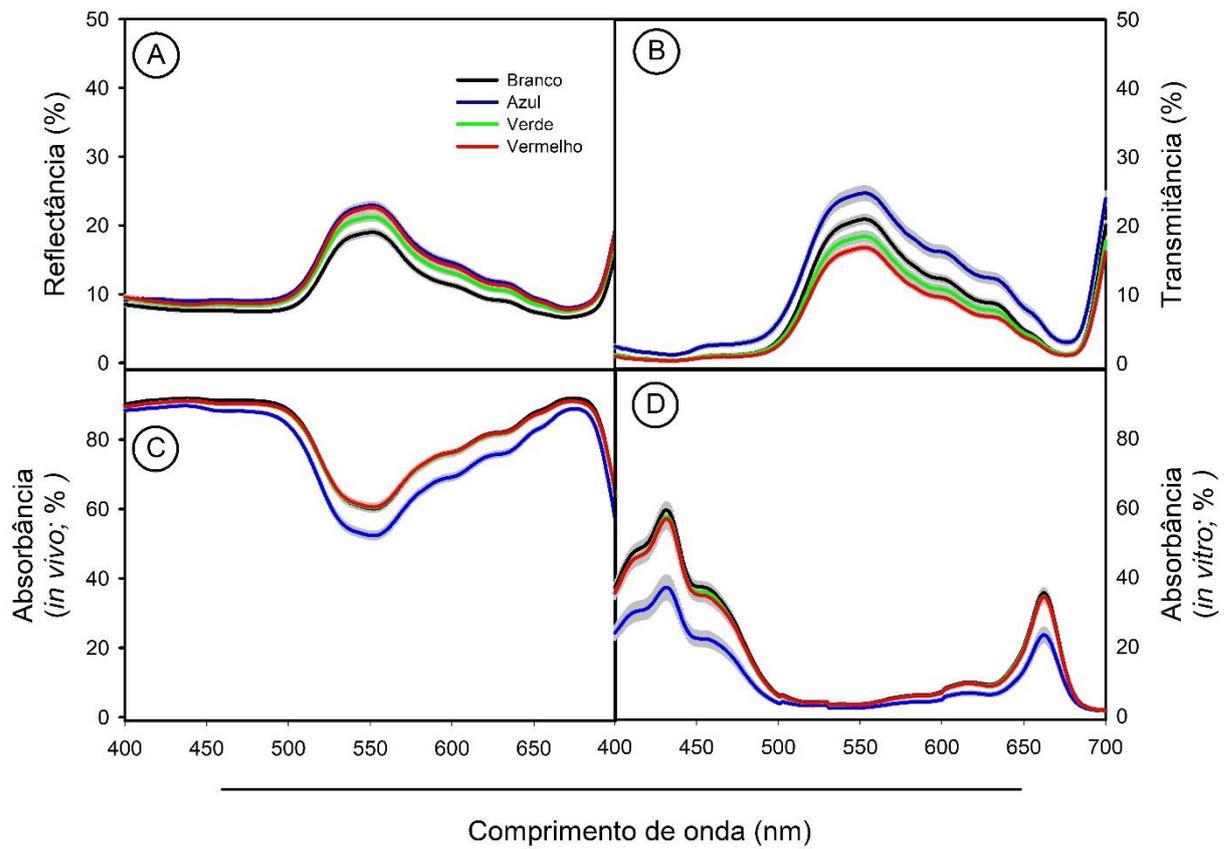


Figura 5 – Curvas espectrais (A) refletância, (B) transmitância, e (C) absorvância foliar (*in vivo*); (D) pigmentos fotossintéticos totais (*in vitro*, solução de acetona 80%; v/v) de plantas de tabaco cultivadas em diferentes qualidades de luz. O erro padrão é mostrado em cinza. $n=8 \pm SE$.

Tabela 1 – Absorbância da folha nos comprimentos de onda do azul (450 nm), verde (555 nm), vermelho (658 nm), espectro do visível (400-700 nm) e proporção vermelho (625 nm) e azul (475 nm) (90:10) da fonte de luz do equipamento Li-6800, em plantas de tabaco submetidas ao crescimento em diferentes qualidades de luz. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna representam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). $n=8 \pm SE$

Planta	450 nm	555 nm	658 nm	Média (400-700 nm)	90:10 - Vermelho:Azul
Branco	91.48 ± 0.175 A	60.24 ± 0.525 A	89.23 ± 0.190 A	81.93 ± 0.298 A	82.82 ± 0.321 A
Azul	88.80 ± 0.166 C	52.54 ± 1.058 B	84.52 ± 0.475 B	76.79 ± 0.576 B	76.81 ± 0.697 B
Verde	90.68 ± 0.258 B	60.57 ± 1.082 A	88.41 ± 0.348 A	81.39 ± 0.543 A	82.31 ± 0.558 A
Vermelho	90.66 ± 0.216 B	60.78 ± 0.738 A	88.43 ± 0.281 A	81.53 ± 0.223 A	82.52 ± 0.455 A

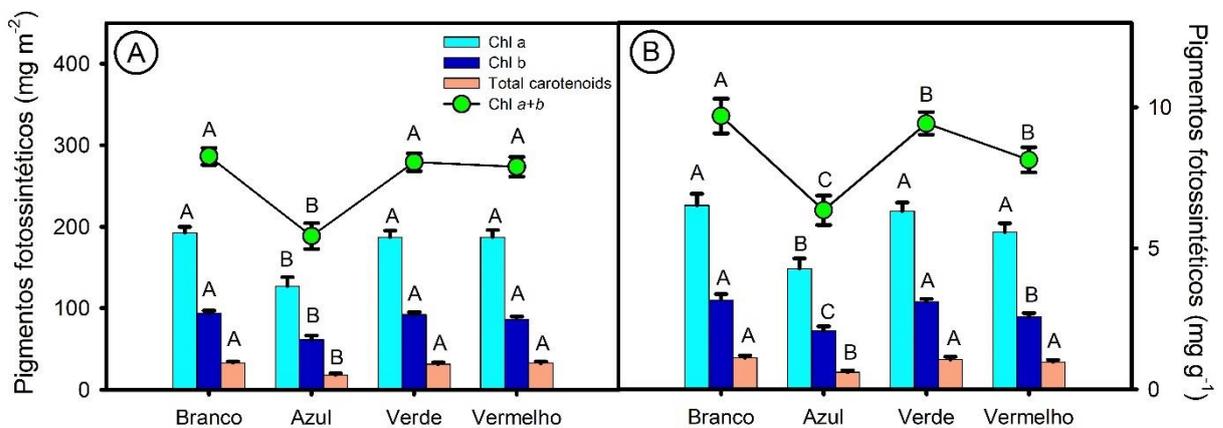


Figura 6 – Pigmentos foliares: clorofila *a*, *b*, totais (*a+b*) e carotenoides (carotenos e xantofilas) expressos por unidade de (A) área e massa (B) em plantas de tabaco submetidas ao crescimento em diferentes qualidades de luz. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas representam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). $n=8 \pm SE$.

2.3.2 Parâmetros fotossintéticos e de fluorescência da clorofila

Os parâmetros fotossintéticos mensurados nas condições de cultivo das plantas (utilizando como fonte de luz os LEDs das respectivas condições de crescimento, com $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância e 400 ppm de CO_2), mostraram um incremento na taxa de assimilação líquida (A_{100}) de 52%, 35% e 82% nas plantas WL, BL e RL, respectivamente, em comparação as plantas GL (Tabela 2). As taxas de assimilação líquida máxima (A_{max}) também mensuradas com os referidos LEDs das condições de crescimento das plantas foram de $15,19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas plantas WL medido com fonte de luz o LED branco (WM), $14,28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas plantas BL medido com LED azul (BM), $16,23 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas plantas GL medido com o LED verde (GM) e $14,82 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas plantas RL medido com o LED vermelho (RM), apresentando diferença significativa ($p \leq 0,05$) apenas entre as plantas GL e BL (incremento de aproximadamente 13% em GL em relação a BL). Os dados estimados do rendimento quântico sob luz incidente (α) mostraram um incremento de 51%, 38% e 79% nas plantas WL, BL e RL em relação as plantas GL (Tabela 2). Ao corrigir os dados de α pelas respectivas absorbâncias das folhas (α_{abs}) este parâmetro apresentou redução nas plantas GL somente em relação ao α_{abs} estimado nas plantas RL (aproximadamente 25%), não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) das plantas WL e BL (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros fotossintéticos obtidos, e estimados a partir das curvas de resposta a luz das plantas crescidas sob as diferentes qualidades espectrais, As análises foram medidas com a câmara de topo transparente do equipamento Li-6800 sob as mesmas condições de cultivo (fonte de excitação: LED disponível na respectiva condição de crescimento; 100 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 400 ppm de CO_2). α - rendimento quântico da fotossíntese [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})/(\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1})$]; α_{abs} - rendimento quântico da fotossíntese corrigido pela absorvância [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})/(\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1})$]; A_{max} - taxa fotossintética líquida máxima e; A_{100} - taxa fotossintética líquida medida em 100 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna representam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). $n=5 \pm \text{SE}$

Planta	α	α_{abs}	A_{100}	A_{max}
BRANCO	0.0424 \pm 0.0013 b	0.0519 \pm 0.0015 ab	4.09 \pm 0.09 b	15.19 \pm 0.37 ab
AZUL	0.0388 \pm 0.0014 b	0.0448 \pm 0.0015 b	3.63 \pm 0.20 b	14.28 \pm 0.32 b
VERDE	0.0280 \pm 0.0013 c	0.0453 \pm 0.0012 b	2.69 \pm 0.08 c	16.23 \pm 0.37 a
VERMELHO	0.0502 \pm 0.0030 a	0.0570 \pm 0.0033 a	4.89 \pm 0.27 a	14.82 \pm 0.46 ab

Os parâmetros fotossintéticos obtidos utilizando a fonte de luz padrão disponível do módulo Multiphase Fluorometer acoplado ao equipamento Li-6800 (90:10) revelaram que não há diferenças significativas nas taxas de respiração no escuro (R_d) nas plantas crescidas nas diferentes qualidades espectrais ($p > 0,05$) (Tabela 3). Além disso, as plantas GL apresentaram redução no α_{abs} em relação as plantas WL e BL, mas não diferiram estatisticamente do α_{abs} estimado na planta RL, enquanto o A_{max} não diferiu estatisticamente entre as plantas ($p > 0,05$) (Tabela 3). Nesse tipo de análise, evidencia-se apenas as diferenças entre as plantas crescidas sob as diferentes qualidades espectrais, uma vez que a fonte de luz na medição das trocas gasosas é a mesma para todas as plantas.

Tabela 3 – Parâmetros fotossintéticos estimados a partir das curvas de luz obtidas com a fonte de luz padrão da câmara Multiphase Fluorometer do equipamento Li-6800, e concentração de 400 ppm de CO_2 . R_d - taxa de respiração no escuro; A_{max} - taxa fotossintética líquida máxima; α - rendimento quântico da fotossíntese [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})/(\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1})$]; e α_{abs} - rendimento quântico da fotossíntese corrigido pela absorvância [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})/(\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1})$], de plantas de tabaco submetidas ao crescimento em diferentes qualidades de luz. Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna representam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). $n=5 \pm \text{SE}$

Planta	R_d	A_{max}	α	α_{abs}
BRANCO	-1.00 \pm 0.04 a	16.36 \pm 0.78 a	0.0518 \pm 0.0019 a	0.0627 \pm 0.0022 a
AZUL	-1.09 \pm 0.12 a	14.64 \pm 0.56 a	0.0473 \pm 0.0036 ab	0.0613 \pm 0.0043 a
VERDE	-0.98 \pm 0.05 a	15.50 \pm 0.30 a	0.0399 \pm 0.0028 b	0.0484 \pm 0.0030 b
VERMELHO	-1.14 \pm 0.04 a	14.59 \pm 0.39 a	0.0485 \pm 0.0011 ab	0.0592 \pm 0.0015 ab

Através dos dados de fluorescência da clorofila medidos na planta aclimatada no escuro, observou-se menor rendimento quântico potencial do PSII em reduzir o pool de quinonas (F_v/F_m) nas plantas GL (Fig. 7A; *inset*). Os dados de fluorescência da clorofila a , obtidos em conjunto com as curvas de respostas fotossintética à luz, evidenciaram que a eficiência fotoquímica efetiva do PSII quando os centros de reação encontravam-se abertos (Q_a oxidada), (F_v'/F_m') e a eficiência operacional dos centros de reação do PSII (ϕ PSII) apresentaram valores elevados quando expostos a um feixe de luz de baixa irradiância e reduziram gradativamente com o aumento da intensidade da luz para todos os tratamentos (Fig. 7A). Observou-se que os valores de F_v'/F_m' foram menores nas plantas GL em relação as demais plantas, sendo observadas as diferenças mais expressivas quando comparadas com as plantas BL. Por outro lado, os valores de ϕ PSII não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as plantas quando medido sob alto PPDF (Fig. 7A e 7B). Adicionalmente, as plantas BL exibiram maior dissipação de energia não fotoquímica (NPQ) e maior fração de fluorescência variável dissipada pelos processos não fotoquímicos (q_N) sob alta irradiância, em relação aos demais tratamentos (Fig. 7C e 7D). No entanto, a fração da fluorescência variável dissipada pelos processos fotoquímicos (q_P) foram maiores nas plantas GL (Fig. 7D).

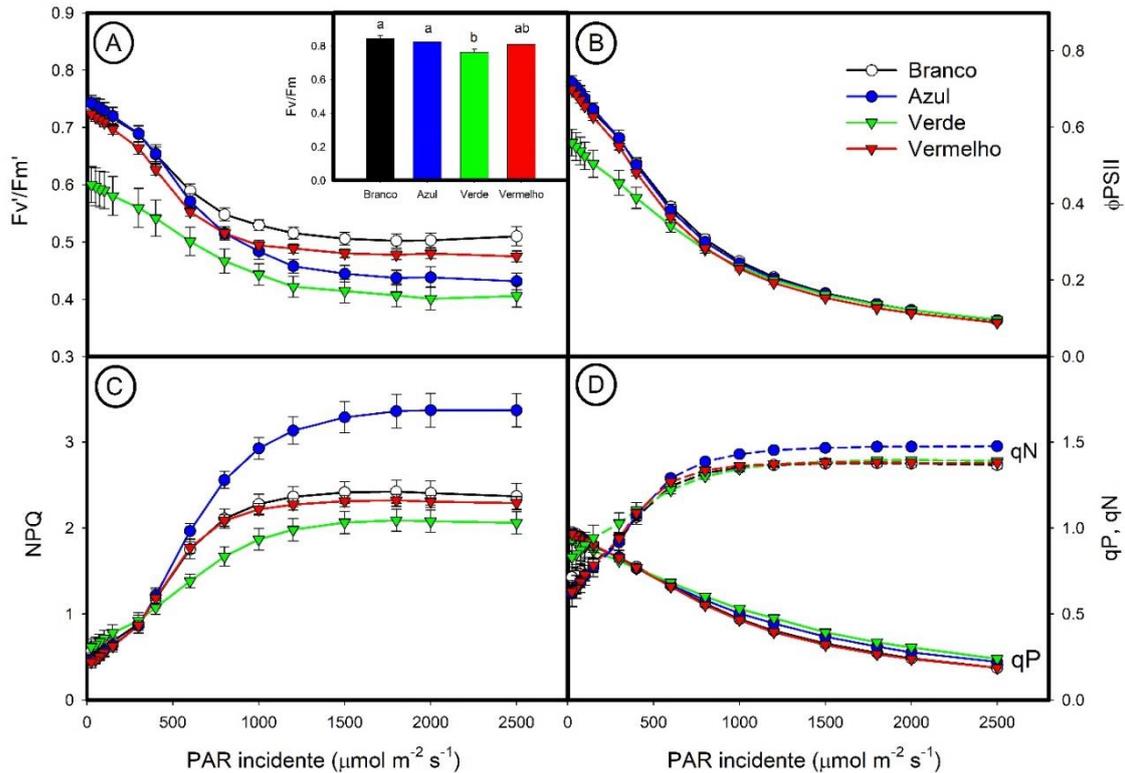


Figura 7 – Curvas de fluorescência obtidos em conjunto com as curvas de luz (A) Rendimento quântico efetivo do PSII, (B) eficiência operacional do fotossistema II, (C) quenching não fotoquímico e, (D) relação entre o quenching de dissipação não-fotoquímico (qN) e o dissipação fotoquímico (qP) em plantas de tabaco submetidas ao crescimento em diferentes qualidades de luz. *Inset* com o gráfico de barras indica o rendimento quântico potencial do PSII. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas representam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). $n=5 \pm SE$.

Ao comparar os parâmetros fotossintéticos obtidos nas plantas crescidas em diferentes qualidades de luz medidos com o mesmo LEDs (Tabela 4; entre os quadrantes), os resultados demonstraram que sob baixa irradiância (porção linear da curva de resposta fotossintética a luz; Fig. 8 e 9), independentemente da luz de excitação, as plantas GL apresentaram menores taxas de assimilação líquida (A_{100}) em relação as demais plantas. No entanto, em alta disponibilidade de PPDF esse quadro foi revertido e as plantas GL tenderam a maximizar o A_{max} sendo as diferenças mais expressivas observadas em comparação as plantas BL (Tabela 4; entre os quadrantes). Nas plantas GL, o ponto de saturação luminoso corrigido pela absorção (PS_{abs}) apresentaram um incremento expressivo, especialmente em relação as plantas BL, independentemente das luzes de excitação das medições. Por outro lado, ocorreu a redução desse parâmetro nas plantas BL, também independentemente da fonte de luz utilizada nas medições (comparação

entre os quadrantes). Adicionalmente, foram encontrados altos valores de C_i e próximos entre todos os tratamentos (315 a 348 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tabela 5). Ainda, o g_s não diferiu entre as plantas quando medidas em GM. No entanto, quando medido em BM observou-se redução dos valores nas plantas GL e RL, mas não nas plantas BL. Além disso, o $V_{c_{\max}}$ tendeu a ser maior nas plantas BL em relação as plantas GL (comparação entre os quadrantes, Tabela 5).

Para comparar os efeitos dos diferentes LEDs sobre os parâmetros fotossintéticos, as análises foram realizadas substituindo a fonte de luz na medição das trocas gasosas por WM, BM, GM e RM, e avaliados na mesma planta (WL, BL, GL e RL) (comparação dentro do quadrante; Tabela 4). Quando medidos com GM os valores de α tenderam a ser menores quando comparados com as outras fontes de luz de excitação nas plantas WL, BL e RL, mas não nas plantas GL, em que as fontes GM e BM não diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) (Tabela 4; dentro do quadrante). Salienta-se que nesse caso, houve expressiva diferença na absorção da luz verde (GM) em relação aos outros LEDs devido à baixa absorção foliar nessa faixa espectral (Fig. 5 e Tabela 1). Por outro lado, observou-se incremento de α quando os valores foram corrigidos pela efetiva absorção foliar (α_{abs}) em relação ao α . Até mesmo, quando medidos com GM tenderam a igualar-se as fontes WM e RM dependendo da condição de cultivo da planta (por exemplo: plantas WL e GL). Mesmo com a absorção reduzida, sob a fonte GM foram encontrados altos valores de A_{max} em todas as condições de cultivo e similares aqueles medidos sob as fontes WM, BM e RM (comparação dentro do quadrante; Tabela 4). Ademais, observou-se que sob a fonte de luz BM ocorreu aumento expressivo do PS_{abs} em relação aos demais LEDs (comparação dentro do quadrante, Tabela 4 e Fig. 9).

Tabela 4 – Parâmetros fotossintéticos obtidos e estimados a partir das curvas de luz das plantas de tabaco submetidas ao crescimento em diferentes qualidades de luz, medidas com a câmara de topo transparente, utilizando como fonte de excitação os mesmos LEDs disponíveis no crescimento das plantas e contração de 400 ppm de CO₂. PS - ponto de saturação ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$); PS_{abs} - ponto de saturação corrigido pela absorv\u00eancia ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$); A_{max} - taxa fotossint\u00e9tica l\u00edquida m\u00e1xima [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1})$] ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$); α - rendimento qu\u00e2ntico da fotoss\u00edntese [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1})$] ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e; α_{abs} - rendimento qu\u00e2ntico da fotoss\u00edntese corrigido pela absorv\u00eancia [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1})$] ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). M\u00e9dias seguidas de letras mai\u00fasculas comparam os efeitos do LED na mesma planta (dentro do quadrante) e m\u00e9dias seguidas por letras min\u00fasculas comparam os efeitos de cultivo das diferentes plantas sob o mesmo LEDs (entre os quadrantes) pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) sob an\u00e1lise da ANOVA fatorial. n=5 \pm SE

Planta	LED	PS	PS _{abs}	A _{max}	α	α_{abs}
BRANCO	Branco	595 \pm 22 B C b	487 \pm 19 B b c	15.19 \pm 0.37 A B ab	0.0424 \pm 0.0013 A a	0.0519 \pm 0.0015 A a
	Azul	975 \pm 93 A b	943 \pm 92 A b c	13.87 \pm 0.11 B a	0.0355 \pm 0.0012 C b	0.0390 \pm 0.0013 B ab
	Verde	820 \pm 67 B b	491 \pm 39 B c	14.20 \pm 0.58 A B bc	0.0310 \pm 0.0009 D a	0.0518 \pm 0.0008 A b
	Vermelho	509 \pm 47 C b	453 \pm 41 B b	15.55 \pm 0.50 A a	0.0495 \pm 0.0035 A a	0.0555 \pm 0.0038 A b
AZUL	Branco	590 \pm 57 B b	454 \pm 43 B c	14.18 \pm 0.81 A ab	0.0386 \pm 0.0010 B a	0.0501 \pm 0.0016 C a
	Azul	895 \pm 109 A b	796 \pm 97 A c	14.28 \pm 0.32 A a	0.0388 \pm 0.0014 B a	0.0448 \pm 0.0015 C a
	Verde	910 \pm 83 A b	437 \pm 32 B c	13.52 \pm 0.50 A c	0.0292 \pm 0.0009 C a	0.0537 \pm 0.0016 B a
	Vermelho	358 \pm 23 C b	301 \pm 19 C c	14.69 \pm 0.36 A a	0.0547 \pm 0.0019 A a	0.0647 \pm 0.0023 A a
VERDE	Branco	954 \pm 58 B a	743 \pm 24 C a	15.91 \pm 0.75 A a	0.0391 \pm 0.0015 A a	0.0477 \pm 0.0016 A ab
	Azul	1607 \pm 36 A a	1462 \pm 36 A a	13.86 \pm 0.69 B a	0.0301 \pm 0.0014 B c	0.0330 \pm 0.0015 B b
	Verde	1211 \pm 66 B a	748 \pm 44 C a	16.23 \pm 0.37 A a	0.0280 \pm 0.0013 B a	0.0453 \pm 0.0012 A c
	Vermelho	1017 \pm 120 B a	903 \pm 104 B a	14.59 \pm 0.41 B a	0.0415 \pm 0.0023 A b	0.0471 \pm 0.0026 A c
VERMELHO	Branco	635 \pm 23 B b	516 \pm 19 C b	14.14 \pm 0.50 A B b	0.0377 \pm 0.0011 B a	0.0465 \pm 0.0014 B b
	Azul	1122 \pm 152 A b	1009 \pm 107 A b	13.30 \pm 0.93 B a	0.0342 \pm 0.0024 B b	0.0378 \pm 0.0027 C ab
	Verde	926 \pm 43 A b	581 \pm 23 B b	15.00 \pm 0.45 A b	0.0285 \pm 0.0016 C a	0.0475 \pm 0.0027 B c
	Vermelho	521 \pm 90 B b	426 \pm 47 D b	14.82 \pm 0.46 A B a	0.0502 \pm 0.0030 A a	0.0570 \pm 0.0033 A b

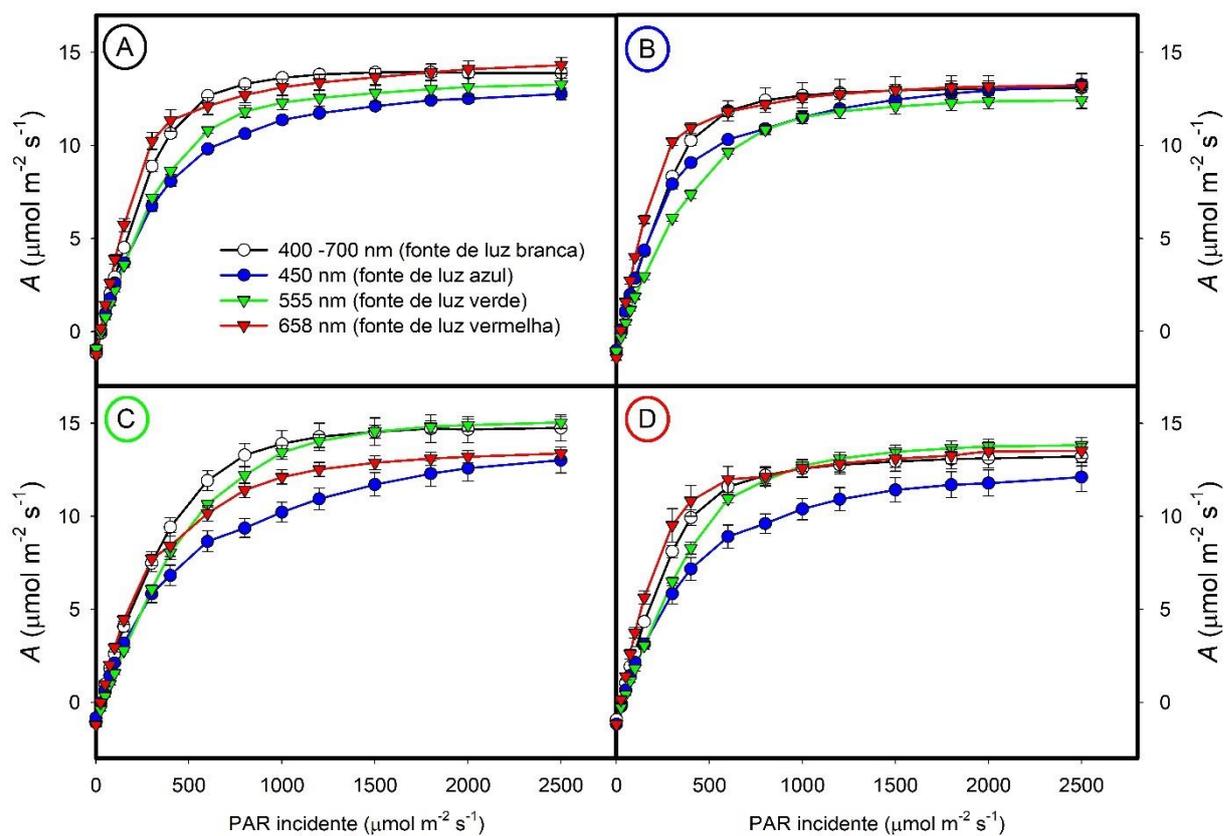


Figura 8 – Curvas de resposta fotossintética à luz das plantas de tabaco submetidas ao crescimento em diferentes qualidades de luz, e medidas com a câmara de topo transparente, utilizando como fonte de excitação os mesmos LEDs disponíveis no crescimento das plantas e contração de 400 ppm de CO₂. (A) Medições nas plantas crescidas sob luz branca, (B) plantas crescidas sob luz azul (C) plantas crescidas sob luz verde e (D) plantas crescidas sob luz vermelha. n=5±SE.

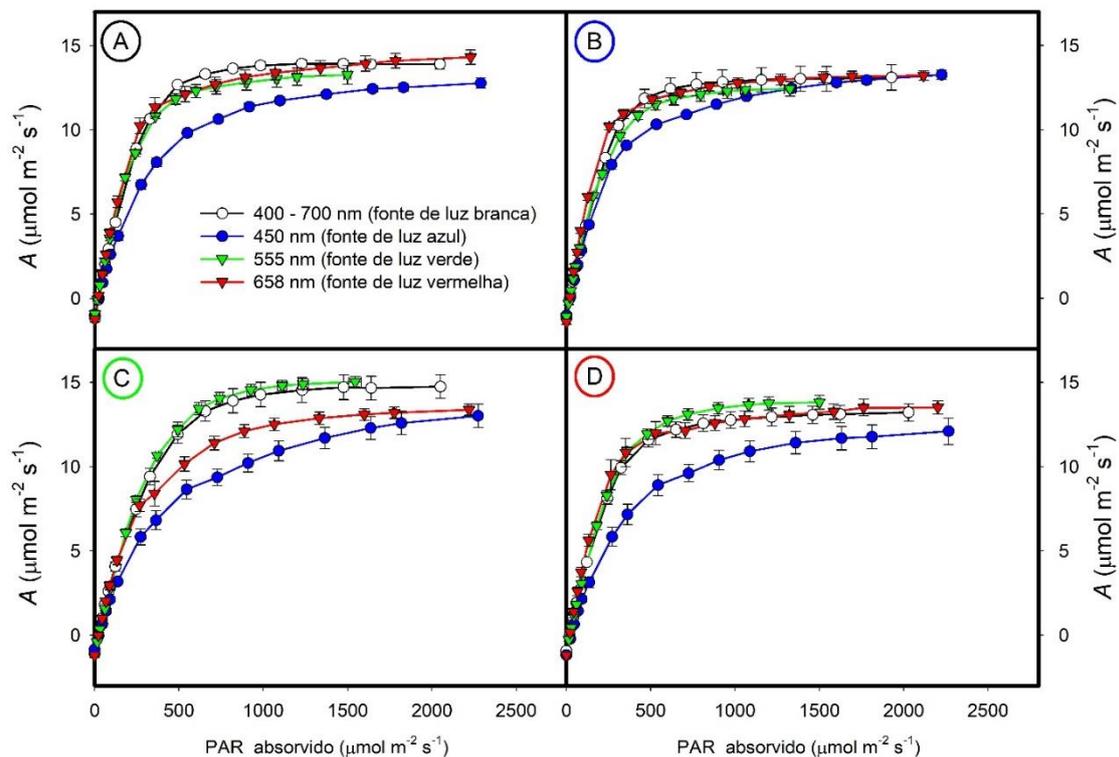


Figura 9 – Curvas de resposta fotossintética à luz corrigida pela absorção foliar das plantas de tabaco, submetidas ao crescimento em diferentes qualidades de luz, e medidas com câmara de topo transparente, utilizando como fonte de excitação os mesmos LEDs utilizados no crescimento das plantas e contração de 400 ppm de CO_2 . (A) Medições nas plantas crescidas sob luz branca, (B) plantas crescidas sob luz azul, (C) plantas crescidas sob luz verde e (D) plantas crescidas sob luz vermelha. $n=5 \pm \text{SE}$.

Tabela 5 – Parâmetros fotossintéticos obtidos e estimados a partir das curvas A/C_i sob 2000 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR em plantas de tabaco crescidas em luz branca, luz azul, luz verde e luz vermelha, medidas com a câmara de topo transparente utilizando como fonte de excitação os mesmos LEDs disponíveis no crescimento das plantas. $V_{c_{\max}}$ - taxa máxima de carboxilação da RuBisCO [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})$ (μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)]; C_i - concentração intercelular de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e; g_s - condutância estomática máxima ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Médias seguidas de letras maiúsculas comparam os efeitos do LED na mesma planta (dentro do quadrante), e médias seguidas por letras minúsculas comparam os efeitos de cultivo das diferentes plantas sob o mesmo LEDs (entre os quadrantes) pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) sob análise da ANOVA fatorial. $n=5 \pm \text{SE}$

Planta	LED	$V_{c_{\max}}$	C_i	g_s
BRANCO	Branco	84.19 \pm 4.46 ABa	328.94 \pm 5.955 Bb	0.4087 \pm 0.0053 Bb
	Azul	69.59 \pm 5.66 Bc	348.32 \pm 4.245 Aa	0.5566 \pm 0.0629 Aa
	Verde	66.30 \pm 3.32 Bb	328.36 \pm 7.016 Ba	0.3869 \pm 0.0499 Ba
	Vermelho	98.63 \pm 2.77 Aab	331.30 \pm 6.425 Ba	0.4429 \pm 0.0352 ABa
AZUL	Branco	80.39 \pm 4.77 Ba	343.13 \pm 6.383 Aa	0.5114 \pm 0.0071 Aa
	Azul	101.45 \pm 3.13 ABab	344.21 \pm 4.660 Aa	0.5348 \pm 0.0688 Aa
	Verde	89.63 \pm 5.96 Ba	326.73 \pm 5.31 Ba	0.3397 \pm 0.0254 Ba
	Vermelho	103.27 \pm 2.87 Aa	323.28 \pm 1.526 Ba	0.3422 \pm 0.0049 Ba
VERDE	Branco	64.45 \pm 3.64 Ba	316.95 \pm 5.099 Ab	0.3447 \pm 0.0282 Ab
	Azul	84.93 \pm 9.71 Ab	328.17 \pm 5.117 Ab	0.3701 \pm 0.0276 Ab
	Verde	63.02 \pm 4.06 Bb	320.42 \pm 2.487 Aa	0.3668 \pm 0.0156 Aa
	Vermelho	79.40 \pm 7.13 Ab	321.77 \pm 3.927 Aa	0.3411 \pm 0.0201 Aa
VERMELHO	Branco	78.59 \pm 8.05 Ba	334.04 \pm 4.994 Aab	0.4041 \pm 0.0253 Ab
	Azul	110.34 \pm 10.07 Aa	327.34 \pm 7.334 Ab	0.3491 \pm 0.0497 Ab
	Verde	80.74 \pm 4.48 Bab	327.44 \pm 1.263 Aa	0.3763 \pm 0.0165 Aa
	Vermelho	92.68 \pm 5.69 ABab	315.51 \pm 3.714 Aa	0.3160 \pm 0.02615 Aa

2.3.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Foram observadas diferenças ultraestruturais em nível de cloroplasto, especialmente na disposição e organização dos tilacóides (Fig. 10). As alterações mais expressivas foram observadas entre as plantas GL e BL. Sob luz azul, evidenciou-se forte redução na quantidade de grana, que quando presentes, foram pobremente empilhados, verificando-se assim a predominância de tilacóides estromais (Fig. 10B e 10F). Por outro lado, nas plantas WL e RL visualizou-se grana bem desenvolvidos, mais curtos e muito empilhado (Fig. 10A, 10E, 10D e 10H). Nas plantas GL, observou-se grana mais longos, medianamente empilhados, porém, encontrou-se maior proporcionalidade entre membranas granais e estromais, em relação a BL (Fig. 10C e 10G).

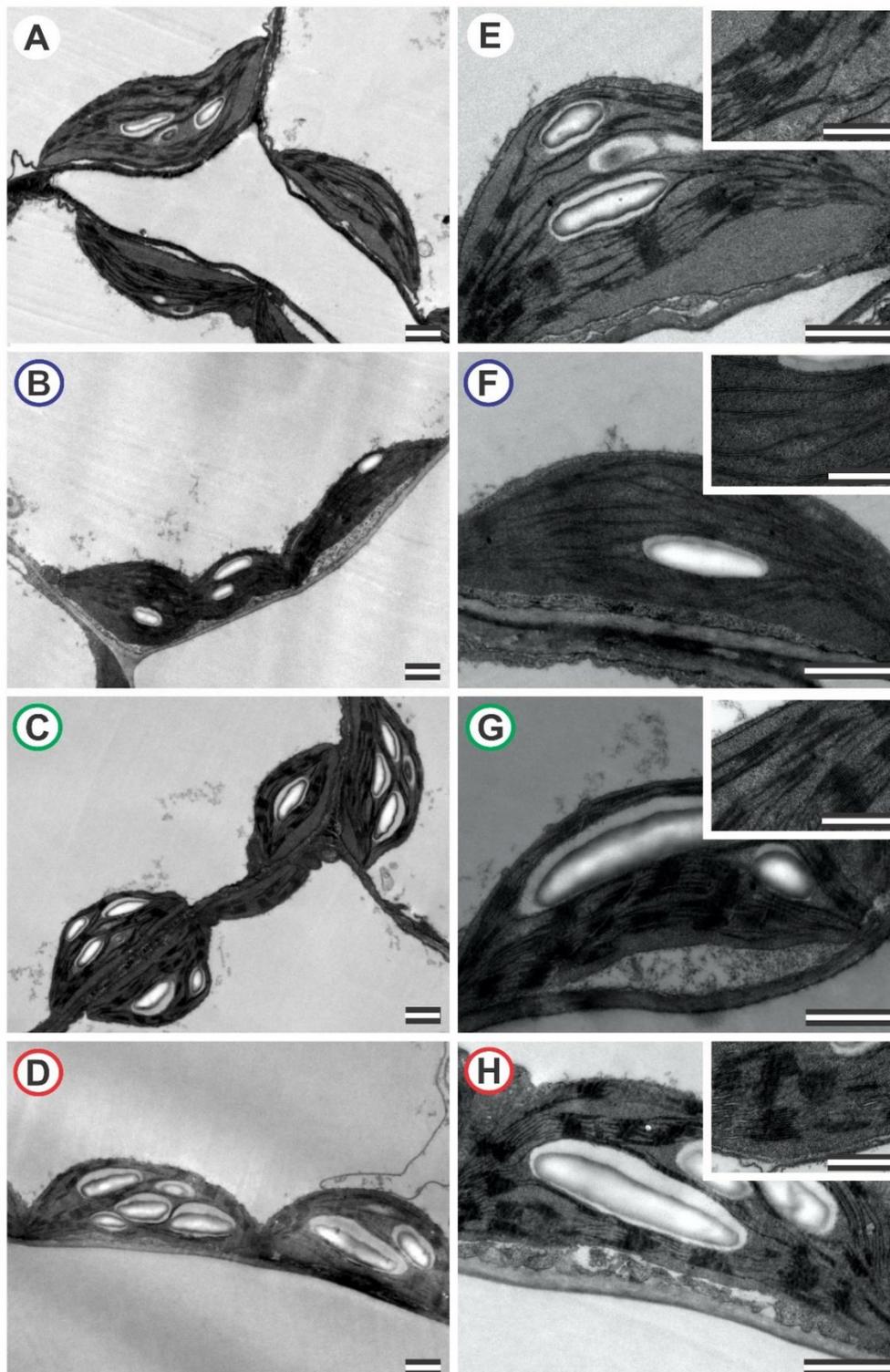


Figura 10 – Microscopia eletrônica de transmissão dos cloroplastos de folhas de tabaco, cultivadas sob diferentes qualidades de luz, após 15 dias de imposição dos tratamentos. (A e E) luz branca, (B e F) luz azul, (C e G) luz verde e (D e H) luz vermelha. *Inset* evidencia detalhe da organização dos tilacóides sob as diferentes qualidades de luz. Barra = 1 μ m e inset 500 nm.

2.3.4 Identificação dos polipeptídios das membranas dos tilacoides por SDS-PAGE

A composição dos polipeptídios das membranas dos tilacoides foi distinta entre as plantas crescidas sob diferentes qualidades de luz (Fig. 11). Diferenças mais expressivas foram observadas entre as plantas GL e BL. Observa-se redução expressiva da intensidade da banda próxima a 30 kDa nas plantas BL e forte intensidade da banda próxima a 24 kDa. Por outro lado, uma relação proporcional foi evidenciada entre essas proteínas nas plantas GL. As bandas entre 20 kDa a 30 kDa são relatadas como as frações polipeptídicas dos complexos coletores de luz (LHCs) e confirmadas por análises qualitativas de espectrometria de massas.

Descrição da proteína	Nº Acesso	Espécie	Função	Massa (Da)
Proteínas de ligação clorofila a-b	A0A1S4BC47_TOBAC	<i>N. tabacum</i>	Complexo coletor de luz (LHC) - funciona como um receptor de luz, captura e entrega de energia de excitação aos fotossistemas aos quais estão intimamente associados	28.399
	A0A1S3Y100_TOBAC			28.353
	A0A1S3Y974_TOBAC			28.293
	A0A1S3XEU1_TOBAC			28.178
	A0A1S3Y6I9_TOBAC			24.981
	A0A1S3Y8R2_TOBAC			23.339
	A0A1S3YWG7_TOBAC			23.339
	A0A1S3Y8G4_TOBAC			23.225
A0A1S3Y8B9_TOBAC	22.315			

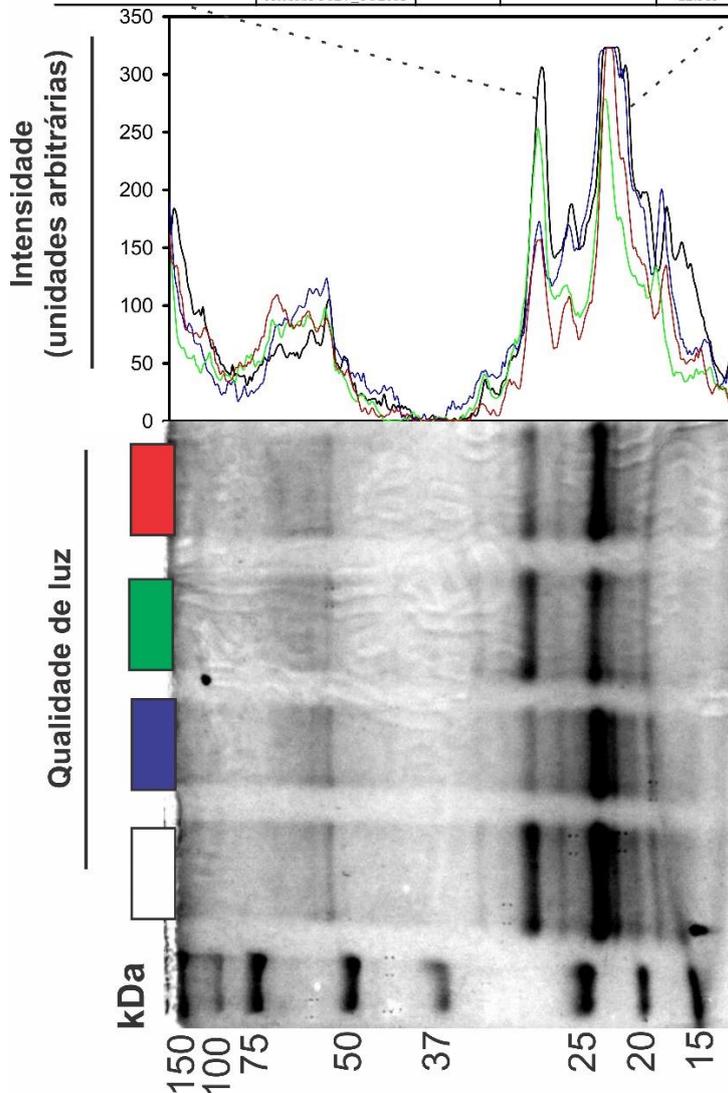


Figura 11 – Análise eletroforética por gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) de extratos de tilacóides isolados de folhas de tabaco, submetidas ao crescimento em diferentes qualidades de luz. As bandas e respectivas curvas associadas, indicam alterações dos polipeptídios presentes nos extratos. As amostras foram coradas com azul brilhante Coomassie. Os polipeptídios de 150 a 15 kDa foram observados nas preparações. Alterações mais pronunciadas foram observadas nos polipeptídios entre 20 a 30 kDa relacionados aos complexos coletores de luz (LHCs) e confirmados qualitativamente por análises de espectrometria de massas.

2.4 DISCUSSÃO

De acordo com resultados, as folhas absorvem porção substancial da luz verde (555 nm) (Fig. 5) que é capaz de conduzir as reações fotossintéticas (Tabela 4) e acúmulo de biomassa (Fig. 1 e Fig. 4) em plantas de *Nicotiana plumbaginifolia*. Analisando os padrões de crescimento das plantas cultivadas sob as diferentes qualidades espectrais, observou-se maior acúmulo de matéria seca nas plantas WL, BL e RL (aproximadamente 19%, 29% e 16%, respectivamente) em relação as plantas GL (Fig. 4). Além disso, os dados fotossintéticos referentes as mesmas condições de cultivo das plantas (A medido com os LEDs das respectivas condições de crescimento, com $100 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ de irradiância e 400 ppm de CO_2), demonstraram um incremento na assimilação líquida de CO_2 de 52%, 35% e 82% nas plantas WL, BL e RL, respectivamente, em relação as plantas GL, associado ao aumento no rendimento quântico sob luz incidente (α) de 51%, 38% e 79% (Tabela 2). Fica evidente que nessas condições (baixa irradiância), há menor eficiência nos parâmetros de crescimento e fotossintéticos das plantas cultivadas sob luz verde, contudo, tomando por base a luz incidente, e não a luz que é efetivamente absorvida pela folha.

Ressalta-se que as plantas foram cultivadas em irradiância abaixo do ponto de saturação ($100 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) (Fig. 8 e 9), condição em que a luz é o fator limitante e, teoricamente, a quantidade influencia fortemente nas respostas fotossintéticas e de crescimento das plantas. O índice de absorbância médio das folhas nas respectivas condições de cultivo, apresentaram um incremento de absorção de luz de aproximadamente 46% do azul e vermelho e 34% do branco, em relação a absorção do verde (Tabela 1). De tal forma, ao corrigir os dados de α pelas respectivas absorbâncias das folhas (α_{abs}) este parâmetro foi inferior na luz verde somente em relação ao α_{abs} estimado na luz vermelha (aproximadamente 25%) (Tabela 2). É importante salientar que nos resultados discutidos acima, os parâmetros de crescimento e fotossintéticos sofreram a influência de dois fatores distintos: a qualidade da luz de excitação (HOGEWONING et al., 2012; LYSENKO et al., 2019) e alterações fenotípicas que ocorreram influenciadas pelo ambiente em que as plantas se desenvolveram (CASAL, 2012; HOGEWONING et al., 2012; KIM et al., 2005; POORTER et al., 2011; SIMLAT et al., 2016).

O ambiente de luz disponível no crescimento das plantas, altera os parâmetros fotoquímicos e carboxilativos da fotossíntese, dado a complexidade óptica, anatômica, estrutural e bioquímica das folhas que são afetadas por tais condições (BRODERSEN et

al., 2008; EVANS; TERASHIMA, 1988; MA et al., 2017; MUNEER et al., 2014). Ao analisar os parâmetros fotossintéticos conduzidos sob a mesma fonte de iluminação, atribuiu-se as diferenças nas respostas observadas às alterações fenotípicas promovidas nas plantas desenvolvidas sob as diferentes qualidades espectrais. Usualmente avaliam-se as trocas gasosas [fotossíntese] com 90% de luz vermelha e 10% de azul em sistemas controlados. Diversos estudos atribuem a essas faixas espectrais o rendimento máximo da fotossíntese, onde a luz azul desempenha papel importante no controle da abertura estomática agindo em sinergia com a luz vermelha (MCCREE, 1971; SHIMAZAKI et al., 2007; ZEIGER; HEPLER, 1977). Com equipamentos comerciais disponíveis atualmente, é possível realizar medidas simultâneas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila que podem fornecer informações importantes sobre a eficiência fotossintética, referentes aos processos biofísicos e bioquímicos (BAKER; ROSENQVIST, 2004; ICHIRO et al., 2016), além de maiores detalhes sobre o funcionamento do aparato fotossintético e processos fisiológicos, muitas vezes difíceis de serem explorados apenas com uma das técnicas.

Os dados de trocas gasosas utilizando a fonte de luz padrão disponível no equipamento Li-6800 revelaram que as plantas GL apresentaram redução no α_{abs} em relação as plantas WL e BL. No entanto, apesar da menor eficiência das plantas GL em reduzir o CO₂ por fóton absorvido, o A_{max} não diferiu estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 3). Além disso, através dos dados de fluorescência da clorofila *a*, observou-se menor rendimento quântico potencial do PSII em reduzir o pool de quinonas (F_v/F_m ; Fig. 7A, *inset*), ou seja, menor eficiência máxima fotoquímica nas plantas GL. Associado a isto, observou-se menor eficiência fotoquímica efetiva do PSII quando os centros de reação se encontravam totalmente abertos (Qa oxidada) (F_m'/F_v' ; Fig. 7A). Por outro lado, a eficiência operacional dos centros de reação do PSII (ϕPSII) sob alto PPF, igualou-se as plantas WL, BL e RL (Fig. 7B). Ou seja, sob forte iluminação, quando todo o sistema estava operante, mesmo com potencial fotoquímico máximo reduzido, grande parte da luz absorvida pelas clorofilas do sistema antena do PSII foi eficientemente convertida em energia fotoquímica nas plantas GL. No entanto, supõe-se que devem ocorrer mecanismos compensatórios para manter o ϕPSII inalterado entre as plantas.

Em geral, sob baixa irradiância o ϕPSII apresentam valores mais altos devido à grande proporção da luz absorvida que é utilizada na fotoquímica. Por outro lado, em alta irradiância as plantas tendem a apresentar valores menores de ϕPSII , porque parte da energia de excitação é dissipada pelos processos não fotoquímicos (dentre eles na forma

de fluorescência e calor) (BAKER, 2008; MAXWELL; JOHNSON, 2000). Neste trabalho, os dados de quenching não fotoquímico (NPQ), e os coeficiente do quenching fotoquímico (qP) e não fotoquímico (qN) em função do PPF, forneceram informações sobre a partição da energia no processo fotossintético. Os parâmetros qP e qN representam as frações da fluorescência variável que são dissipadas pelos processos fotoquímicos e não fotoquímicos respectivamente, enquanto o NPQ indica a fração da energia de excitação dos pigmentos que é dissipada em forma de calor (BAKER, 2008; LAZÁR, 2015). Os resultados demonstraram que em alto PPF, as plantas BL dissiparam grande parte da energia de excitação em forma de calor (NPQ; Fig. 7C), possivelmente associado a maior proteção do aparato fotossintético (GRUSZECKI et al., 2010; LONGONI; SAMOL; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, 2019; RUBAN, 2016). Adicionalmente, os dados de qP revelaram que a dissipação de energia de excitação via quenching fotoquímico foi maior nas plantas GL (Fig. 7D), mostrando uma alta eficiência na partição de energia de excitação para conduzir os processos fotossintéticos nessas plantas.

O principal componente do NPQ é o quenching dependente de energia (qE) relacionado ao gradiente de prótons através da membrana do tilacóide e ativação do ciclo das xantofilas (BAKER; HARBINSON; KRAMER, 2007; GUIDI; LO PICCOLO; LANDI, 2019; STIRBET; GOVINDJEE, 2011). Outro componente associado a dissipação não fotoquímica é o quenching do estado de transição (qT), relacionado à fosforilação do LHCII e o balanço de excitação entre o PSI e PSII (HOGEWONING et al., 2012; KRAUSE; WEIS, 1991). Qualquer desequilíbrio na excitação dos dois fotossistemas resulta em perdas de rendimento quântico da fotossíntese. A curto prazo, em escala de minutos, o estado de transição redireciona a energia de excitação entre os fotossistemas, podendo ocorrer movimentação do LHCII para o PSI, formando complexos PSI-LHCI-LHCII (BURTON-SMITH et al., 2019; HORTON, 2012; LONGONI; SAMOL; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, 2019; PESARESI et al., 2002; WOOD et al., 2019). Por outro lado, a longo prazo, as plantas podem aclimatar-se as alterações espectrais no ambiente de crescimento, alterando o tamanho relativo dos fotossistemas, ou ainda, a razão entre PSI/PSII. A restauração do balanço de excitação entre os fotossistemas, pode resultar no incremento da taxa de transporte de elétrons e do rendimento quântico para a fixação de CO₂ (HOGEWONING et al., 2012). Nossos resultados mostraram que a aclimação em resposta a diferentes qualidades espectrais no crescimento das plantas, ocorreram em nível de cloroplasto, modificando principalmente

o empilhamento e disposição dos tilacoides e a relação entre membranas granais e estromais, como pôde ser observado por técnica de microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 10 e *inset* com detalhes dos grana).

As membranas granais são fortemente enriquecidas com PSII e supercomplexos PSII-LHCII, enquanto nas membranas estromais esses complexos estão presentes em minoria, sendo a presença do complexo PSI predominantes nesta membrana (ARO et al., 2005; BASSI; GIACOMETTI; SIMPSON, 1988; DALL'OSTO et al., 2019; KHATOON et al., 2009; MILLER, 1980; MILLER; CUSHMAN, 1979; SUORSA et al., 2015; YAMAMOTO et al., 2014). Estudos revelam que a ocorrência de alterações estruturais, como o desempilhamento dos tilacoides nos cloroplastos induzidas sob iluminação excessiva, desempenham um papel importante na fotoproteção e no reparo de proteínas danificadas no PSII (KHATOON et al., 2009; SUORSA et al., 2015; YAMAMOTO et al., 2014). Além disso, alterações na composição e organização estrutural dos complexos PSI, PSII e LHCII nas membranas dos tilacoides desempenham importante papel na regulação de ambos os componentes qE e qT, relativos ao NPQ (HOGEWONING et al., 2012; JOHNSON et al., 2011; STIRBET; GOVINDJEE, 2011). Neste trabalho, os resultados demonstraram redução da absorção foliar e decréscimo do conteúdo de clorofilas e carotenoides nas plantas BL em comparação as plantas crescidas sob outras qualidades espectrais (Fig. 5 e 6). Uma vez que a dissipação de energia não radiativa via qE está associado ao conteúdo de carotenoides (BAKER; HARBINSON; KRAMER, 2007; JOHNSON et al., 2011; STIRBET; GOVINDJEE, 2011), possivelmente a dissipação da energia de excitação via qT apresentou contribuição significativa no aumento do NPQ naquelas plantas.

Adicionalmente, as análises de SDS-PAGE evidenciaram alterações nos polipeptídios presentes nos complexos LHCII, quando as plantas foram cultivadas nas diferentes qualidades de luz (Fig. 11). Nas plantas BL observou-se alteração na proporção dos polipeptídios do LHCII em relação as demais plantas. Evidencia-se que ocorreu maior expressão de proteínas próximos a 24 kDa em BL em detrimento daquelas em 30 kDa. No entanto, em GL, uma relação proporcional foi evidenciada entre essas proteínas, podendo assim, refletir na expressão e distribuição das proteínas do LHCII como mecanismos de fotoproteção aos fotossistemas I e II (CAZZANIGA et al., 2019; DALL'OSTO et al., 2019). Através desse conjunto de dados, demonstra-se que a qualidade espectral de cultivo das plantas altera a organização estrutural das membranas fotossintéticas, e possivelmente, a estequiometria dos fotossistemas, e a proporção de

polipeptídios dos complexos coletores de luz LHCII, promovendo a eficiência de partição de energia de excitação nas plantas. Em BL, as modificações estruturais, como a maior proporção de membranas estromais, além de alterações bioquímicas na composição das membranas dos tilacóides, parecem estar envolvidas na dissipação do excesso de energia como uma forma de fotoproteção do aparato fotossintético. Nas plantas GL, as alterações parecem contribuir para o ajuste da distribuição de energia, e o uso eficiente da luz para conduzir a fotossíntese em condição de alta luminosidade. Além disso, estudos mostram que grana mais empilhados estão associados a maiores coeficientes de absorvidade da luz verde em folhas de tomate, mas não em relação a absorvidade da luz azul ou vermelha (MORIWAKI et al., 2019).

Ressalta-se novamente que os resultados dos parâmetros fotossintéticos e de fluorescência discutidos acima, são referentes a medição com a luz de excitação de 90% de vermelho e 10% de azul. No entanto, a composição bioquímica e propriedades ópticas diferem entre o PSI e PSII, conseqüentemente o balanço de excitação entre os dois fotossistemas é dependente da qualidade espectral da luz de excitação (HOGEWONING et al., 2012). A excitação com luz verde normalmente não é aplicada nos estudos dos parâmetros de fluorescência das plantas, sendo a luz vermelha disponível na maioria dos equipamentos comerciais padrões para esse tipo de análise. De tal forma, devido a limitações experimentais, não foi possível obter os parâmetros de fluorescência com excitação em diferentes qualidades espectrais. De fato, os poucos estudos encontrados sobre o assunto revelam que não há diferenças nos valores de F_v/F_m , medidos com as luzes de excitação vermelho e verde, mas reduzem significativamente quando medidos com a luz azul (HOGEWONING et al., 2012; LYSENKO et al., 2019).

Não obstante, neste trabalho foi possível realizar as medições das trocas gasosas com as diferentes qualidades espectrais, através da substituição das luzes de excitação pelos LEDs utilizados no crescimento das plantas. Ao comparar os parâmetros fotossintéticos medidos com a fonte de luz verde (GM) nas diferentes plantas, observou-se o incremento de A_{max} em GL, sendo o aumento mais expressivo em relação a BL (20%). Entretanto, de forma contraditória, houve redução de 18% do α_{abs} (comparação entre quadrantes; Tabela 4). Por outro lado, utilizando a fonte de iluminação com azul (BM), não houve diferença significativa em A_{max} entre as plantas. Entretanto, a planta GL teve redução bastante expressiva do α_{abs} (35%) em relação a planta BL (comparação entre quadrantes; Tabela 4). Os resultados demonstraram que sob baixa irradiância, as plantas GL são menos eficientes em reduzir o CO_2 , independentemente da luz de excitação

disponível (comparação entre quadrantes; Tabela 4). Em condição de luz saturante, no entanto, esse quadro foi revertido e as plantas GL tenderam a maximizar a taxa de assimilação líquida do CO₂. Possivelmente isso ocorreu em função da maior eficiência na partição da energia de excitação para os processos fotoquímicos em detrimento da dissipação de energia não fotoquímica (Fig. 7D). No entanto, quando excitadas com a luz azul que é considerada fortemente energética (BAYAT et al., 2018; FUKUDA et al., 2016), a menor eficiência na dissipação de energia não fotoquímica evidenciada na planta GL, possivelmente promoveu danos fotoquímicos no PSII e, conseqüentemente, causou a redução expressiva do α_{abs} . Em contrapartida, nas plantas BL que apresentaram mecanismos de fotoproteção mais eficientes (apesar de menores teores de carotenoides), não ocorreu a redução do α_{abs} , possivelmente, associado a maior dissipação do excesso de energia nessas plantas em decorrência das alterações ultrasestruturais dos tilacóides, bem como das alterações no polipeptídios de LHCs que permitiram essa maior dissipação energética (BRODERSEN et al., 2008; FALCIONI et al., 2017; GRUSZECKI et al., 2010; MAGDAONG; BLANKENSHIP, 2018; NATALI et al., 2016; VOGELMANN; EVANS, 2002).

Sob baixa irradiância, onde a intensidade de luz limita a etapa fotoquímica da fotossíntese, a assimilação de CO₂ aumenta de forma linear, proporcionalmente a intensidade de luz disponível. Nesta etapa, a energia de excitação capturada pelo complexo de coleta de luz contendo clorofilas e carotenoides é eficientemente transferida para os centros de reações do PSI e PSII, para que ocorram as reações fotoquímicas (HORTON, 2012; LEPETIT; DIETZEL, 2015; RUBAN, 2016; YEATES; ZUBKO; RUBAN, 2019). Por outro lado, com o aumento da intensidade de luz, a taxa fotossintética atinge um platô, onde não ocorre o incremento da assimilação de CO₂ em função da maior disponibilidade de luz. Neste estágio, o excesso de energia pode ocasionar danos fotooxidativos no PSII, ao mesmo tempo que um sistema de reparo e recuperação torna-se operante para evitar o stress fotoquímico (BALLOTTARI et al., 2012; MIAO et al., 2016; RUBAN, 2016; YAMAMOTO et al., 2014). Em nossos resultados, observa-se que em geral, independentemente das luzes de excitação das medições, as plantas GL apresentaram incremento expressivo do PS_{abs} em relação as outras plantas. Por outro lado, nas plantas BL esse parâmetro reduziu drasticamente, principalmente em comparação a planta GL (comparação entre quadrantes, Tabela 4 e Fig. 9). Não obstante, foram encontrados altos valores de C_i e próximos entre todos os tratamentos (315 a 348 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Ainda, o g_s não diferiu entre as plantas quando

mensurados com GM, porém quando medidos em BM constatou-se a redução dos valores nas plantas GL e RL, mas não na planta BL (comparação entre quadrantes, Tabela 5). Além disso, o parâmetro de velocidade de carboxilação da RuBisCO, ($V_{c_{max}}$) tenderam a ser maior nas plantas BL em relação as plantas GL (comparação entre quadrantes, Tabela 5). De tal forma, não se justifica tal diferença entre os PS_{abs} em função de limitações carboxilativas entre as plantas. Corroborando com o que foi discutido até agora, os resultados indicam que as plantas GL apresentaram menor capacidade de dissipação de energia nos processos não fotoquímicos. De tal forma, a maior parte da energia foi destinada para a condução dos processos fotossintéticos, o que aumentou consideravelmente o PS_{abs} . No entanto, o excesso de energia promovido pela excitação com BM causou danos fotooxidativos no PSII. Por outro lado, nas plantas BL que apresentaram um forte sistema de fotoproteção, as taxas de dano e reparo podiam estar equilibradas ocasionando a redução do PS_{abs} mas não do α_{abs} (BRODERSEN; VOGELMANN, 2010; FALCIONI et al., 2017; VOGELMANN; EVANS, 2002).

Portanto, as modificações fenotípicas nas plantas crescidas sobre as diferentes qualidades espectrais alteram a eficiência fotossintética, alterando principalmente a ativação de mecanismos de fotoproteção e os processos de fotoinibição. Não obstante, para demonstrar os efeitos das diferentes qualidades espectrais na condução da fotossíntese, os próximos resultados serão discutidos em relação as medições realizadas nas mesmas plantas com os diferentes LEDs utilizados como fonte de excitação (comparação dentro dos quadrantes, Tabela 4). Surpreendentemente os resultados mostraram que a atividade fotossintética iluminada com luz verde não foi muito diferente da atividade fotossintética de plantas iluminadas com luz azul ou vermelha (comparação dentro dos quadrantes, Tabela 4 e Fig. 8). De fato, a aparência verde das plantas, causada pela maior taxa de reflectância dos comprimentos de onda na faixa de 500 a 600 nm, pode dar a impressão de que a luz verde tem menor importância e participação na fisiologia das plantas, especialmente em termos fotossintéticos, uma vez que, este processo está prioritariamente relacionado a absorção da luz. No entanto, há várias evidências que a luz verde conduz eficientemente a fotossíntese, desde que seja absorvida (FOLTA, 2004; LIU et al., 2016; SUN; NISHIO; VOGELMANN, 1998; TERASHIMA et al., 2009; WANG; FOLTA, 2013). O fato relevante neste trabalho é que mesmo com redução significativa de absorção da luz na faixa espectral do verde em relação ao azul e vermelho, sob alta disponibilidade de PPFD, as taxas fotossintéticas igualaram-se, ou mesmo foram superiores, dependendo da condição espectral de cultivo da planta. Ou seja, sob alto PPFD

mostrou-se a maior eficiência da luz verde em governar a fotossíntese (FOLTA, 2004; FOLTA; MARUHNICH, 2007; SUN; NISHIO; VOGELMANN, 1998; TERASHIMA et al., 2009; WANG; FOLTA, 2013) em comparação a luz azul, por exemplo.

Estudos tem revelado que a luz azul e a luz vermelha, que são faixas espectrais com alto coeficiente de absorção pelas clorofilas, são eficientemente absorvidas pelas folhas nas primeiras camadas de cloroplastos no parênquima paliçádico (superfície adaxial) (FALCIONI et al., 2017; VOGELMANN; EVANS, 2002; VOGELMANN, 1993). Porém, isso dificulta a absorção nas camadas inferiores, dado que a maior parte da luz é absorvida e pouco transmitida para essas camadas. De modo contrário, a luz verde possui menores índices de absorção pelos pigmentos fotossintéticos, e difunde-se pelas camadas da folha aumentando a possibilidade de encontro da luz com as regiões de alta concentração dos pigmentos nos tilacoides. Isso possibilita a absorção mais uniforme ao longo do perfil foliar. Terashima *et al.*, (2009) relataram que em condição de forte iluminação com luz branca, a luz verde conduz de maneira mais eficiente a fotossíntese em comparação a luz vermelha. Ainda, de acordo com Sun *et al.*, (1998), a taxa máxima de fixação de carbono quando a folha é irradiada com luz branca ocorre na parte inferior, e não na parte superior da folha onde alta disponibilidade de luz é esperada. Em nossos resultados, ao analisar as curvas de resposta a luz, observou-se que quando as plantas foram iluminadas com a fonte BM, as curvas de luz apresentaram características típicas de fotoinibição, exibindo menor convexidade da curva associados a pontos de saturação mais altos, redução do α e da assimilação do CO₂ (LEVERENZ et al., 1990). Os resultados indicam que a luz azul atua fortemente na ativação dos processos fotoinibitórios e isso ocorre, possivelmente, devido à alta pressão de excitação dos complexos de coleta de luz e dos fotossistemas, devido à forte absorção nas primeiras camadas de cloroplastos das folhas. Por outro lado, a luz verde que é absorvida de forma mais homogênea ao longo do perfil foliar, apresentou maior eficiência fotossintética em condição de alta disponibilidade de luz, possivelmente, associado a menor dissipação de energia nos processos não fotoquímicos (BRODERSEN et al., 2008; BRODERSEN; VOGELMANN, 2010; GORTON et al., 2010; TERASHIMA et al., 2009; VOGELMANN; EVANS, 2002). Por fim, confirma-se que as plantas não discriminam o verde do ponto de vista fotossintético e que esta faixa espectral constituiu uma importante fonte de energia para as plantas.

2.5 CONCLUSÃO

Nas plantas de tabaco cultivadas sob luz azul, alterações estruturais a nível de cloroplasto, como menor empilhamento dos tilacóides, além de alterações bioquímicas na composição dessas membranas, estão associadas a maior eficiência na dissipação de energia de excitação e proteção do aparato fotossintético. Nas plantas crescidas sob luz verde, às alterações estruturais e bioquímicas, como a maior proporcionalidade na relação entre membranas granais para estromais e distribuição relativamente mais homogênea das proteínas do LHCII, contribuem para o ajuste da partição de energia para os processos fotoquímicos em detrimento dos processos não-fotoquímicos.

Ainda, a luz verde conduz as reações fotoquímicas e de fixação de carbono da fotossíntese, e pode ser considerada uma importante fonte energética para as plantas. No entanto, em condição de baixa intensidade de luz verde, as plantas são menos eficientes na promoção da fotossíntese quando comparada as luzes branca, azul e vermelha. Por outro lado, sob alta intensidade, esse quadro é revertido e a luz verde conduz eficientemente as trocas gasosas, de modo similar as outras qualidades espectrais.

2.6 REFERÊNCIAS

ARENA, C. et al. The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpene-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum* L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 130, p. 122–132, 2016.

ARO, E.; SUORSA, M.; ROKKA, A.; ALLAHVERDIYEVA, Y.; PAAKKARINEN, V.; SALEEM, A.; BATTCHIKOVA, N. Dynamics of photosystem II : a proteomic approach to thylakoid protein complexes. **Journal of Experimental Botany** v. 56, n. 411, p. 347–356, 2005.

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

BAKER, N. R.; HARBINSON, J.; KRAMER, D. M. Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, n. 9, p. 1107–1125, 2007.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1607–1621, 2004.

BALLOTTARI, M.; GIRARDON, J.; DALL'OSTO, L.; BASSI, R. Evolution and functional properties of Photosystem II light harvesting complexes in eukaryotes. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1817, n. 1, p. 143–157, 2012.

BASSI, R.; GIACOMETTI, G.; SIMPSON, D. J. Characterisation of stroma membranes from *Zea mays* L. chloroplasts. **Carlsberg Research Communications**, v. 53, n. 3, p. 221–232, 1988.

BAYAT, L.; ARAB, M.; ALINIAEIFARD, S.; SEIF, M.; LASTOCHKINA, O.; LI, T. Effects of growth under different light spectra on the subsequent high light tolerance in rose plants. **AoB PLANTS**, v. 10, n. 5, p. 1–17, 2018.

BOS, P.; OOSTERWIJK, A.; KOEHORST, R.; BADER, A.; PHILIPPI, J.; VAN AMERONGEN, H.; WIENTJES, E. Digitonin-sensitive LHCII enlarges the antenna of Photosystem I in stroma lamellae of *Arabidopsis thaliana* after far-red and blue-light treatment. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1860, n. 8, p. 651–658, 2019.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRODERSEN, C. R.; VOGELMANN, T. C. Do changes in light direction affect absorption profiles in leaves? **Functional Plant Biology**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 403–412, 2010.

BRODERSEN, C. R.; VOGELMANN, T. C.; WILLIAMS, W. E.; GORTON, H. L. A new paradigm in leaf-level photosynthesis: Direct and diffuse lights are not equal. **Plant, Cell and Environment**, v. 31, p. 159–164, 2008.

BURTON-SMITH, R. N.; WATANABE, A.; TOKUTSU, R.; SONG, C.; MURATA, K.; MINAGAWA, J. Structural determination of the large photosystem II–light harvesting complex II supercomplex of *Chlamydomonas reinhardtii* using non-ionic amphipol. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc.RA119.009341, 2019.

CAO, P.; SU, X.; PAN, X.; LIU, Z.; CHANG, W.; LI, M.. Structure, assembly and energy transfer of plant photosystem II supercomplex. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**. v. 1859, p. 633–644, 2018.

CASAL, J. J. Shade avoidance. **The arabidopsis book / American Society of Plant Biologists**, v. 10, p. e0157, 2012.

CAZZANIGA, S.; KIM, M.; BELLAMOLI, F.; JEONG, J.; LEE, S.; PEROZENI, F.; POMPA, A.; JIN, E.; BALLOTTARI, M. Photosystem II antenna complexes CP26 and CP29 are essential for non-photochemical quenching in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant, Cell and Environment**, p. pce.13680, 2019.

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

DALL’OSTO, L.; CAZZANIGA, S.; ZAPPONE, D.; BASSI, R. Monomeric light harvesting complexes enhance excitation energy transfer from LHCII to PSII and control their lateral spacing in thylakoids. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, s/v, p. 148035, 2019.

EVANS, J. R.; POORTER, H. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: The relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 8, p. 755–767, 2001.

EVANS, J. R.; MORGAN, P. B.; VON CAEMMERER, S. Light quality affects chloroplast electron transport rates estimated from Chl fluorescence measurements. **Plant and Cell Physiology**, v. 58, n. 10, p. 1652–1660, 2017.

EVANS, J. R.; TERASHIMA, I. Photosynthetic characteristics of spinach leaves grown with different nitrogen treatments. **Plant and Cell Physiology**, v. 29, p. 157–165, 1988.

FALCIONI, R.; MORIWAKI, T.; BENEDITO, E.; BONATO, C. M.; DE SOUZA, L. A.; 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, n. 3, p. 235–250, 2018.

FALCIONI, R.; MORIWAKI, T.; BONATO, C. M.; DE SOUZA, L. A.; 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.

- 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.; MARUHNICH, S. A. Green light: A signal to slow down or stop. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 12, p. 3099–3111, 2007.
- FUKUDA, N.; AJIMA, C.; YUKAWA, T.; OLSEN, J. E. Antagonistic action of blue and red light on shoot elongation in petunia depends on gibberellin, but the effects on flowering are not generally linked to gibberellin. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, p. 102–111, 2016.
- GILLMOR, S.; POINDEXTER, P.; LORIEAU, J.; PALCIC, M. M.; SOMERVILLE, C. α -glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in Arabidopsis. **Journal of Cell Biology**, v. 156, n. 6, p. 1003–1013, 2002.
- GIVNISH, T. J. Adaptation to sun and shade: A whole-plant perspective. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 63–92, 1988.
- GORTON, H. L.; BRODERSEN, C. R.; WILLIAMS, W. E.; VOGELMANN, T. C. Measurement of the optical properties of leaves under diffuse light. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 1076–1083, 2010.
- GRUSZECKI, W. I.; LUCHOWSKI, R.; ZUBIK, M.; GRUDZINSKI, W.; JANIK, E.; GOSPODAREK, M.; GOC, J.; GRYCZYNSKI, Z.; GRYCZYNSKI, I. Blue-light-controlled photoprotection in plants at the level of the photosynthetic antenna complex LHCII. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 1, p. 69–73, 2010.
- GUIDI, L.; LO PICCOLO, E.; LANDI, M. Chlorophyll fluorescence, photoinhibition and abiotic stress: Does it make any difference the fact to be a C3 or C4 species? **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. February, p. 1–11, 2019.
- HOFFMANN, W. A.; POORTER, H. Avoiding bias in calculations of relative growth rate. **Annals of Botany**, v. 90, p. 37–42, 2002.
- HOGEWONING, S. W.; WIENTJES, E.; DOUWSTRA, P.; TROUWBORST, G.; VAN IEPEREN, W.; CROCE, R.; HARBINSON, J. Photosynthetic quantum yield dynamics: From photosystems to leaves. **Plant Cell**, v. 24, n. 5, p. 1921–1935, 2012.
- HORTON, P.. Optimization of light harvesting and photoprotection: Molecular mechanisms and physiological consequences. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1608, p. 3455–3465, 2012.
- ICHIRO, T.; HIROKI, O.; TAKASHI, F.; RIICHI, O. Light environment within a leaf. II. Progress in the past one-third century. **Journal of Plant Research**, v. 129, p. 353–363, 2016.
- JOHNSON, M. P.; GORAL, T. K.; DUFFY, C. D. P.; BRAIN, A. P. R.; MULLINEAUX, C. W.; RUBAN, A. V. Photoprotective energy dissipation involves the reorganization of photosystem II light-harvesting complexes in the grana membranes of spinach chloroplasts. **Plant Cell**, v. 23, n. 4, p. 1468–1479, 2011.

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

KHATOON, M. et al. Quality control of photosystem II: Thylakoid unstacking necessary to avoid further damage to the D1 protein and to facilitate D1 degradation under light stress in spinach thylakoids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 37, p. 25343–25352, 2009.

KIM, G.; YANO, S.; KOZUKA, T.; TSUKAYA, H. Photomorphogenesis of leaves: shade-avoidance and differentiation of sun and shade leaves. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 4, p. 770–774, 2005.

KITAZAKI, K. et al. Metabolic reprogramming in leaf lettuce grown under different light quality and intensity conditions using narrow-band LEDs. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1–12, 2018.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAZÁR, D. Parameters of photosynthetic energy partitioning. **Journal of Plant Physiology**, v. 175, p. 131–147, 2015.

LEPETIT, B.; DIETZEL, L. Light signaling in photosynthetic eukaryotes with “green” and “red” chloroplasts. **Environmental and Experimental Botany**, v. 114, p. 30–47, 2015.

LEVERENZ, J. W.; FALK, S.; PILSTRÖM, C. M.; SAMUELSSON, G. The effects of photoinhibition on the photosynthetic light-response curve of green plant cells (*Chlamydomonas reinhardtii*). **Planta**, v. 182, n. 2, p. 161–168, 1990.

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

LIU, H.; FU, Y.; WANG, M.; LIU, H. Green light enhances growth, photosynthetic pigments and CO₂ assimilation efficiency of lettuce as revealed by knock-out. **Photosynthetica**, v. 54, p. 1–10, 2016.

LONGONI, P.; DOUCHI, D.; CARITI, F.; FUCILE, G.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M. Phosphorylation of the light-harvesting complex II isoform Lhcb2 is central to state transitions. **Plant Physiology**, v. 169, n. 4, p. 2874–2883, 2015.

LONGONI, P.; SAMOL, I.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M. The kinase STATE TRANSITION 8 phosphorylates Light harvesting complex II and contributes to light acclimation in *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. September, p. 1–13, 2019.

LYSENKO, V.; GUO, Y.; KOSOLAPOV, A.; USOVA, E.; VARDUNY, T.; KRASNOV, V. Polychromatic Fourier-PAM fluorometry and hyperspectral analysis of chlorophyll fluorescence from *Phaseolus vulgaris* leaves: Effects of green light. **Information Processing in Agriculture**, v. x, p. x–xx, 2019.

MA, J.; SUN, W.; KOTEYEVA, N. K.; VOZNESENSKAYA, E.; STUTZ, S. S.; GANDIN, N.; SMITH-MORITZ, A. M.; HEAZLEWOOD, J. L.; COUSINS, A. B. Influence of light and nitrogen on the photosynthetic efficiency in the C4 plant *Miscanthus × giganteus*. **Photosynthesis Research**, v. 131, p. 1–13, 2017.

MAGDAONG, N. C. M.; BLANKENSHIP, R. E. Photoprotective, excited-state quenching mechanisms in diverse photosynthetic organisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 14, p. 5018–5025, 2018.

MATHUR, S.; JAIN, L.; JAJOO, A. Photosynthetic efficiency in sun and shade plants. **Photosynthetica**, v. 56, n. 1, p. 354–365, 2018.

MATSUDA, R.; OHASHI-KANEKO, K.; FUJIWARA, K.; KURATA, K. Effects of blue light deficiency on acclimation of light energy partitioning in PSII and CO₂ assimilation capacity to high irradiance in spinach leaves. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, n. 4, p. 664–670, 2008.

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

MCCREE, K. J. The action spectrum, absorptance and quantum yield of photosynthesis in crop plants. **Agricultural Meteorology**, v. 9, p. 191–216, 1971.

MIAO, Y.; WANG, X.; GAO, L.; CHEN, Q.; QU, M. Blue light is more essential than red light for maintaining the activities of photosystem II and I and photosynthetic electron transport capacity in cucumber leaves. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 1, p. 87–100, 2016.

MILLER, K. R. A chloroplast membrane lacking photosystem I changes in unstacked membrane regions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 592, p. 143–152, 1980.

MILLER, K. R.; CUSHMAN, R. A. A chloroplast membrane lacking Photosystem II. Thylakoid stacking in the absence of the Photosystem II particle. **BBA - Bioenergetics**, v. 546, n. 3, p. 481–497, 1979.

MIRKOVIC, T.; OSTROUMOV, E. E.; ANNA, J. M.; VAN GRONDELLE, R.; GOVINDJEE; SCHOLE, G. D. Light absorption and energy transfer in the antenna complexes of photosynthetic organisms. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 2, p. 249–293, 2017.

MORIWAKI, T.; FALCIONI, R.; TANAKA, F. A. O.; CARDOSO, K. A. K.; 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, 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.

NATALI, A.; GRUBER, J. M.; DIETZEL, L.; STUART, M. C. A.; VAN GRONDELLE, R.; CROCE, R. Light-harvesting Complexes (LHCs) cluster spontaneously in membrane environment leading to shortening of their excited state lifetimes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 32, p. 16730–16739, 2016.

NIINEMETS, Ü. Photosynthesis and resource distribution through plant canopies. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, p. 1052–1071, 2007.

PESARESI, P. et al. A stable LHCII-PSI aggregate and suppression of photosynthetic state transitions in the *psae1-1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 215, n. 6, p. 940–948, 2002.

POORTER, H.; NIKLAS, K. J.; REICH, P. B.; OLEKSYN, J.; POOT, P.; MOMMER, L. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analysis of interspecific variation and environmental control. **New Phytologist**, v. 193, p. 30–50, 2011.

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, n. 1, p. 208–212, 1963.

RUBAN, A. V. Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: Mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. **Plant Physiology**, v. 170, n. 4, p. 1903–1916, 2016.

SHARKEY, T. D. What gas exchange data can tell us about photosynthesis. **Plant Cell and Environment**, v. 39, n. 6, p. 1161–1163, 2016.

SHIMAZAKI, K.; DOI, M.; ASSMANN, S. M.; KINOSHITA, T. Light regulation of stomatal movement. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 219–247, 2007.

SILVA, P. E. M.; CAVATTE, P. C.; MORAIS, L. E.; MEDINA, Ed. 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.

SIMLAT, M.; ŚLĘZAK, P.; MOŚ, M.; WARCHOŁ, M.; SKRZYPEK, E.; PTAK, A. The effect of light quality on seed germination, seedling growth and selected biochemical properties of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Scientia Horticulturae**, v. 211, p. 295–304, 2016.

STIRBET, A.; GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104, n. 1–2, p. 236–257, 2011.

- SUN, J.; NISHIO, J. N.; VOGELMANN, T. C. Green light drives CO₂ fixation deep within leaves. **Plant and Cell Physiology**, v. 39, n. 10, p. 1020–1026, 1998.
- SUORSA, M.; RANTALA, M.; MAMEDOV, F.; LESPINASSE, M.; TROTTA, A.; GRIECO, M. Light acclimation involves dynamic re-organization of the pigment – protein megacomplexes in non-appressed thylakoid domains. **Europe PMC**, p. 360–373, 2015.
- TERASHIMA, I.; FUJITA, T.; INOUE, T.; CHOW, W. S.; OGUCHI, i. Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light: Revisiting the enigmatic question of why leaves are green. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 4, p. 684–697, 2009.
- VILLÉN, J.; GYGI, S. P. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 3, n. 10, p. 1638, 2008.
- VOGELMANN, T. C.; EVANS, J. R. Profiles of light absorption and chlorophyll within spinach leaves from chlorophyll fluorescence. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 1313–1323, 2002.
- VOGELMANN, T. C. Plant tissue optics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 231–251, 1993.
- WANG, Y.; FOLTA, K. M. Contributions of green light to plant growth and development. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 1, p. 70–78, 2013.
- WOOD, W. H. J.; BARNETT, S. F. H.; FLANNERY, S.; HUNTER, C. N.; JOHNSON, M. P. Dynamic thylakoid stacking is regulated by LHCII phosphorylation but not its interaction with PSI. **Plant Physiology**, v. 180, n. 4, p. 2152–2166, 2019.
- YAMAMOTO, Y.; KAI, S.; OHNISHI, A.; TSUMURA, N.; ISHIKAWA, T.; HORI, H.; MORITA, N.; ISHIKAWA, Y. Quality control of PSII: Behavior of PSII in the highly crowded grana thylakoids under excessive light. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, p. 1206–1215, 2014.
- YANG, X.; XU, H.; SHAO, L.; LI, T.; WANG, Y.; WANG, R. Response of photosynthetic capacity of tomato leaves to different LED light wavelength. **Environmental and Experimental Botany**, v. 150, p. 161–171, 2018.
- YEATES, A. M.; ZUBKO, M. K.; RUBAN, A. V. Absence of photosynthetic state transitions in alien chloroplasts. **Planta**, v. 250, n. 2, p. 589–601, 2019.
- ZEIGER, E.; HEPLER, P. K. Light and stomatal function: Blue light stimulates swelling of guard cell protoplasts. **Science**, v. 196, p. 887–889, 1977.
- ZHANG, T.; FOLTA, K. M. Green light signaling and adaptive response. **Plant Signaling and Behavior**, v. 7, n. 1, p. 1–4, 2012.