

DIEGO MARTINS CARRETERO

Efeitos da inibição da protoporfirinogênio IX oxidase sobre as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill)

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*

Viçosa
Minas Gerais – Brasil
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C315e
2008

Carretero, Diego Martins, 1983-

Efeitos da inibição da protoporfirinogênio IX oxidase sobre as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em plantas de sojas (*Glycine max* L. Merrill) / Diego Martins Carretero. – Viçosa, MG, 2008.
xi, 57f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Marco Antônio Oliva Cano.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 44-52.

1. Stress (Fisiologia). 2. Fotossíntese. 3. Fluorescência.
4. Clorofila. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.2

DIEGO MARTINS CARRETERO

Efeitos da inibição da protoporfirinogênio IX oxidase sobre as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill)

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*

Aprovada: 15 de setembro de 2008

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva
(Co-orientador)

Prof. Rogério Ferreira Ribas

Prof^a. Andréa Miyasaka de Almeida

Dr^a. Kacilda Naomi Kuki

Prof. Marco Antônio Oliva Cano
(Orientador)

*A Deus pelo dom da vida...
Aos meus pais e irmãos pelo amor incondicional...
A Michele por sempre estar ao meu lado....
Dedico*

*“Combati o bom combate,
Completei a corrida,
Quardei a fé...”*

São Paulo (II Timóteo 4:7)

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo amor e apoio constante durante mais essa fase importante de minha vida; e à Michele pelo companheirismo, dedicação, apoio e por estar sempre ao meu lado, dando forças para superar as dificuldades encontradas no caminho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela estrutura para a execução deste trabalho.

Ao Professor Marco Antônio Oliva Cano pelo acolhimento, estímulo, confiança e orientação constantes durante a concepção e execução deste trabalho.

Ao Professor Rogério Ribas da Universidade Federal da Bahia, pelo apoio, idéias, sugestões e principalmente pela amizade durante o período de convivência em Viçosa.

Aos Professores Marco Aurélio, Andréa Miyasaka e Kacilda Kuki, pela amizade, conselhos e pelos valiosos comentários que enriqueceram sobremaneira o trabalho realizado.

Ao Professor Gil Miguel de Souza Câmara do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ-USP, por ceder o inibidor sintético e também pela amizade, pelos conselhos, confiança e por ter contribuído em minha iniciação na área de produção de soja.

Aos amigos André Zabini (Tche), Fábio Baiano e Alfredo pela valiosa amizade, pelo apoio e por dividirem tantos momentos bons e difíceis durante meu período em Viçosa.

Aos amigos Eduardo Gusmão e Rogério Gomide pelo auxílio incondicional oferecido para a execução de parte fundamental da pesquisa, pelo acolhimento e pelos momentos divertidos, feijoadas, vaca atoladas e canjiquinhas de fim de semana.

À equipe do UCP, Clenilson, Claudio, Leticia 1, Leticia 2 (Doida), Leticia 3 (Loira), Vivi, Advânio, Simone, Laizão, Pitt, Elisa, Claudinéia, Maione, Diego Xará, Patrícia, Alice e João Bosco pelos bons momentos e pela amizade conquistada em tão pouco tempo de convivência.

A Carol Mulher e Thales pelo acolhimento de minha família em sua casa nas vésperas da defesa, pela amizade, e pelo auxílio na realização dos trabalhos e avaliação dos experimentos.

Ao pessoal da Biologia Molecular, em especial Danilão e Valdir Diola pelas brincadeiras, conversas e sugestões durante o curso; e aos colegas de turma e amigos Clarice, Tereza, Gisele, Carla, Werner, Eduardo, Franciscleudo, Matheus, Zico, Vinícius, Ziley, Japa e Carlos.

Ao pessoal do Grupo Café: Samuca, PC, Ricardo, Kelly, Fábio RU, Prof Fábio, Gustavo, Nelson, Marcelo Pompeli, Karine, Roberto e Waguinho pela oportunidade de aprendizado, amizade e convivência no período inicial do mestrado.

Aos colaboradores e amigos Reginaldo, Oswaldo, Zé Maria, Zé Antônio, Carlos Raimundo, Cássia, Luciene e Ângelo pelo auxílio durante o curso em todas as suas etapas.

Ao pessoal do DZO da Zootecnia, ao pessoal do MT (Biro, Juninho, Socó, Kiko, Zé Cabeção, Chico Cadela, Faustino) e à Fundação MT (Leandro e Joel).

Finalmente, à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro na forma de bolsa.

BIOGRAFIA

Diego Martins Carretero nasceu a 10 de maio de 1983 em Campinas, SP. Concluiu o curso de Graduação em Engenharia Agrônômica pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queriroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP) em 12 de janeiro de 2006. Realizou estágio profissionalizante entre maio de 2005 e janeiro de 2006 em propriedade agrícola no município de Itiquira - MT, trabalhando na mesma como Engenheiro Agrônomo a partir de janeiro de 2006, o qual atuou na área de produção de soja, gestão de custos de produção e manejo técnico da lavoura. Em outubro de 2006 iniciou o curso de Mestrado na Universidade Federal de Viçosa, dentro do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	05
3. 1. Condições de Cultivos.....	05
3. 2. Aplicação dos Tratamentos.....	05
3. 3. Inibidor Sintético.....	06
3. 4. Critérios Fisiológicos para Classificação de Folhas.....	06
3. 5. Parâmetros Avaliados.....	06
3. 5. 1. Determinação das Trocas Gasosas.....	06
3. 5. 2. Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	08
3. 5. 3. Imagem da Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	08
3. 5. 4. Determinações de Pigmentos Cloroplastídicos.....	10
3. 5. 5. Determinações do Extravasamento de Eletrólitos.....	10
3. 6. Modelos e Análises Estatísticas.....	10
4. RESULTADOS.....	13
4. 1. Teor de Pigmentos e Permeabilidade de Membranas.....	13
4. 2. Parâmetros de Trocas Gasosas.....	15
4. 3. Parâmetros de Fluorescência.....	23
5. DISCUSSÃO.....	33
5. 1. Ação da Inibição da PROTOX em Folhas Novas e Maduras.....	33
5. 2. Efeitos na Concentração dos Pigmentos e na Integridade das Membranas.....	35
5. 3. Efeitos nas Trocas Gasosas e Fotorrespiração.....	36
5. 4. Efeitos na Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	40
5. 5. Efeitos na Imagem da Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	41
6. CONCLUSÕES.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

NOMENCLATURA E ABREVIACÕES

<i>A</i>	Taxa de assimilao fotossintética líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
ABA	cido abscísico
Abs	Absorbância foliar
A_{maxCO_2}	Taxa fotossintética máxima saturada por CO_2 , obtido por regressão ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
A_{maxPAR}	Taxa fotossintética máxima saturada pela luz, obtido por regressão ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
C_a	Concentrao de CO_2 atmosférica ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$)
C_i	Concentrao de CO_2 nos espaços intercelulares ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$)
Cl (<i>a ; b</i>)	Clorofila <i>a</i> ; Clorofila <i>b</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E</i>	Taxa de transpirao ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
<i>ETR</i>	Taxa de transporte de elétrons; obtido por fluorescência ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no FS II)
ETR_{max}	Taxa de transporte de elétrons máxima estimada; obtido por regressão ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
<i>F</i>	Fluorescência (equilíbrio) em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturao
F_m	Fluorescência máxima em amostra adaptada ao escuro
F_m'	Fluorescência máxima, em amostra adaptada  irradiância
FMC	Folha madura controle
FMT	Folha madura tratada
FNC	Folha nova controle
FNT	Folha nova tratada
F_o	Fluorescência mínima, quando os centros de reao do FSII estão oxidados (escuro)
F_o'	Fluorescência mínima estimada, quando os centros de reao do FSII estão reduzidos
FSI	Fotossistema I
FSII	Fotossistema II
F_v/F_m oxidados	Rendimento quântico máximo potencial do FS II, quando os centros de reao estão oxidados
g_s	Condutância estomática ao vapor de água ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
Inh	Porcentagem de inibio relativa do FSII

J_c	Taxa de transporte de elétrons para atividade carboxilativa da Rubisco ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
J_{max}	Taxa máxima de transporte de elétrons para regeneração da Rubisco ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
J_o	Taxa de transporte de elétrons para atividade oxigenativa da Rubisco ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
J_t	Taxa total de transporte de elétrons estimado para à A e fotorespiração ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
L_m	Limitação mesofílica da fotossíntese (%)
L_s	Limitação estomática relativa da fotossíntese (%)
NPQ	Coefficiente de dissipação não-regulada de energia do FSII
PAR	Fluxo de fótons fotossinteticamente ativos ($\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
PROTOX	Protoporfirinogênio IX oxidase
qP	Coefficiente de extinção fotoquímico
R_1	Taxa fotorrespiratória estimada ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
R_d	Taxa de respiração estimada (intercepto-y de A/PAR) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
R_{dm}	Taxa de respiração mitocondrial no escuro ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
ROS	Espécie reativa de oxigênio ($^1\text{O}_2$)
Rubisco	Carboxilase / oxigenase da ribulose 1,5-bisfosfato
RPD	Regiões Pré-Determinadas na imagem da fluorescência (A1, A2, A3, A4 e AC)
$V_{c,\text{max}}$	Taxa de carboxilação máxima pela Rubisco saturada por substrato ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Y(NO)	Rendimento quântico de dissipação não-regulada de energia do FSII
Y(NPQ)	Rendimento quântico de dissipação regulada de energia do FSII
α	Rendimento quântico aparente de assimilação fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{mmol}^{-1} \text{fótons}$)
Γ_{CO_2}	Ponto de compensação de CO_2 (intercepto-x de A/C_i) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1} \text{ar}$)
Γ_{PAR}	Ponto de compensação luminoso (intercepto-x de A/PAR) ($\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
$\Delta F/F_m'$	Rendimento quântico efetivo do FSII, quando os centros de reação estão reduzidos
$\Delta F/F_m'_{\text{max}}$	Rendimento quântico efetivo máximo do FSII sob luz saturante, obtido por regressão
Φ_e	Rendimento quântico máximo do fluxo de elétrons linear através do FSII (inclinação da reta - ETR/PAR)
κ	Taxa de crescimento em função da irradiância (inclinação da reta na curva ETR/PAR)

Resumo

CARRETERO, Diego Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Setembro de 2008.

Efeitos da inibição da protoporfirinogênio IX oxidase sobre as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill). Orientador: Marco Antônio Oliva Cano. Co-orientadores: Marco Aurélio Pedron Silva e Marília Contrin Ventrella

A fixação fotossintética do CO₂ depende da captação de energia luminosa por pigmentos-antena (clorofila *b* e carotenóides) e os quais transferem a energia de excitação para os centros de reação dos fotossistemas (clorofila *a*), gerando poder redutor necessário para a fixação de CO₂ no ciclo de Calvin. A integridade das moléculas de clorofila *a* (Cl *a*) pode ser afetada por diversos estressores ambientais, tais como deficiência hídrica e nutricional, excesso de luz, poluentes ou inibidores sintéticos. Os efeitos da inibição da síntese de clorofila, utilizando inibidores sintéticos, nos parâmetros fisiológicos em folhas de diferentes estádios de maturação em plantas superiores são pouco conhecidos. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do lactofen, cujo mecanismo de ação é a inibição da enzima protoporfirinogênio IX oxidase (PROTOX), mediante determinações de trocas gasosas, fluorescência e imagem de fluorescência da clorofila *a*, integridade de membranas e síntese de clorofilas. Plantas de soja foram submetidas a pulverizações de lactofen, e folhas novas e maduras avaliadas após expostas a diversos períodos de irradiância acumulada (3, 6, 12, 24 e 48 horas). Foi observado que o lactofen apresenta efeitos relacionados ao tempo de exposição à luz. Nas primeiras horas após aplicação, observou-se um aumento do estresse oxidativo, afetando a permeabilidade das membranas e a condutância estomática. As folhas novas controle (FNC) apresentaram incrementos significativos no teor de Cl *a* ao final de 48 horas de luz em relação a 3 horas, porém os parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila não diferiram significativamente da folha madura controle (FMC). Para a folha nova tratada (FNT), após 6 horas acumuladas de luz, foram observadas reduções na taxa de assimilação fotossintética líquida (*A*), na condutância estomática (*g_s*) e na taxa transpiratória (*E*) concomitantemente a um aumento no extravasamento de eletrólitos, sem reduções significativas nos teores de clorofilas, quando comparados ao controle no mesmo período. Na folha madura tratada (FMT) não foram observadas reduções significativas nas trocas gasosas. Para avaliar os efeitos de limitações metabólicas e difusivas do CO₂, após 12 horas de exposição à luz, variações das taxas de assimilação fotossintética em diferentes concentrações internas de CO₂ (curva *A/C_i*) e em diferentes intensidades luminosas (curva *A/PAR*) foram determinadas.

Apenas para a FNT foram observadas diferenças significativas em relação ao controle nas variáveis: taxa máxima de fotossíntese saturada por CO₂ ($A_{\max\text{CO}_2}$) e por luz ($A_{\max\text{PAR}}$), a taxa de carboxilação máxima realizada pela Rubisco ($V_{c,\max}$), a taxa de transporte de elétrons para sua regeneração (J_{\max}) e o rendimento quântico aparente de assimilação fotossintética (α), concomitantes ao aumento no ponto de compensação de CO₂ (Γ_{CO_2}) e de luz (Γ_{PAR}) e na limitação estomática (L_s) e mesofílica (L_m). A aplicação de lactofen incrementou a taxa fotorrespiratória (R_1) e a taxa de transporte de elétrons para fotorrespiração (J_0) nas folhas maduras tratadas comparadas ao controle. Com relação aos parâmetros de fluorescência da clorofila a , o rendimento quântico potencial e o efetivo do FSII (F_v/F_m e $\Delta F/F_m'$), assim como a taxa de transporte de elétrons (ETR) reduziram, após 6 horas acumuladas de luz, para a FNT com relação ao controle, enquanto que na fluorescência mínima (F_0), foram observadas incrementos no mesmo período. Após 48 horas de luz, foram observados incrementos em F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$ e ETR , concomitante ao decréscimo de F_0 na FNT. Com a utilização de imagens da fluorescência foi possível observar a diferença de sinal emitido entre as regiões afetadas e não afetadas na mesma FNT. Assim, regiões afetadas após 48 horas de luz apresentaram reduções no F_v/F_m , F_0 , $\Delta F/F_m'$, ETR , bem como no rendimento quântico de dissipação regulado de energia no FSII ($Y(\text{NPQ})$) e no coeficiente de extinção fotoquímico (qP), concomitante a incrementos no rendimento quântico de dissipação não-regulado de energia no FSII ($Y(\text{NO})$). As regiões da FNT que não foram atingidas pelo lactofen não apresentaram os efeitos da inibição da PROTOX, apresentando sua maquinaria fotossintética intacta. Quando os valores obtidos nas imagens de fluorescência foram analisados em função da porcentagem de área na superfície foliar, foram observados incrementos de áreas apresentando baixa absorvância ($>0,11$), à medida que incrementava as horas acumuladas de luz, na FNT. Comportamento semelhante foi observado para os parâmetros F_v/F_m , F_0 , $\Delta F/F_m'$ e qP , aumentando a porcentagem de superfície foliar na FNT incapaz de realizar fotossíntese. A aplicação do lactofen em folhas de soja inibe a síntese de clorofila, induz o estresse oxidativo, causa danos na maquinaria fotossintética, reduzindo A e o funcionamento estomático ao nível de trocas gasosas, sendo o efeito mais pronunciado em folhas novas comparadas às folhas maduras.

Abstract

CARRETERO, Diego Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September of 2008.

Effects of inhibition of protoporphyrinogen oxidase IX on gas exchange and chlorophyll fluorescence of soybean plants (*Glycine max* L. Merrill). Adviser: Marco Antônio Oliva Cano. Co-Advisers: Marco Aurélio Pedron Silva and Marília Contrin Ventrella

The photosynthetic fixation of CO₂ depends on the capture of light energy by the harvest complex (chlorophyll *b* and carotenoids), which transfer the energy to the photosystems' reaction centers (chlorophyll *a*). The electrons transfer chain established between the photosystems generates reducing power necessary for the CO₂ fixation in the Calvin cycle. The integrity of the chlorophyll *a* molecules (Chl *a*) may be affected by several environmental stressors, such as water shortage, nutrient deficiency, excess of light, pollutants or synthetic inhibitors. The effects of the chlorophyll synthesis inhibition, by synthetic inhibitors, in the physiological parameters of leaves in different stages of maturation are poorly understood. This research aimed to analyze the effect of lactofen, whose mechanism of action is the inhibition of the enzyme protoporphyrinogen IX oxidase (PROTOX), by measurements on gas exchange, fluorescence of chlorophyll *a*, chlorophyll, fluorescence image, integrity of membranes and synthesis of chlorophyll. Lactofen was applied to soybean plants at V6 stage. Then, the plants were exposed to different periods of irradiance accumulation (3, 6, 12, 24 and 48 hours). At the end of each period new and mature leaves were evaluated. It was observed that the lactofen effects were related to the duration of light exposure. In the first hours after the application, we observed an increase in oxidative stress, which affected membrane permeability and stomatal conductance. The chlorophyll *a* content in the young leaves, of the control treatment plants (FNC), increased significantly after 48 hours of light exposure when compared to those at the beginning of the light exposure. However the parameters of gas exchange and chlorophyll fluorescence leaves did not differ significantly from the mature control leaves (FMC). For the young treated leaves (FNT), exposed to 6 hours of light, reductions in net photosynthetic rate of assimilation (*A*) in stomatal conductance (*g_s*) and the rate transpiratory (*E*) were observed concomitantly with an increase in the electrolytes leakage. However no significant reduction in chlorophyll *a* content was detected, as compared to the control, over the same period of light exposure. In mature treated leaves (FMT) not significant reductions in gas exchange parameters were observed. To evaluate the effects of metabolic and CO₂ diffusion limitations, the net assimilation rate was analyzed under different CO₂ internal concentrations (*A/C_i* curve) and different light intensity

(A/PAR curve), on plants exposed to lactofen, and after 12 hours of light exposure. Significant differences were only observed in the FNT, in relation to control, for the following variables: maximum rate of photosynthesis saturated by CO_2 (A_{maxCO_2}) and light (A_{maxPAR}), the maximum rate of carboxylation held by Rubisco ($V_{c, max}$), the transport electrons rate for its regeneration (J_{max}) and the apparent quantum yield of photosynthetic assimilation (α), the concomitant increase in the compensation points of CO_2 (Γ_{CO_2}) and light (Γ_{PAR}) and limitations of stomatal (L_s) and mesophilic (L_m) components. In mature treated leaves, compared to the control leaves, the application of lactofen increased the photorespiratory rate (R_1) and the rate of electrons transmission to photorespiration (Jo). For FNT it was observed that the parameters of the chlorophyll fluorescence, quantum yield of dark-adapted samples (F_v/F_m), effective PS II quantum yield of illuminated samples ($\Delta F/F_m'$) and the rate electron transports (ETR) reduced after 6 hours of light FNT, while the minimum fluorescence (F_o) increased in the same period. The values of F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$ and ETR in the FNT, after 48 hours of light, increased significantly, while F_o decreased. With the obtained fluorescence images it was possible to detected signal differences between the affected and not affected regions, in the same FNT. Thus, affected regions after 48 accumulated hours of light, showed reductions in F_v/F_m , F_o , $\Delta F/F_m'$, ETR , quantum yield of regulated non-photochemical energy loss in PS II ($Y(NPQ)$) and photochemical quenching (qP), with concomitant increase in the quantum yield of non-regulated non-photochemical energy loss in PS II ($Y(NO)$). The regions of FNT not affected by lactofen did not show the effect of PROTOX inhibition, probably because their photosynthetic machinery remained intact. When the figures obtained on the fluorescence images were analyzed according to the percentage of surface leaf area, increases were observed in areas presenting low absorbance (> 0.11), as they increased the accumulated hours of light in the FNT. Similar behavior was observed for the parameters F_v/F_m , F_o , $\Delta F/F_m'$, and qP , increasing the percentage of leaf surface in FNT unable to perform photosynthesis. The use of lactofen, especially in young soybean leaves inhibits the synthesis of chlorophyll, induces oxidative stress, causes damage in the photosynthetic machinery, reduces A and g_s .

1. INTRODUÇÃO

Pigmentos fotossintéticos, como a clorofila *a*, são utilizados pelas plantas para capturar a energia luminosa, produzindo poder redutor para o processo de fixação e assimilação do CO₂ no ciclo de Calvin. Quando a absorção de luz pelos pigmentos torna-se excedente à capacidade de uso para produção de NADPH e ATP (na síntese de carboidratos), sobrecarregando os mecanismos de dissipação de energia, a fotossíntese é progressivamente inibida, ocorrendo destruição dos pigmentos (foto-oxidação) caso a condição adversa prolongar-se. Diversos agentes estressores (bióticos e abióticos) diminuem a concentração de clorofila *a* nos tecidos fotossintéticos, tanto pelo aumento da degradação (senescência) quanto pela inibição da biosíntese (Gan, 2007). Deficiência de nutrientes (N e Mg), ataque de pragas e doenças, estresse hídrico, estresse luminoso e ozônio são exemplos de agentes estressores capazes de reduzir a capacidade de utilização da luz pelas plantas (Chapin, et al., 1987; Marschner, 1995; Schoonhoven et al., 2005). Dentre os estressores abióticos, importantes compostos sintéticos, utilizados como herbicidas, atuam na inibição da síntese de clorofilas na porção porfirínica, principal local de atuação dos “inibidores fotodinâmicos” (Rebeiz et al, 1984; Halling & Peters, 1987; Matringe & Scala, 1987; Lydon & Duke, 1988; Wakabayashi & Boger, 1999). Estes compostos agem por meio da inibição de uma enzima comum entre as vias de síntese de clorofila e citocromos (Matringe et al., 1989), o que resulta em acúmulo de intermediários tetrapirrólicos, paralisando a formação do pigmento (Witkowski & Halling, 1989; Matringe et al., 1989). Diversos estudos têm sido conduzidos para a caracterização dos efeitos gerados por estes inibidores nos parâmetros fisiológicos (Kim et al., 1999; Frankart et al, 2003; Tripathy et al, 2007; Jung et al., 2008), porém, informações sobre as taxas fotossintéticas, parâmetros de fluorescência e eficiência fotoquímica são escassas em estudos utilizando plantas intactas.

Na maquinaria fotossintética, a luz é absorvida por complexo-antenas (clorofila *b* e carotenóides) e a energia de excitação é transferida para os centros de reação dos fotossistemas I (FSI) e II (FSII), o qual a clorofila *a* é parte constituinte dos fotossistemas. Clorofilas são compostos tetrapirrólicos macrocíclicos, contendo Mg no centro da molécula e uma cadeia de fitol no anel D. Além das clorofilas, moléculas como heme, siroheme e fitocromobilina são exemplos de outros compostos tetrapirrólicos importantes para as plantas. A biosíntese destes compostos é realizada nos plastídios, por meio da ligação de várias moléculas simples, finamente coordenada por ação enzimática (von Wettstein et al., 1995). A síntese de clorofila inicia com a condensação de duas moléculas de ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA) (Figura 1), oriundas do glutamato, formando um anel pirrólico (porfobilinogênio). As etapas

compreendidas do glutamato até a obtenção da uroporfirinogênio III são comuns à biosíntese de todos os tetrapirrólicos nas plantas superiores. O uroporfirinogênio III e a maioria dos intermediários subseqüentes na via biosintética são fotossensíveis e potenciais geradores de oxigênio singlete (Tanaka & Tanaka, 2007).

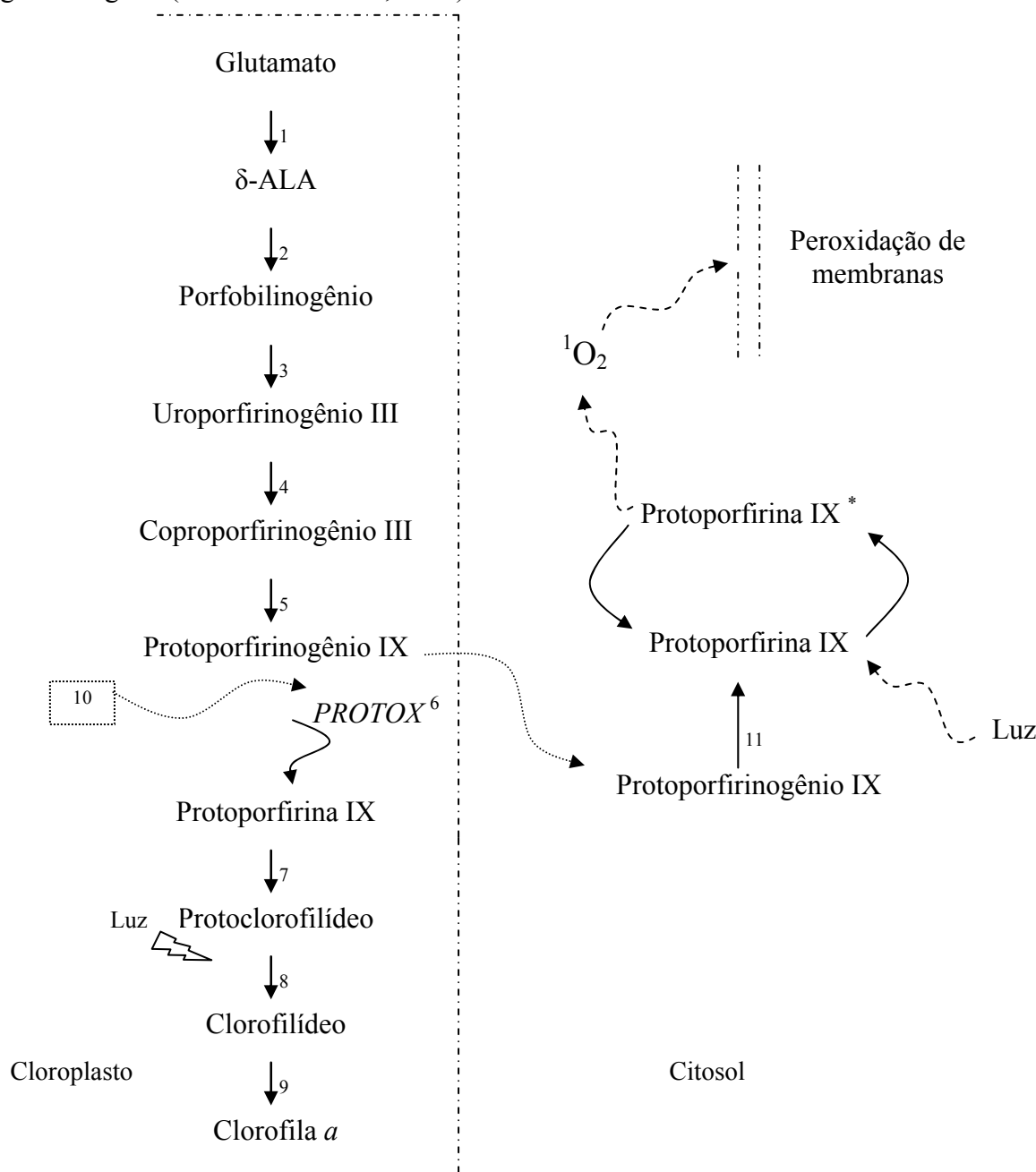


Figura 1 - Ação de inibidores da PROTOX na rota biosintética da clorofila. (1) Glutamato é convertido a glutamato 1-semialdeído (GSA) pela glutamil-tRNA redutase e para δ-ácido aminoluvulínico (δ-ALA), pela ação da GSA aminotransferase; (2) Duas moléculas de δ-ALA são condensadas para porfobilinogênio (PBG) pela δ-ALA desidratase; (3) Quatro moléculas de PBG formam uroporfirinogênio pela PBG deaminase; (4 e 5) Reações de descarboxilação; (6) Retirada de 6 elétrons no processo de oxidação pela protoporfirinogênio IX oxidase (PROTOX); (7) Adição de Mg pela Mg-quelatase; adição de oxigênio pela Mg-protoporfirina IX monometil ester ciclase; (8) Redução do anel D pela protoclorofilídeo oxidoreductase, reação dependente de luz; (9) Adição de fitol (cadeia) pela clorofila sintase; (10) Com a inibição da PROTOX, o protoporfirinogênio IX se acumula no cloroplasto e transloca-se para o citosol; (11) A protoporfirina IX é oxidada por uma enzima citosólica insensível ao inibidor da PROTOX. Sob influência da luz e fora do cloroplasto a protoporfirina IX se excitará, gerando uma molécula instável (protoporfirina IX*), que ao voltar para seu estado redox normal libera energia e forma oxigênio singlete (¹O₂) pelo rearranjo de spins eletrônicos, desencadeando a peroxidação dos lipídeos de membrana (adaptado de von Wettstein et al., 1995; e Jacobs et al., 1991).

Os três passos subseqüentes (da uroporfirinogênio III até protoporfirina IX) são comuns para síntese de clorofila, heme e fitocromobilina; daí em diante as etapas são únicas para cada composto. A reação do anel D do protoclorofilídeo é dependente de luz nas angiospermas, razão pela qual se observa acúmulo de protoclorofilídeo em plantas crescidas no escuro. Finalmente, clorofilídeo *a* é esterificado com uma cadeia correspondente de fitol (fitol-pirofosfato) resultando na formação da clorofila *a* (von Wettstein et al., 1995; Adamson et al., 1997; Tanaka & Tanaka, 2007). Esta seqüência de reações para a biosíntese da clorofila é a mais aceita na literatura, sendo uma via unilateral. Porém, alguns autores propuseram a existência de múltiplas rotas alternativas para formação de clorofila *a* e *b* (Rebeiz et al, 1981; 1999; Rebeiz, 2002).

A protoporfirinogênio IX oxidase (PROTOX, EC 1.3.3.4) é uma enzima localizada na membrana interna do envelope do cloroplasto, responsável pela oxidação da protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX, estabelecendo um sistema conjugado de duplas ligações. Compostos como difenil-éteres, triazolinonas, n-fenil-ftalimidas e oxadiazol são exemplos de grupos químicos inibidores desta enzima (Wakabayashi & Boger, 1999; Roman, 2007). Com a inibição da PROTOX (Figura 1; etapa 10), a protoporfirinogênio IX se acumula no cloroplasto e difunde-se para o citosol, onde sofre uma auto-oxidação, convertendo-se a protoporfirina IX por ação de uma enzima citosólica insensível ao inibidor (Jacobs et al., 1991). A protoporfirina IX fora do seu centro de reação (para formação de Mg-protoporfirina IX), interage com oxigênio molecular e luz, formando oxigênio singleto (1O_2), uma espécie reativa de oxigênio (ROS), que, por sua vez, desencadeiam processos oxidativos como a peroxidação de lipídeos das membranas (Duke & Kenyon, 1986; Jacobs et al., 1991; Jacobs & Jacobs, 1993; Hess, 2000; Christoffoleti, 2004; Romam, 2007, Tripathy et al., 2007). Um rápido acúmulo de protoporfirina IX sugere algum tipo de desregulação da via biosintética, atuando como uma bomba de ROS e acelerando o processo de estresse oxidativo. Esses inibidores interferem também na síntese do grupo heme (precursor de citocromos) conhecidamente responsável pelo controle do ácido 5- aminolevulínico (δ -ALA), precursor da porfirina a partir do glutamato (Stobart et al., 1984; von Wettstein et al., 1995).

A seletividade de plantas à ação de inibidores fotodinâmicos sintéticos é devida à capacidade de acúmulo de intermediários tetrapirrólicos em diferentes tecidos e o possível funcionamento das diversas rotas biosintéticas da clorofila (Rebeiz et al., 1984), sendo que plantas que acumulam intermediários tetrapirrólicos nas folhas e no caule são sensíveis do que aquelas que acumulam apenas nas folhas. Após o acúmulo e exportação de protoporfirinogênio IX, do cloroplasto para o citosol, devido à inibição da PROTOX, esse composto pode ser degradado em ambiente extraplastídico, prevenindo o acúmulo de

protoporfirina IX e a formação de ROS (Jacobs et al., 1996). Os mesmos autores sugerem que o mecanismo de degradação da protoporfirinogênio IX e o processo de quebra da clorofila possuem uma parte em comum, pois, para uma mesma espécie, folhas amareladas possuem maior tolerância a estes inibidores do que folhas verdes.

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é considerada uma planta tolerante aos inibidores da PROTOX, pois não observam-se redução de produtividade final em grãos (Wichert & Talbert, 1993); entretanto, apresenta um intenso estresse oxidativo nas folhas quando tratadas com essa classe de inibidores. Rebeiz et al. (1984) e Mostowska (1999) sugerem que a seletividade da soja é devido ao acúmulo de tetrapirrólis apenas nas folhas (não afetando o caule e os meristemas, recuperando-se pela formação de folhas novas saudáveis); e também devido a uma via alternativa biosintética da clorofila, acumulando monovinil-protoclorofilídeo à noite e o divinil-clorofilídeo durante o dia (rota MV escuro/ DV claro), conferindo uma maior flexibilidade comparada com plantas sensíveis.

Os efeitos de inibidores da síntese de clorofila sobre as taxas fotossintéticas, parâmetros de fluorescência, degradação de pigmentos, liberação de etano e extravasamento de eletrólitos são citados na literatura, em diferentes sistemas (Fedtke, 1979; Pallett & Dodge, 1980; York et al., 1981; Ahrens et al., 1981; Yang & Bingham, 1984; Sherman et al., 1991; González-Moro et al., 1997; Graham, 2005; Tripathy, et al., 2007; Jung, et al., 2008). De modo geral, todos os efeitos observados foram causados pela geração de $^1\text{O}_2$ e conseqüente peroxidação de membranas, o que afeta a estrutura e a funcionalidade da maquinaria fotossintética, inativando os centros de reação do FSII e FSI (Tripathy et al., 2007). O enrugamento e manchas verde-escuras no tecido foliar progridem para uma coloração vermelho-alaranjada e o coalescimento das manchas devido à desidratação do tecido levam a necroses, paralisando o crescimento (Roman, 2007). Porém, pouco se sabem dos efeitos na inibição da síntese de clorofila sobre as taxas fotossintéticas, parâmetros de fluorescência e degradação de pigmentos em folhas intactas em plantas superiores.

2. OBJETIVOS

1. Avaliar os efeitos do inibidor da enzima PROTOX (lactofen (1'-(carboetoxi) etil 5-(2-cloro-4-(trifluoro-metil) fenoxi) - 2 - nitrobenzoato)) em folhas de soja, mediante determinações de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, integridade de membranas e síntese de clorofilas.

2. Avaliar os efeitos do lactofen em função do tempo de exposição à intensidade luminosa constante, e observar qual o parâmetro fisiológico primeiramente afetado sob uma condição de baixa irradiância ($300 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

3. Avaliar as respostas da aplicação de lactofen em folhas de soja com diferentes idades de desenvolvimento (novas e maduras), em plantas apresentando-se no estágio fenológico V6.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Condições de cultivo

O experimento foi realizado na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) da Universidade Federal de Viçosa, no período de março/maio de 2008. Foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill) da cultivar MG/BR 46 (Conquista), cujas sementes foram fornecidas pelo Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberaba (ICIAG/UFU), da safra 2007/08. As sementes foram tratadas com fungicida sistêmico (Derosal[®] Plus) e inoculante líquido contendo *Bradyrhizobium japonicum*, na dosagem de 200 mL p.c./100 Kg de semente, e semeadas duas por vaso, eliminando posteriormente a plântula menos vigorosa. As plantas foram cultivadas em vasos de três litros contendo solo na proporção 1:3:2 de areia:argila:esterco, o qual foi mantido próximo à capacidade de campo. Solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Aron, 1938) a meia força foi adicionada semanalmente. O manejo fitossanitário das plantas foi realizado com fungicidas e inseticidas recomendados para a cultura da soja.

3.2 - Aplicação dos tratamentos

As aplicações foliares do inibidor foram realizadas à noite, dentro de uma estrutura especialmente montada para evitar efeito de vento e deriva do produto, utilizando-se de um pulverizador costal (Jacto *Versatili* de 20 litros) munido de uma válvula de pressão constante na ponta da barra (pressão: 2kgf.cm^{-1}), com dois bicos tipo leque (XR Teejet 110 02 VK), espaçados em 50 cm. No momento da aplicação foram mantidos constantes: altura da barra em relação às plantas (60 cm) e a velocidade de aplicação ($0,93 \text{ m.s}^{-1}$). Para obtenção dos controles, um folíolo de cada folha foi protegido com papel alumínio no momento da aplicação. Para as avaliações, as plantas foram colocadas no escuro numa câmara de crescimento, durante aproximadamente 10 horas, com temperatura constante. Após este tempo foi aplicada radiação de $300 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 5 dias, com um fotoperíodo

de 11 horas e temperatura de 25°C. Os parâmetros fisiológicos foram determinados após 3, 6, 12, 24 e 48 horas de exposição à luz (horas acumuladas).

3.3 - Inibidor Sintético

Foi utilizado o herbicida lactofen, pertencente ao grupo químico dos difenil-éteres, cujo ingrediente ativo é o 1'-(carboetoxi) etil 5-(2-cloro-4-(trifluoro-metil) fenoxi) - 2 - nitrobenzoato, conhecido comercialmente como Cobra[®], sendo um herbicida de contato e de ação pós-emergente da soja, para controle de várias plantas daninhas (Almeida & Rodrigues, 1988). A dosagem utilizada foi correspondente a 0,5 L/ha (recomendação comercial).

3.4 - Critérios Fisiológicos para Classificação de Folhas

Para as avaliações, foram selecionadas as folhas do 4º e 5º nó caracterizando-as como, respectivamente, folhas maduras fisiologicamente (FM) e folhas novas (FN), em plantas de soja no estágio fenológico V6, segundo Fehr & Caviness (1977), aproximadamente 41 dias após emergência. Os critérios usados para essa discriminação foram que a FN estivesse totalmente expandida, porém imatura fisiologicamente, não apresentando acúmulo máximo de clorofila *a*; e que a FM estivesse totalmente expandida e madura fisiologicamente, não apresentando processos de senescência. Em experimentos preliminares com plantas de soja no estágio V6, foi determinado que o teor de clorofila *a* na FN foi menor que 31 µg.cm⁻², enquanto para a FM foi superior a 40 µg.cm⁻². Assim, o experimento apresentou o seguinte arranjo: folha madura controle (FMC); folha madura tratada (FMT); folha nova controle (FNC) e folha nova tratada (FNT).

3.5 - Parâmetros Avaliados

3.5.1 - Determinação das Trocas Gasosas

As trocas gasosas foram realizadas com sistema portátil de medição de fotossíntese, modelo LI-6400 (LI-COR Biosciences Inc., Lincon, Nebraska, USA) equipado com fonte de luz artificial 6400-02B RedBlue. Foram determinadas: a taxa de assimilação líquida de carbono (*A*), condutância estomática (*g_s*) e a taxa de transpiração (*E*). As medições foram realizadas com luz actínica (*PAR*) constante (300 µmol fótons m⁻² s⁻¹) e concentração atmosférica de CO₂ (*C_a*) e temperatura do ambiente (~ 390 µmol mol⁻¹ e 27°C ± 0,9; respectivamente). Os valores da concentração interna de CO₂ (*C_i*) foi calculada pelo equipamento, utilizando-se os valores de *A*, *g_s* e *E*, segundo von Caemmerer & Farquhar (1981). Para determinação da respiração mitocondrial (*R_{dm}*), um segundo grupo de plantas

tratadas e controle foram avaliados após adaptação ao escuro por 45 minutos, posteriormente determinadas as trocas gasosas sem a utilização de luz actínica.

Respostas de A em função da irradiância (curva de luz) foram realizadas em oito níveis de PAR (0, 50, 100, 200, 500, 750, 1000 e 1500 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em ordem decrescente, com intervalos de 2-3 minutos entre cada leitura; e dois n\u00edveis de CO_2 na c\u00e2mara (400 e 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Respostas de A em fun\u00e7\u00e3o de C_i (curva A/C_i) foram obtidas pela inje\u00e7\u00e3o de diferentes concentra\u00e7\u00f5es de CO_2 na c\u00e2mara, controladas automaticamente por um dispositivo injetor do LI-COR 6400 (6400-01 CO_2 injector; LI-COR, USA) utilizando-se cartuchos de 12g de CO_2 sob alta press\u00e3o. As medi\u00e7\u00f5es da curva A/C_i foram realizadas conforme Long & Bernacchi (2003), com algumas modifica\u00e7\u00f5es. As medi\u00e7\u00f5es foram realizadas em oito n\u00edveis de CO_2 (400, 200, 100, 50, 400, 800, 1000 e 1500 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), e dois n\u00edveis de irradi\u00e2ncia (300 e 1000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em intervalo de 3-4 minutos entre as leituras. Para ambas as curvas (A/PAR e A/C_i) a temperatura foi controlada (26°C) e o d\u00e9ficit de press\u00e3o de vapor (VPD) foi de $1,1 \pm 0,2$ kPa durante as medi\u00e7\u00f5es. A estima\u00e7\u00e3o da taxa m\u00e1xima de carboxila\u00e7\u00e3o ($V_{c,\text{max}}$) da enzima carboxilase/oxigenase da ribulose-1,5 bisfostato (Rubisco) e a taxa de transporte de el\u00e9trons dirigindo a regenera\u00e7\u00e3o da Rubisco (J_{max}) foram calculadas segundo Long & Bernacchi (2003) e Sharkey et. al. (2007), utilizando-se de par\u00e2metros de trocas gasosas, fluoresc\u00eancia e curva A/C_i . A limita\u00e7\u00e3o estom\u00e1tica relativa (L_s) tamb\u00e9m foi calculada da curva A/C_i , como $L_s = 100 \times (A_0 - A)/A_0$, onde A e A_0 s\u00e3o as taxas de assimila\u00e7\u00e3o fotossint\u00e9tica, respectivamente, no ambiente ($C_a = 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e a que poderia ocorrer se a resist\u00eancia de difus\u00e3o do CO_2 fosse zero (quando $C_i=C_a$) (Farquhar & Sharkey, 1982). A limita\u00e7\u00e3o mesof\u00edlica relativa (L_m) foi calculada como $L_m = 100 \times (A_c - A_t)/A_c$, onde A_c e A_t s\u00e3o as taxas fotossint\u00e9ticas sob CO_2 saturante ($C_i > 1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$) em folhas controle e tratadas, respectivamente (Jacob & Lawlor, 1991).

A fotorrespira\u00e7\u00e3o foi calculada segundo Valentini et al. (1995), pelos quais a taxa total de transporte de el\u00e9trons destinada para a fotoss\u00edntese e para fotorrespira\u00e7\u00e3o (J_t) \u00e9 dada por:

$$J_t = \Phi_e \cdot PAR$$

onde Φ_e representa o rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo do fluxo de el\u00e9trons linear atrav\u00e9s do FSII. Usando as equa\u00e7\u00f5es de Valentini et al. (1995), a parti\u00e7\u00e3o dos el\u00e9trons para fotoss\u00edntese (J_c) e para fotorrespira\u00e7\u00e3o (J_o), pode ser determinada como: $J_t = J_c + J_o$. Assumindo-se que s\u00e3o necess\u00e1rios quatro el\u00e9trons para fixar uma mol\u00e9cula de CO_2 via fotoss\u00edntese ($J_c = 4 (A + R_{\text{dm}} + R_1)$), e oito el\u00e9trons para liberar uma mol\u00e9cula de CO_2 via fotorrespira\u00e7\u00e3o ($J_o = 8R_1$), tem-se: $R_1 = ((J_t - 4 (A + R_{\text{dm}}))/12)$, onde R_{dm} e R_1 representam CO_2 liberado pela respira\u00e7\u00e3o mitocondrial e pela fotorrespira\u00e7\u00e3o, respectivamente.

3. 5. 2 - Fluorescência da Clorofila *a*

As variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram obtidas com um fluorômetro modulado Mini-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Na antemanhã, antes de cada fotoperíodo, foram determinadas a fluorescência mínima (F_0) com a excitação da área amostrada por uma luz vermelha modulada de baixa intensidade ($0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e a fluorescência máxima (F_m) obtida pela aplicação de um pulso de 0,8s de luz actínica saturante ($>6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Dos valores obtidos, foi determinado o rendimento quântico máximo do FSII ($F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$) segundo Kitajima & Buter (1975). Imediatamente após as medições de fotossíntese (exceto para curva A/C_i e A/PAR), outros parâmetros de fluorescência foram determinados na mesma região foliar utilizada para as determinações das trocas gasosas, aplicando-se iluminação actínica ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 45 s; ao final, foi aplicado um pulso de 0,8s de luz actínica saturante ($>6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para a determinação e cálculo das variáveis (Baker, 2008): fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F); fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F_m'); rendimento quântico efetivo no FSII ($\Delta F/F_m' = (F_m' - F)/F_m'$) segundo Genty et al, (1989). O $\Delta F/F_m'$ foi utilizado para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) de acordo com Bilger et al. (1995): $ETR = \Delta F/F_m' \times PAR \times 0,5 \times 0,84$, onde PAR é o fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha, 0,5 o valor correspondente à fração da energia de excitação distribuída para o FSII (Laisk e Loreto, 1996), e 0,84 o valor correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (Ehleringer, 1981). O coeficiente de extinção fotoquímico ($qP = (F_m' - F)/(F_m' - F_0')$) foi estimado segundo Genty et al (1989); e o coeficiente de extinção não-fotoquímico de Stern-Volmer ($NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$) foi estimado segundo Bilger & Björkmann (1990) e Kooten & Snel, (1990). Devido ao fato do fluorômetro utilizado não possuir uma fonte de luz vermelho-distante, necessária para a correta determinação do F_0' , essa variável foi estimada de acordo com o fator de aproximação de Oxborough e Baker (1997): $F_0' = F_0/(F_v/F_m + F_0/F_m')$ sendo a fluorescência mínima do tecido vegetal iluminado.

Curvas de luz também foram obtidas utilizando o referido fluorômetro, no qual a radiação fotossinteticamente ativa variou de 100 a 2000 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em oito níveis para determinação de ETR/PAR e $\Delta F/F_m'/PAR$. A partir dessas curvas foi possível estimar ETR_{max} , $\Delta F/F_m'_{\text{max}}$ e Φ_e (inclinação da curva ETR/PAR).

3. 5. 3 - Imagem da Fluorescência da Clorofila *a*

Imagens de fluorescência da clorofila *a* foram obtidas utilizando a versão Standard do fluorômetro modulado Imaging-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Plantas tratadas e controle foram mantidas no escuro por 30 minutos, e então, as folhas não destacadas foram

dispostas a uma distância fixa, sob um anel contendo 96 LEDs (*Light Emitting Diodes*) externos que emitiram luz actínica (azul) com comprimento de onda 470nm, na intensidade de $304 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com pulso de saturação de $2400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, antes e após dois minutos, para a determinação dos parâmetros. Outros 16 LEDs, dispostos na parte interna do anel, emitiram pulsos de luz modulada, com comprimento de onda em 650 nm (vermelho) e 780 nm (pr\u00f3ximo ao infra-vermelho) para determinação das absorb\u00eancias. Uma c\u00e2mera CCD (*charge-coupled device*) acoplada ao aparelho forneceu imagens para o computador, com resolu\u00e7\u00e3o de 640×480 pixels, com uma \u00e1rea amostral na folha de 30 x 20 mm. As imagens das vari\u00e1veis de fluoresc\u00eancia foram representadas com o aux\u00edlio de uma escala pr\u00e9-estabelecida de cores, de acordo com a intensidade dos par\u00e2metros, variando de preto (RBG 0 0 0) passando pelo vermelho, amarelo, verde, azul at\u00e9 magenta (RBG: 204 0 204), segundo o sistema de cores proposto por Munsell (1966).

Para an\u00e1lise dos valores de fluoresc\u00eancia na imagem, foram utilizados dois m\u00e9todos distintos de amostragem: (a) marca\u00e7\u00e3o de regi\u00f5es pr\u00e9-determinadas (RPD) (Figura 2a), e (b) porcentagem de \u00e1rea em intervalos de valores (%IV) (Figura 2b). Para o m\u00e9todo RPD, foram selecionadas quatro regi\u00f5es da FNT na por\u00e7\u00e3o central da imagem: A1 (sem sintomas), A2 (\u00e1rea de transi\u00e7\u00e3o), A3 (\u00e1rea afetada), A4 (\u00e1rea geral, abrangendo as A1, A2 e A3) e AC (\u00e1rea n\u00e3o afetada na planta controle). Para determina\u00e7\u00e3o da % IV, utilizou-se a op\u00e7\u00e3o de filtro no software *ImaginWin*, no qual a \u00e1rea do intervalo de interesse pr\u00e9-determinada (tabela 1) foi obtida por um filtro vermelho (mm^2).

Tabela 1: Intervalo de valores para an\u00e1lise da imagem de alguns par\u00e2metros fluoresc\u00eancia

Par\u00e2metros	Intervalos		
Abs	$>0,51$	$0,51 > x > 0,11$	$<0,11$
F_v/F_m	$>0,78$	$0,78 > x > 0,70$	$< 0,7$
Fo	$>0,122$	$0,122 > x > 0,075$	$< 0,075$
$\Delta F/F_m'$	$>0,4$	$0,4 > x > 0,3$	$< 0,3$
qP	$>0,5$	$0,51 > x > 0,3$	$< 0,3$

Par\u00e2metros de fluoresc\u00eancia, tais como Fo, F_m , F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$, *ETR*, qP e NPQ foram determinadas como descrito anteriormente. Al\u00e9m destas, outras vari\u00e1veis como Y(NPQ) (rendimento qu\u00e2ntico de dissipac\u00e3o regulada de energia do FSII) e Y(NO) (rendimento qu\u00e2ntico de dissipac\u00e3o n\u00e3o-regulada de energia do FSII) foram determinadas segundo Klughammer & Schreiber (2008); Inh (porcentagem de inibi\u00e7\u00e3o relativa do FSII) foi obtida pelo aparelho. As estimativas de Y(NPQ) e Y(NO) s\u00e3o v\u00e1lidas tanto para a organiza\u00e7\u00e3o do

complexo antena no FSII no modelo de “lake” (centros de reação do FSII organizados em uma camada comum de pigmentos, originando unidades fotossintéticas conectadas (Kramer et al., 2004; Hendrickson et al., 2004)); quanto para o modelo “poddle” (pigmentos antena estão ligados a um centro de reação, não conectado a outro centro de reação (Vredenberg, 2000)).

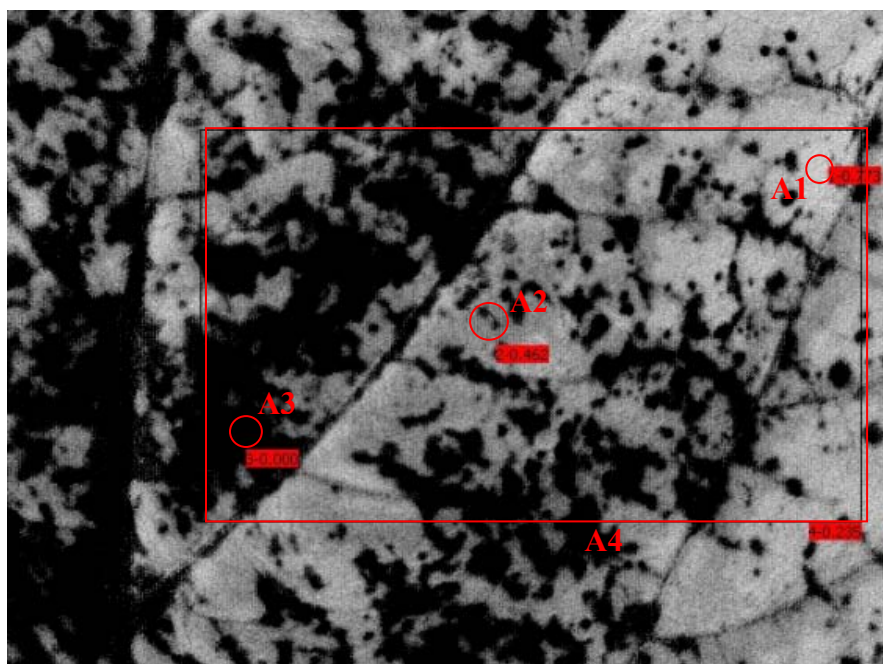


Figura 2a – Exemplo de marcação de regiões pré-determinadas (RPD) para obtenção de A1 (região não afetada), A2 (região intermediária), A3 (área afetada) e A4 (área geral), utilizados para análises estatísticas.

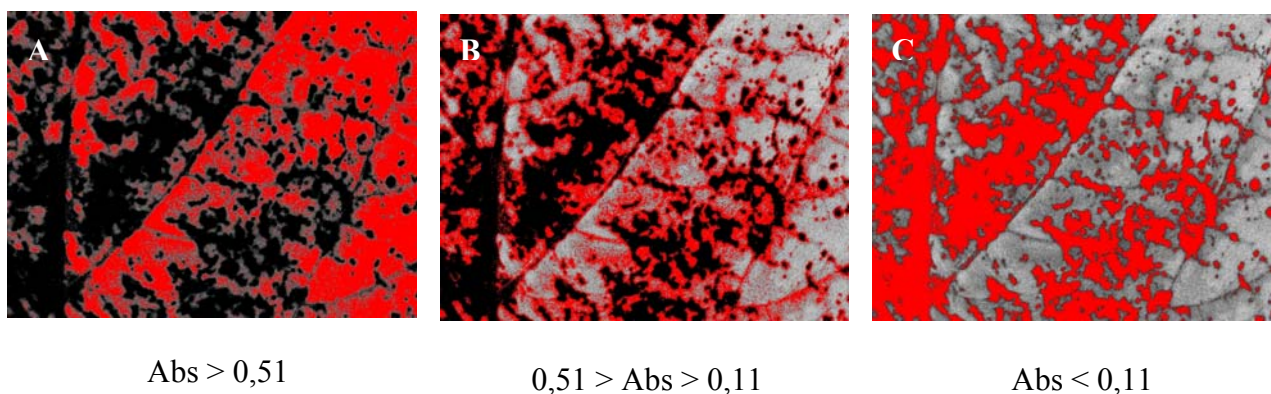


Figura 2b – Exemplo de avaliação em intervalos de valores (%IV), podendo-se obter a porcentagem de área na figura (mm²). (A) mostra os valores superiores 0,51; (B) valores entre 0,51 e 0,11; e (C) valores abaixo de 0,11.

3. 5. 4 - Determinações de Pigmentos Cloroplastídicos

Os teores de pigmentos (clorofila a, b e carotenóides) foram determinados utilizando como extrator o dimetilsulfóxido (DMSO), conforme descrito por Wellburn (1994). Dois discos foliares de 5 mm de diâmetro foram colocados em recipientes contendo 5 mL de DMSO, saturado com carbonato de cálcio e mantidos no escuro. Após 4 horas em banho-maria a 65°C, as absorbâncias dos extratos foram lidas em espectrofotômetro a 480; 649,1 e 665,1 nm, utilizando como branco o DMSO puro. Os teores dos pigmentos foram expressos em $\mu\text{g cm}^{-2}$.

3. 5. 5 - Determinação do Extravasamento de Eletrólitos

A permeabilidade das membranas foi determinada por meio do extravasamento de eletrólitos conforme Tarhanen et al. (1999). Vinte discos foliares de 10 mm de diâmetro foram colocados em pesa-filtro contendo 15 mL de água deionizada. Após 8 horas, a condutividade inicial (CnI) foi determinada com o auxílio de um condutivímetro (MacCann e Solomon, 2000). Os pesa-filtros foram, então, colocados em banho-maria à 90°C por duas horas e a condutividade final (CnF) foi determinada. A permeabilidade relativa foi calculada pela relação $\text{CnI} / (\text{CnI} + \text{CnF}) \times 100$ (Tarhanen et al., 1999).

3. 6 - Modelos e Análises Estatísticas

Os experimentos foram analisados em blocos ao acaso, com arranjo em parcelas subdivididas, no qual a repetição foi o bloco experimental. Para cada tratamento do primeiro conjunto de plantas, as variáveis de trocas gasosas, de fluorescência e imagem da fluorescência, concentrações de pigmentos e extravasamento de eletrólitos foram analisadas em cinco diferentes tempos de irradiância (3, 6, 12, 24 e 48 horas de luz), avaliando o efeito do inibidor no tempo. Diferenças foram contrastadas também entre tratamento e controle para cada parâmetro, dentro de determinado tempo.

As variáveis citadas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey (5% de probabilidade para o erro tipo I), utilizando o programa estatístico SAS (SAS System, versão 9).

Para um segundo grupo de plantas, parâmetros das curvas A/C_i , A/PAR , ETR/PAR , $(\Delta F/F_m')/PAR$ e fotorrespiração foram avaliados apenas em 12 e 48 horas de irradiância acumulada. Modelos de regressão não-linear, do tipo exponencial foram utilizados para estimar alguns parâmetros fotossintéticos das curvas. Assim, para curva A/PAR o modelo usado foi sugerido por Iqbal et al., (1997):

$$A = A_{\max PAR} \times (1 - \exp(-\alpha \times (PAR / A_{\max PAR})) - R_d$$

onde $A_{\max PAR}$ estima a taxa fotossintética máxima saturada pela luz; α , o rendimento quântico aparente de assimilação fotossintética; e R_d , a taxa respiratória no escuro. Para a curva A/C_i foi utilizado o modelo de Escalona et al.(1999):

$$A = A_{\max CO_2} \times (1 - \exp(-k \times (C_i - \Gamma_{CO_2})))$$

onde $A_{\max CO_2}$ estima a taxa fotossintética máxima saturada por CO_2 , k é a constante de proporcionalidade, e Γ_{CO_2} estima o ponto de compensação de CO_2 (intercepto- x da curva). Para a curva ETR/PAR foi utilizado o modelo proposto por Vassilev & Manolov (1999):

$$ETR = ETR_{\max} \times (1 - \exp(-PAR / \kappa))$$

em que ETR_{\max} representa a taxa aparente máxima de elétrons sob luz saturante, e κ é a taxa de crescimento em função da irradiância (inclinação da reta). Para $(\Delta F/F_m')/PAR$ foi utilizado:

$$\Delta F/F_m' = \Delta F/F_{m' \max} \times \exp(-b * PAR)$$

em que $\Delta F/F_{m' \max}$ estima o rendimento quântico efetivo máximo sob luz saturante.

Regressões lineares dos primeiros pontos ($< 100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) da curva A/PAR foram utilizadas para estimar o ponto de compensação luminoso e a taxa respiratória no escuro, respectivamente, como intercepto- x e intercepto- y . O rendimento quântico máximo do fluxo linear de elétrons através do FSII (Φ_e) foi obtido pela inclinação máxima da reta, na curva ETR/PAR .

4. RESULTADOS

4.1 - Teores de pigmentos e permeabilidade de membranas

Foram observadas reduções nos teores de clorofila *a* (Cl *a*) em folhas novas tratadas com lactofen, expressados tanto com base em área quanto em massa (Figura 3 e Anexo 1). As FNC, caracterizadas por apresentarem teores de Cl *a* abaixo de 31 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ no início do experimento, apresentaram incrementos da ordem de 40% ao final do período experimental (48h), aproximando-se do teor de Cl *a* encontrado em folhas maduras ($\sim 40 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) no mesmo período. A FMC não apresentou variação de Cl *a* ao longo do período de avaliação (Figura 3).

Após 48 horas de luz, a FMT não apresentou reduções nos teores de Cl *a* com base em área, comparado ao início do experimento (3 horas); porém com base em massa, essa redução foi significativa, sendo da ordem de 18% (Anexo 1). Com relação à FNT, foram observadas reduções significativas da ordem de 25 e 45%, expressando respectivamente, por área e por massa.

Os teores de clorofila *b* (Cl *b*) não apresentaram reduções significativas entre os tratamentos ao longo do período experimental (Anexo 1); porém ao final de 48 horas de luz, reduções da ordem de 43% foram observadas apenas na FNT comparada ao controle (Anexo 1). A FNC apresentou incrementos de 20% no teor de Cl *b* com base em área, após 48 horas de luz. Os teores de Cl totais com base em área apresentaram comportamento semelhante aos teores de Cl *a*, observando aumentos significativos na FNC e reduções na FNT. Reduções nos teores de carotenóides foram observadas apenas na FNT expressando com base em massa, sendo da ordem 55% ao final de 48 horas, comparado ao início do experimento (3 horas).

Com relação à permeabilidade relativa das membranas, após 6 e 48 horas de luz foram observados, respectivamente, aumentos de 44 e 58% na FNT comparados ao controle (Figura 4); para os demais tratamentos não foram observados incrementos significativos no extravasamento celular.

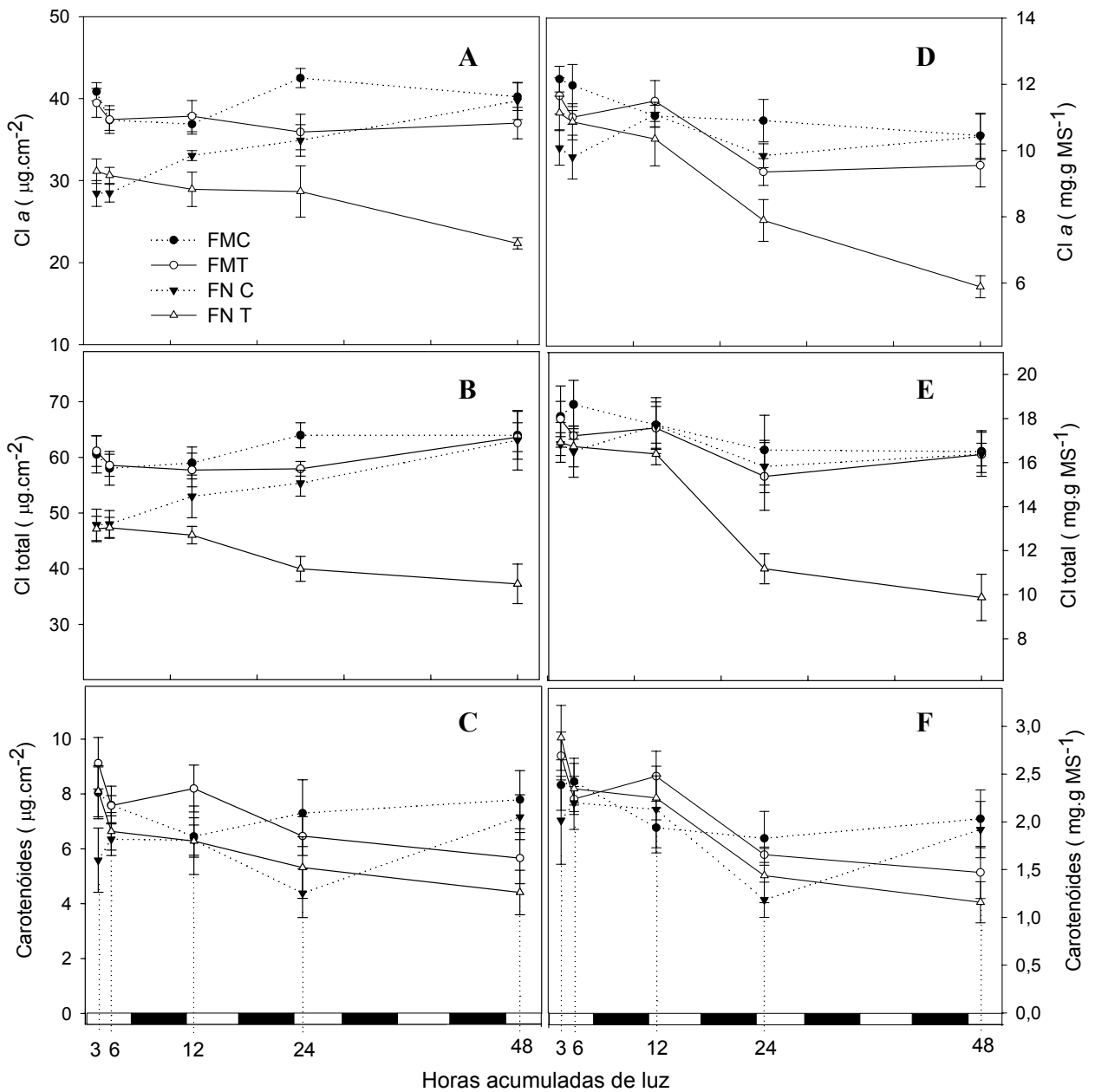


Figura 3 – Variação da concentração de Cl a (A e D), Cl totais (B e E) e carotenóides (C e F), respectivamente, com base em área e massa, em diferentes folhas com e sem aplicação de lactofen. As determinações foram realizadas após 3, 6, 12, 24 e 48 horas acumuladas de luz. Os segmentos claros e escuros na abscissa indicam fotoperíodo (11 h) e período noturno (13 h), respectivamente; (FMC: folha madura controle; FMT: folha madura tratada; FNC: folha nova controle; FNT: folha nova tratada).

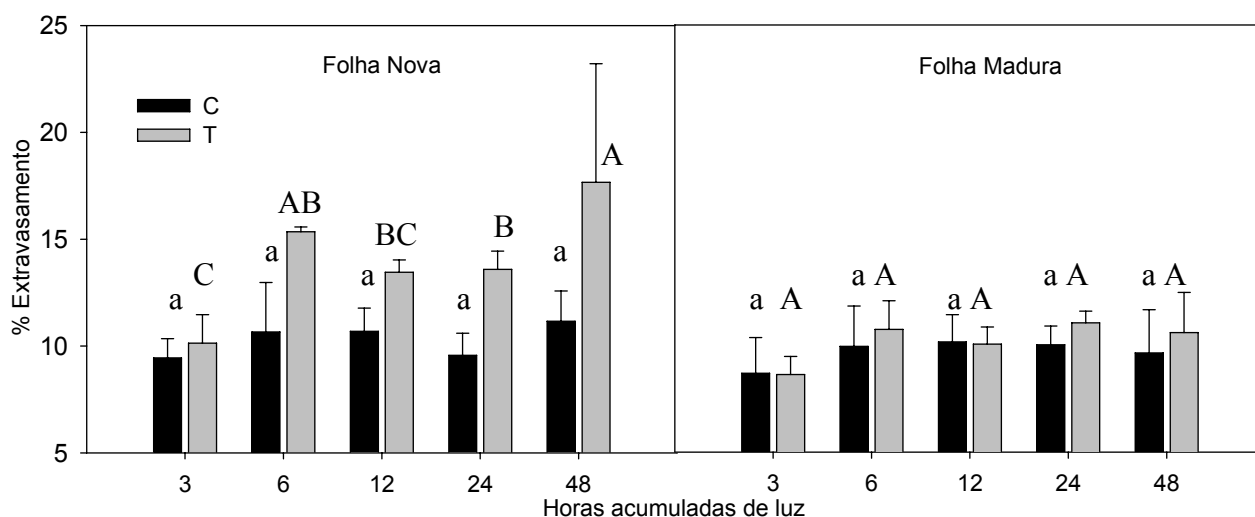


Figura 4 – Permeabilidade de membranas em folhas novas e maduras de soja, tratadas com lactofen (T) e controle (C) após 3, 6, 12, 24 e 48 horas de exposição à luz (horas acumuladas). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (5%) em função no tempo de luz para T, enquanto letras minúsculas indicam diferenças em C.

4.2 - Parâmetros de Trocas Gasosas

✓ Respostas das trocas gasosas após várias horas de exposição à luz

Os parâmetros de trocas gasosas comportaram-se de maneira distinta entre FN e FM em função do tempo ($P < 0,05$) (Figura 5). Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos no período de 3 horas acumuladas de luz para as taxas fotossintéticas ($P > 0,05$) (Anexo 2), enquanto que g_s apresentou valores de 0,150 e 0,213 $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivamente, para FN e FM. Porém após 6 horas de irradiância, FNT apresentou uma redução significativa de 83% em g_s , enquanto que A foi reduzida em aproximadamente 77% quando comparados ao controle, e manteve-se nesse nível até 48 horas acumuladas de luz (Figura 5). Para o período de 6 horas, a FMT não apresentou incrementos em g_s , porém de 6 para 12 horas esse parâmetro foi reduzido significativamente em 67%; enquanto que A decresceu apenas 21%. O comportamento da variável E acompanhou o comportamento de g_s para todos os tratamentos. Para FMC e FNC a relação C_i/C_a não variou significativamente, porém os valores ao longo do período experimental apresentaram-se menores para a FNC comparados à FMC. Na presença do inibidor, a relação C_i/C_a para FNT manteve-se constante, enquanto que na FMT foram observadas reduções significativas de 22% no período entre 6 e 48 horas de luz.

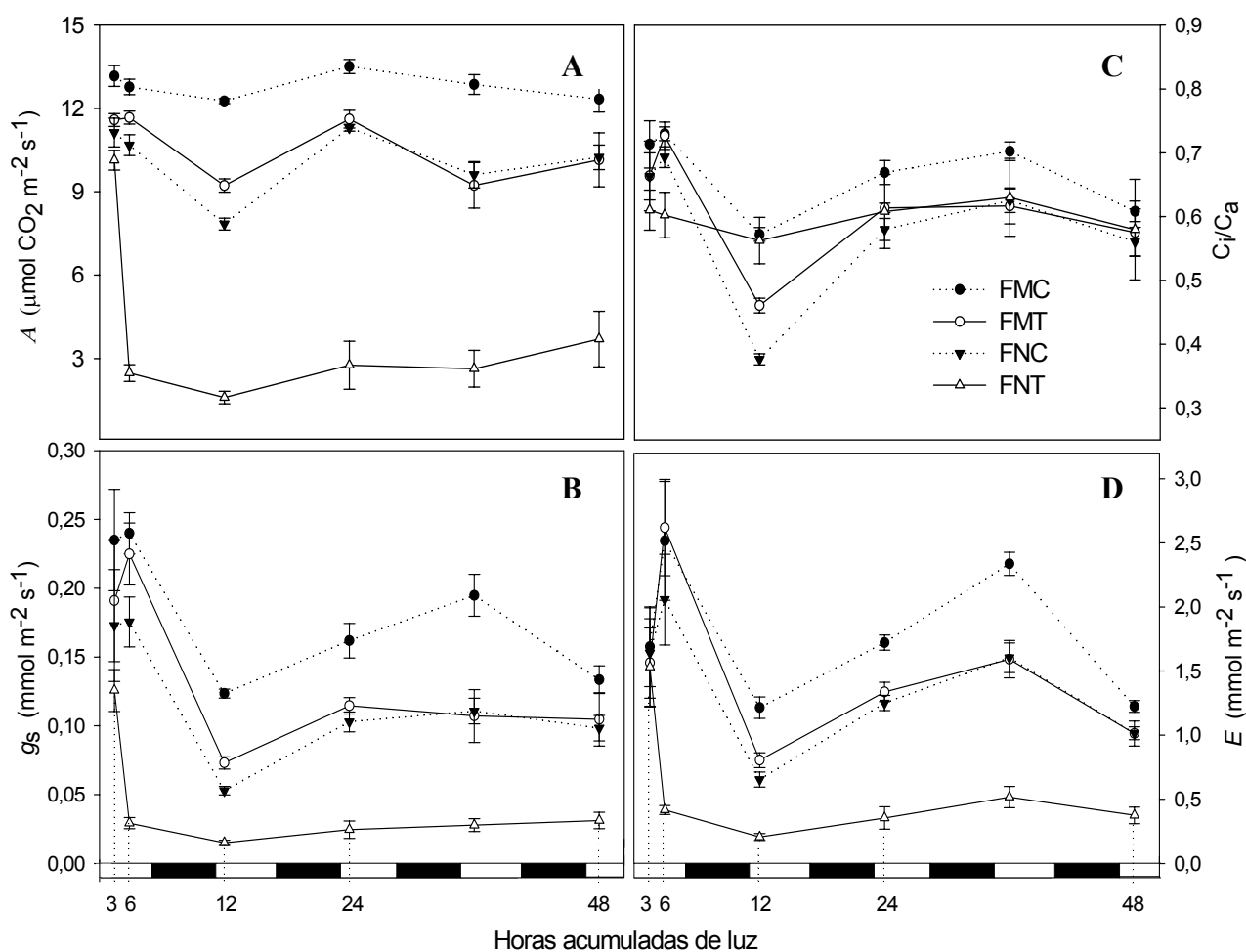


Figura 5 – Variação de fotossíntese (A), condutância estomática (B), relação C_i/C_a (C) e transpiração (D) em diferentes folhas com e sem aplicação de lactofen. As determinações foram realizadas após 3, 6, 12, 24 e 48 horas acumuladas de luz. Os segmentos claros e escuros na abscissa indicam fotoperíodo (11 h) e período noturno (13 h), respectivamente; (FMC: folha madura controle; FMT: folha madura tratada; FNC: folha nova controle; FNT: folha nova tratada).

✓ *Resposta das trocas gasosas sob concentrações crescentes de C_i (curva A/C_i)*

Após 12 horas de exposição à luz, respostas da taxa de assimilação fotossintética em diferentes concentrações internas de CO_2 (curva A/C_i) foram significativas apenas para FNT, tanto sob baixa quanto alta irradiância de medição (Tabela 2). Para a taxa máxima de fotossíntese saturada por CO_2 (A_{maxCO_2}), FNT apresentou redução de 35% sob baixa irradiância; enquanto que para alta irradiância, essa redução foi da ordem de 47% (Figura 6 e 8-A) quando comparado ao controle. A taxa de carboxilação máxima realizada pela Rubisco

($V_{c,max}$) e a taxa de transporte de elétrons para sua regeneração (J_{max}), ambas obtidas por trocas gasosas, também apresentaram reduções apenas para a FNT comparado ao controle. Sob baixa irradiância, $V_{c,max}$ e J_{max} reduziram-se respectivamente em 50 e 36%; enquanto que para alta irradiância essas reduções foram de 75 e 56%, respectivamente. Com relação ao ponto de compensação de CO_2 (Γ_{CO_2}), FNT apresentou aumento de 73 % sob 300 $\mu\text{mol f\otons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 200% sob 1000 $\mu\text{mol f\otons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, com relação ao controle (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros estimados da curva A/C_i sob dois níveis de irradiância (300 e 1000 $\mu\text{mol f\otons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em diferentes folhas de soja, com e sem aplicação de lactofen. As determinações foram realizadas após 12 horas acumuladas de luz, obtendo-se: A_{maxCO_2} (taxa máxima de fotossíntese sob CO_2 saturante), $V_{c,max}$ (taxa de carboxilação máxima pela Rubisco) e J_{max} (taxa de transporte de elétrons para regeneração da Rubisco) e Γ_{CO_2} (ponto de compensação de CO_2); (FMC: folha madura controle; FMT: folha madura tratada; FNC: folha nova controle; FNT: folha nova tratada).

PAR $\mu\text{mol f\otons m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Folha	Trat	A_{maxCO_2}	$V_{c,max}$ $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	J_{max}	Γ_{CO_2} $\mu\text{mol mol}^{-1}$
300	FM	C	17,55 (0,71) ^a	15,65 (1,2) ^a	85,16 (1,3) ^a	55,72 (3,1) ^a
		T	17,50 (1,17) ^a	14,75 (1,3) ^a	82,66 (1,6) ^a	60,72 (4,2) ^a
	FN	C	16,30 (0,9) ^a	13,17 (1,4) ^a	78,32 (1,6) ^a	64,33 (1,9) ^a
		T	10,55 (1,49) ^b	6,49 (0,9) ^b	50,43 (3,3) ^b	111,52 (16,1) ^b
1000	FM	C	22,08 (1,7) ^a	19,63 (1,8) ^a	103,82 (3,0) ^a	56,63 (4,3) ^a
		T	21,02 (1,46) ^a	16,48 (1,9) ^a	97,54 (2,4) ^a	63,75 (7,0) ^a
	FN	C	22,23 (1,57) ^a	19,56 (1,7) ^a	103,89 (2,4) ^a	58,63 (1,7) ^a
		T	11,78 (1,67) ^b	4,89 (0,9) ^b	46,13 (5,2) ^b	176,77 (20,7) ^b

Valores entre parênteses representam o desvio padrão da média; letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (5%) apenas entre folhas C e T.

Com relação à limitação estomática relativa (L_s), sob baixa irradiância, foram observados aumentos de 49% na FNT (Tabela 3), enquanto que para alta irradiância, a L_s aumentou 112% com relação ao controle. Para a limitação mesofílica (L_m) a FN foi 11,2 vezes maior do que a FM, sob baixa irradiância e 4,9 vezes superior sob alta irradiância. Não foram observadas variações significativas para FM tanto em L_s quanto em L_m , independente da irradiância.

Tabela 3: Limitação estomática (L_s) e limitação mesofílica (L_m) em dois níveis de PAR (300 e 1000 $\mu\text{mol fotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em diferentes folhas de soja, com e sem aplicação de lactofen. As determinações foram realizadas após 12 horas acumuladas de luz (FM: folha madura; FN: folha nova; C: Controle e T: Tratamento)

Folha	Trat	300 $\mu\text{mol fotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$		1000 $\mu\text{mol fotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$	
		L_s	L_m	L_s	L_m
FM	C	22,18 (2,7) ^a	2,96 (1,04) ^b	29,75 (8,2) ^a	8,60 (4,6) ^b
	T	24,25 (3,2) ^a		36,81 (13,6) ^a	
FN	C	35,02 (2,1) ^b	36,08 (7,7) ^a	24,16 (1,5) ^b	50,67 (18,0) ^a
	T	52,35 (2,7) ^a		51,32 (9,7) ^a	

Valores entre parênteses representam o desvio padrão da média; letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (5%) entre folhas C e T para L_s e entre FM e FN para L_m .

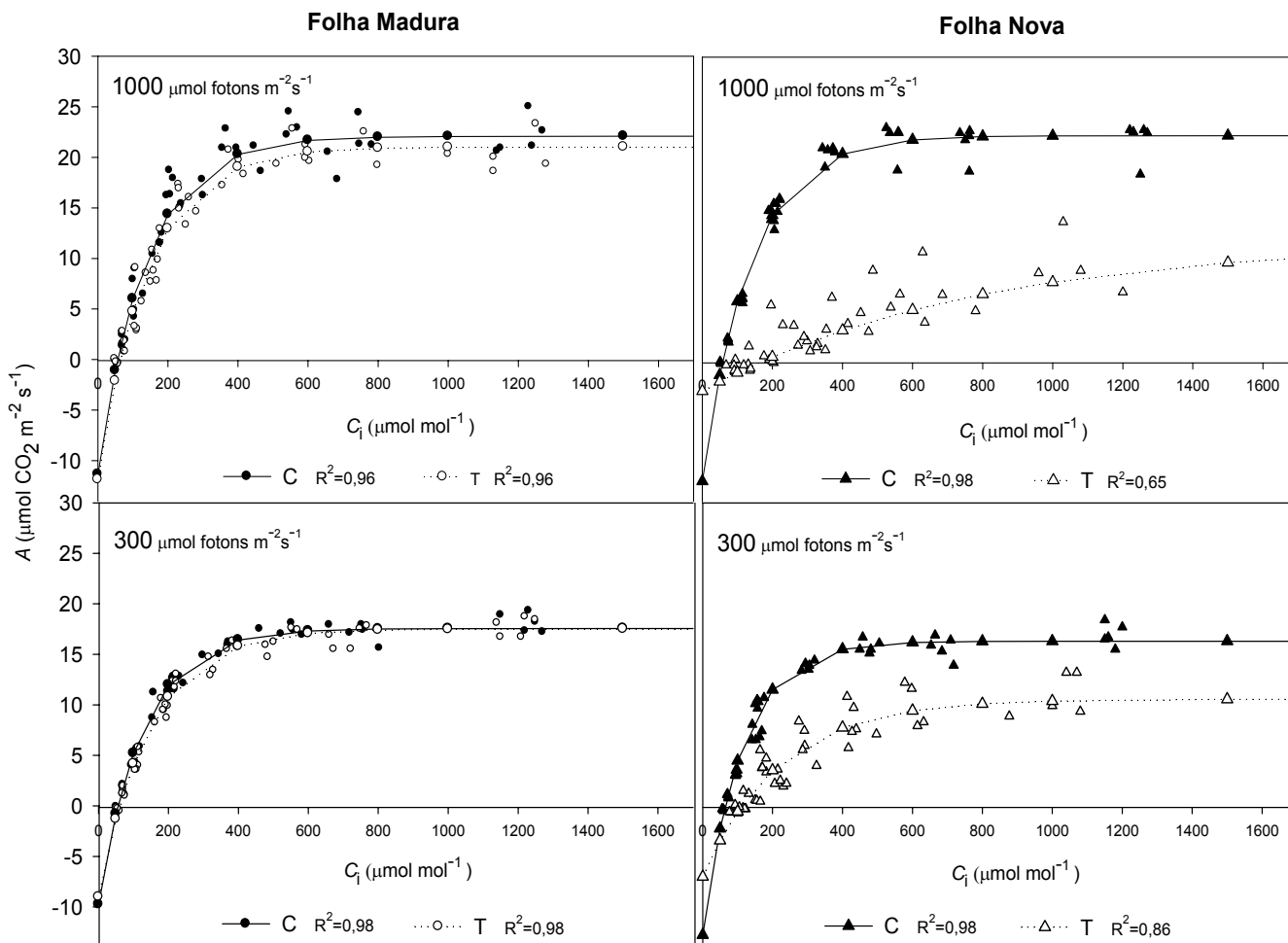


Figura 6 – Respostas das taxas fotossintéticas a diferentes concentrações internas de CO_2 (curvas A/C_i) em dois níveis de PAR (300 e 1000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em diferentes folhas de soja (novas e maduras) sem e com aplicação do lactofen (C: Controle e T: Tratamento) após 12 horas de luz.

✓ *Resposta das trocas gasosas ao incremento de luz (curva A/PAR)*

Os efeitos de inibidores da PROTOX nas respostas das taxas fotossintéticas em função de diferentes níveis de irradiância (curva A/PAR), combinados em dois níveis de concentração de CO₂, mostraram-se significativos apenas para FNT (Figura 7 e Figura 8-B; Tabela 4). Foram observadas reduções em $A_{\max\text{PAR}}$ da ordem de 67 e 64%, respectivamente, para os níveis de CO₂ ambiente (400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e saturado (1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), quando comparados ao controle. A FMT, FMC e FNC incrementaram em aproximadamente 40% a $A_{\max\text{PAR}}$ sob condição de CO₂ saturante quando comparadas ao nível de CO₂ ambiente. De modo geral, a taxa respiratória estimada (R_d) apresentou decréscimos quando as folhas foram submetidas à condição de CO₂ saturante. Porém a FNT apresentou maiores R_d comparados ao controle, superiores em 33 e 100%, respectivamente, sob CO₂ ambiente e saturante. O rendimento quântico aparente de assimilação fotossintética (α) mostrou-se significativamente menor para FNT, reduzindo 49 e 36% respectivamente para CO₂ ambiente e saturante. Também foram observadas reduções na FM, tanto tratadas quanto controle, ao comparar CO₂ saturante com ambiente. Com relação ao ponto de compensação luminoso (Γ_{PAR}) observaram-se aumentos de 220% na FNT sob concentração de CO₂ ambiente e 240% sob CO₂ saturado, com relação ao controle. Porém, sob CO₂ saturante, FMC, FMT e FNC apresentaram reduções no Γ_{PAR} comparados a uma condição de CO₂ ambiente.

Tabela 4: Parâmetros estimados da curva A/PAR sob duas concentrações de CO₂ (ambiente e saturante) em diferentes folhas de soja, com e sem aplicação de lactofen. As determinações foram realizadas após 12 horas acumuladas de luz, obtendo-se: $A_{\max\text{PAR}}$ (taxa máxima de fotossíntese sob irradiância saturante), R_d (taxa respiratória estimada), α (rendimento quântico aparente) e Γ_{PAR} (ponto de compensação luminoso); (FMC: folha madura controle; FMT: folha madura tratada; FNC: folha nova controle; FNT: folha nova tratada).

CO ₂ $\mu\text{mol mol}^{-1}$	Folha	Trat	$A_{\max\text{PAR}}$	R_d	α	Γ_{PAR}
			$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ fótons}$	$\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
400 (ambiente)	FM	C	17,35 (2,6) ^a	0,85 (0,19) ^a	0,0622 (0,004) ^a	15,41 (2,3) ^a
		T	15,77 (2,9) ^a	0,82 (0,07) ^a	0,0627 (0,004) ^a	15,77 (0,5) ^a
	FN	C	18,92 (0,9) ^a	1,45 (0,1) ^a	0,0703 (0,002) ^a	23,85 (1,6) ^b
		T	6,22 (1,7) ^b	1,93 (0,36) ^a	0,0360 (0,014) ^b	76,48 (25,9) ^a
1000 (saturante)	FM	C	25,16 (3,0) ^a	0,41 (0,30) ^a	0,0571 (0,006) ^a	8,41 (5,5) ^a
		T	23,47 (2,1) ^a	0,23 (0,16) ^a	0,0543 (0,004) ^a	5,25 (3,1) ^a
	FN	C	23,43 (1,2) ^a	0,76 (0,32) ^b	0,0622 (0,005) ^a	14,74 (5,3) ^b
		T	8,34 (2,9) ^b	1,58 (0,40) ^a	0,0396 (0,009) ^b	50,19 (22,0) ^a

Valores entre parênteses representam o desvio padrão da média; letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (5%) apenas entre folhas C e T.

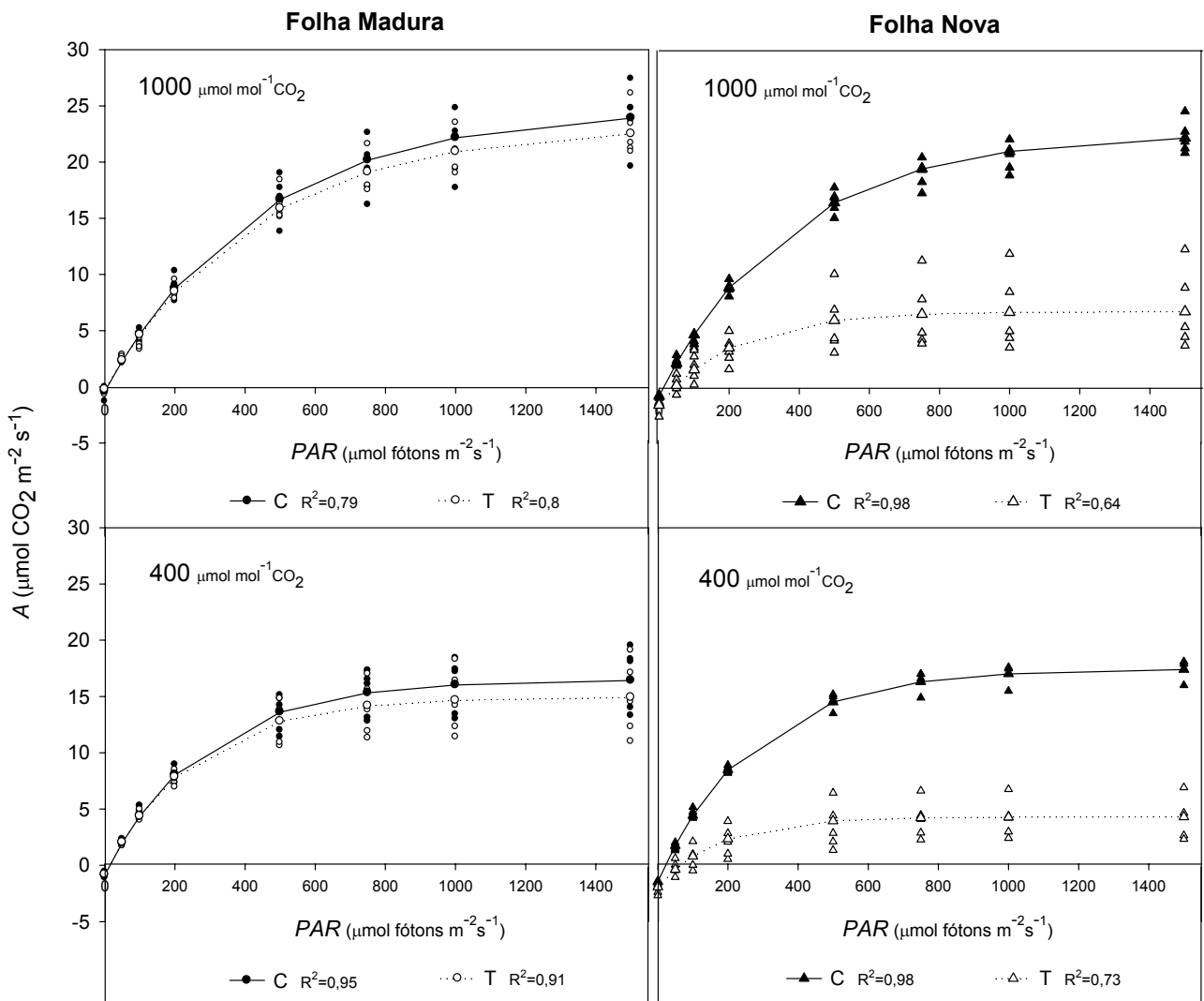


Figura 7 – Respostas das taxas fotossint\u00e9ticas em diferentes intensidades luminosas (curvas A/PAR) sob dois n\u00edveis de CO_2 (400 e $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$) em diferentes folhas de soja (maduras e novas) com e sem aplica\u00e7\u00e3o do lactofen (T: Tratamento e C: Controle) ap\u00f3s 12 horas de luz.

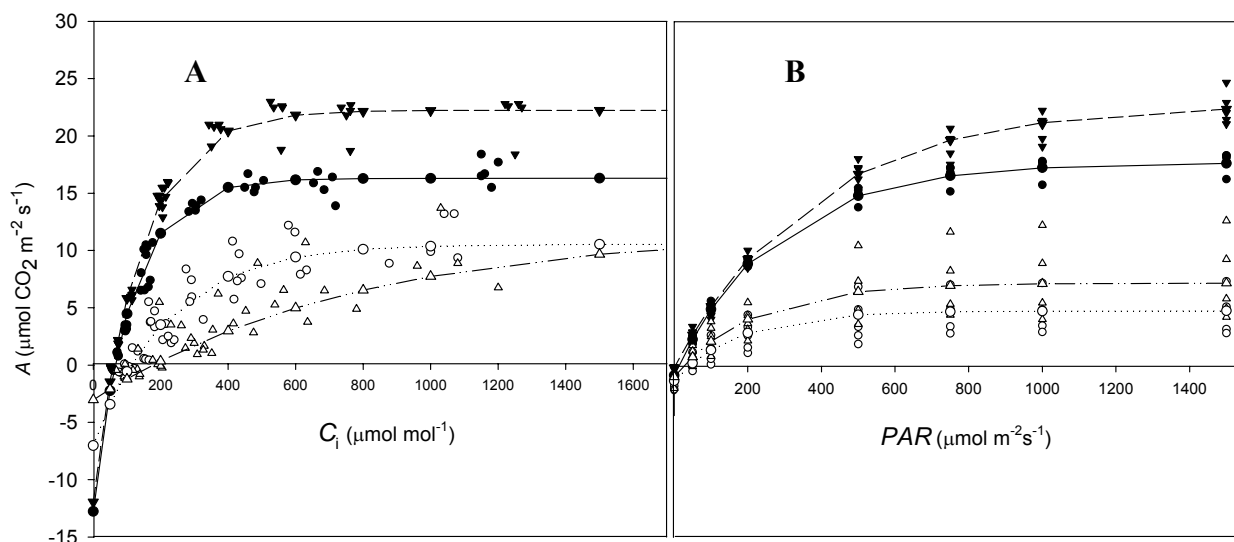


Figura 8 – (A) Curvas A/C_i sob dois níveis de luz (300 e 1000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e (B) curvas A/PAR sob dois n\u00edveis de CO_2 (400 e 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) em folhas novas com e sem aplica\u00e7\u00e3o do lactofen (T: Tratamento e C: Controle). ● — Controle (luz: 300; CO_2 : 400); ○ Tratamento (luz: 300 ; CO_2 : 400); ▼ — Controle (luz: 1000; CO_2 : 1000); Δ - · - · Tratamento (luz: 1000; CO_2 : 1000), respectivamente para A e B.

✓ Curva de luz para ETR , $\Delta F/F_m'$ e fotorrespira\u00e7\u00e3o

Respostas da taxa de transporte de el\u00e9trons (ETR) e do rendimento qu\u00e2ntico efetivo ($\Delta F/F_m'$) em fun\u00e7\u00e3o da intensidade luminosa (curva ETR/PAR e $\Delta F/F_m'/PAR$) apresentaram comportamentos distintos entre os tratamentos (Figura 9 e Tabela 5). Ap\u00f3s 12 horas de luz, FMT n\u00e3o apresentou diferen\u00e7a estat\u00edstica com rela\u00e7\u00e3o ao controle; por\u00e9m para FNT redu\u00e7\u00f5es em 32, 47 e 38% foram observados respectivamente para ETR_{max} , $\Delta F/F_m'_{\text{max}}$ e Φ_e , quando comparados ao controle.

A partir da determina\u00e7\u00e3o do Φ_e estimaram-se os par\u00e2metros de fotorrespira\u00e7\u00e3o (R_1) apresentados na Tabela 5. Para FMT foram observados incrementos da ordem de 117% na R_1 comparados ao controle, concomitantemente a redu\u00e7\u00f5es significativas de g_s e A (53 e 33%, respectivamente). Al\u00e9m disso, a parti\u00e7\u00e3o de el\u00e9trons para a atividade oxigenativa (J_o) teve um incremento de 118%, enquanto que, para atividade carboxilativa (J_c) observou-se redu\u00e7\u00e3o de 18%, permanecendo a rela\u00e7\u00e3o R_1/A em torno de 32% para FMT, superior ao observado no controle (9%). Na FNC observou-se uma alta R_1 ($\sim 2,75 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concomitantemente a uma A em torno de $7,7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mantendo a rela\u00e7\u00e3o R_1/A em torno de 36% e uma baixa g_s ($\sim 0,052 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

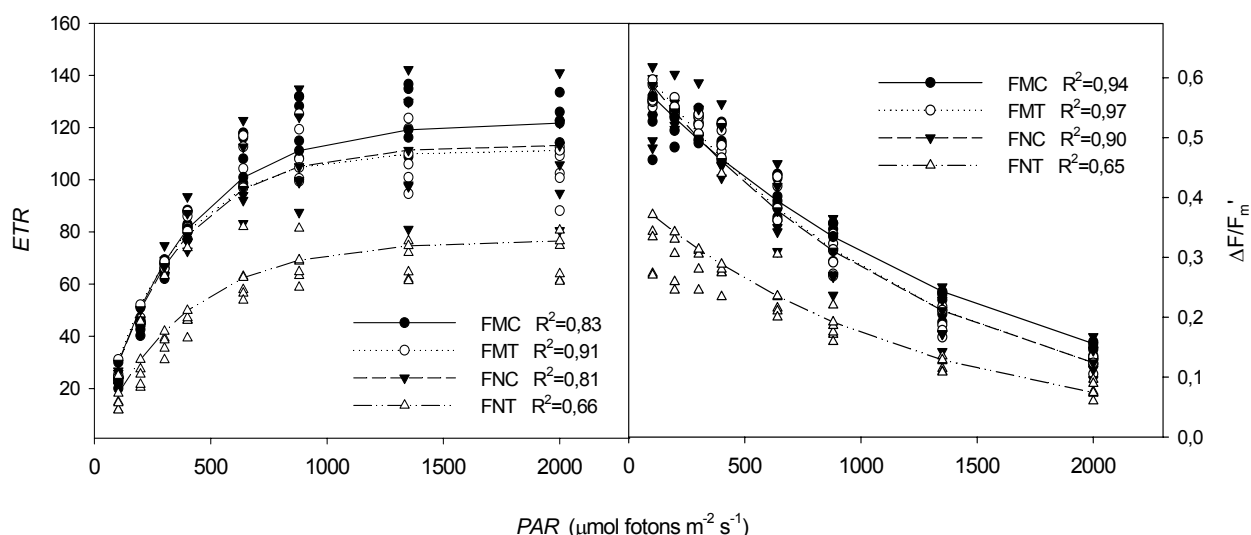


Figura 9 – Respostas de ETR e $\Delta F/F_m'$ em função da intensidade luminosa (PAR) em diferentes folhas com e sem aplicação de lactofen. As determinações foram realizadas após 12 horas acumuladas de luz (FMC: folha madura controle; FMT: folha madura tratada; FNC: folha nova controle; FNT: folha nova tratada).

Tabela 5: Parâmetros de trocas gasosas utilizados para estimar fotorrespiração em diferentes folhas de soja (madura e nova), com e sem aplicação de lactofen. As determinações foram realizadas após 12 horas acumuladas de luz, obtendo-se: ETR_{max} (taxa máxima de transporte de elétrons sob irradiância saturante), Φ_e (rendimento quântico máximo do fluxo linear de elétrons fotossintéticos através do FSII), $\Delta F/F_{m'_{max}}$ (rendimento quântico efetivo máximo do FSII), A (taxa fotossintética), g_s (condutância estomática), R_{dm} (taxa respiratória mitocondrial), R_1 (taxa fotorrespiratória), J_c (partição de elétrons para carboxilação), J_o (partição de elétrons para oxigenação) e J_T (partição de elétrons para fotossíntese e fotorrespiração); (C: Controle e T: Tratamento).

	Folha Madura		Folha Nova	
	C	T	C	T
ETR_{max}	122,27 (8,3) ^a	111,45 (10,5) ^a	113,50 (19,3) ^a	76,94 (7,7) ^b
$\Delta F/F_{m'_{max}}$	0,61 (0,03) ^a	0,65 (0,01) ^a	0,64 (0,05) ^a	0,34 (0,04) ^b
Φ_e	0,216 (0,01) ^a	0,216 (0,01) ^a	0,218 (0,02) ^a	0,135 (0,04) ^b
A	12,34 (0,23) ^a	8,23 (1,15) ^b	7,73 (0,61) ^a	1,72 (0,63) ^b
g_s	0,127 (0,01) ^a	0,060 (0,01) ^b	0,052 (0,01) ^a	0,015 (0,01) ^b
R_{dm}	1,03 (0,01) ^a	1,15 (0,18) ^a	0,95 (0,09) ^b	1,46 (0,20) ^a
R_1	1,17 (0,23) ^b	2,55 (0,44) ^a	2,75 (0,13) ^a	2,52 (0,18) ^a
J_c	58,15 (1,17) ^a	47,72 (3,68) ^b	45,73 (2,20) ^a	22,80 (2,04) ^b
J_o	9,35 (1,83) ^b	20,42 (3,49) ^a	22,04 (1,07) ^a	20,17 (1,42) ^a
J_T	67,50 (2,6) ^a	68,15 (2,74) ^a	67,76 (1,46) ^a	42,98 (1,74) ^b
J_c / J_T	0,86 (0,02) ^a	0,70 (0,05) ^b	0,67 (0,02) ^a	0,53 (0,04) ^b
R_1/A	0,09 (0,02) ^b	0,32 (0,11) ^a	0,36 (0,04) ^b	1,71 (0,73) ^a
R_d/A	0,08 (0,01) ^a	0,14 (0,02) ^a	0,12 (0,01) ^b	0,97 (0,37) ^a

Valores entre parênteses representam o desvio padrão da média; letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (5%) apenas entre folhas C e T.

Com relação à FNT, foi observada uma redução significativa em A da ordem de 78% concomitantemente a uma redução de 71% em g_s e aumento em 35% na R_{dm} . Porém, a R_1 foi menor na FNT que no controle, com decréscimos de 8%. As relações R_1/A e R_{dm}/A foram de 0,97 e 1,71 respectivamente. Reduções nas taxas de transporte de elétrons total (J_t) foram observadas na ordem de 36% na FNT comparada ao controle, porém J_c e J_o apresentaram proporções semelhantes em J_t .

4.3 - Parâmetros de Fluorescência

✓ Fluorescência da clorofila a

Com relação aos parâmetros de fluorescência da clorofila obtidos pelo Mini-PAM (Anexo 3), o rendimento quântico potencial do FSII (F_v/F_m) após de 3 horas de luz, foi superior a 0,81 em todos os tratamentos (Figura 10). Porém, entre 3 e 6 horas foi observada redução significativa no F_v/F_m apenas na FNT, mantendo valores próximos à 0,75 até 24 horas de luz. No período de 48 horas, os valores de F_v/F_m retornaram aos valores próximos do controle (0,81) na FNT. Para a fluorescência mínima (F_o), todos os tratamentos apresentaram aumentos significativos no período de 6 horas e reduções em 12 horas, porém a FNT apresentou o menor valor absoluto de F_o (134) em relação ao controle, ao final de 48 horas ($P < 0,05$). Semelhante ao F_v/F_m , os valores de $\Delta F/F_m'$ e ETR foram distintos apenas para FNT, apresentando reduções na ordem de 22 e 27% após 6 horas de luz, respectivamente, e aumentos no período de 48 horas. Os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si para os parâmetros qP e NPQ ($P > 0,05$) (Anexo 3).

✓ Imagem da fluorescência

Com relação aos parâmetros de imagem da fluorescência, foram obtidas onze variáveis e contrastadas com a imagem fotográfica da mesma região (Figuras 11, 12 e 13) apenas para FNT, visto que as folhas maduras não apresentaram sintomas quando tratadas com inibidores da PROTOX, para as condições deste trabalho. Para o período entre 3 e 6 horas, não foram observados sintomas visuais na superfície da folha. Porém F_v/F_m , F_o , $\Delta F/F_m'$, ETR , qP , $Y(NPQ)$, $Y(NO)$ e Inh apresentaram variações no padrão de cor nas regiões das imagens do tecido foliar que tiveram contato com o inibidor. Os sintomas visuais foram detectados na imagem fotográfica somente a partir de 12 horas, evoluindo de tecidos saudáveis a manchas amarronzadas e necroses ao final de 48 horas. F_v/F_m e F_m diminuíram progressivamente à medida que o número de horas expostas à luz foi incrementado.

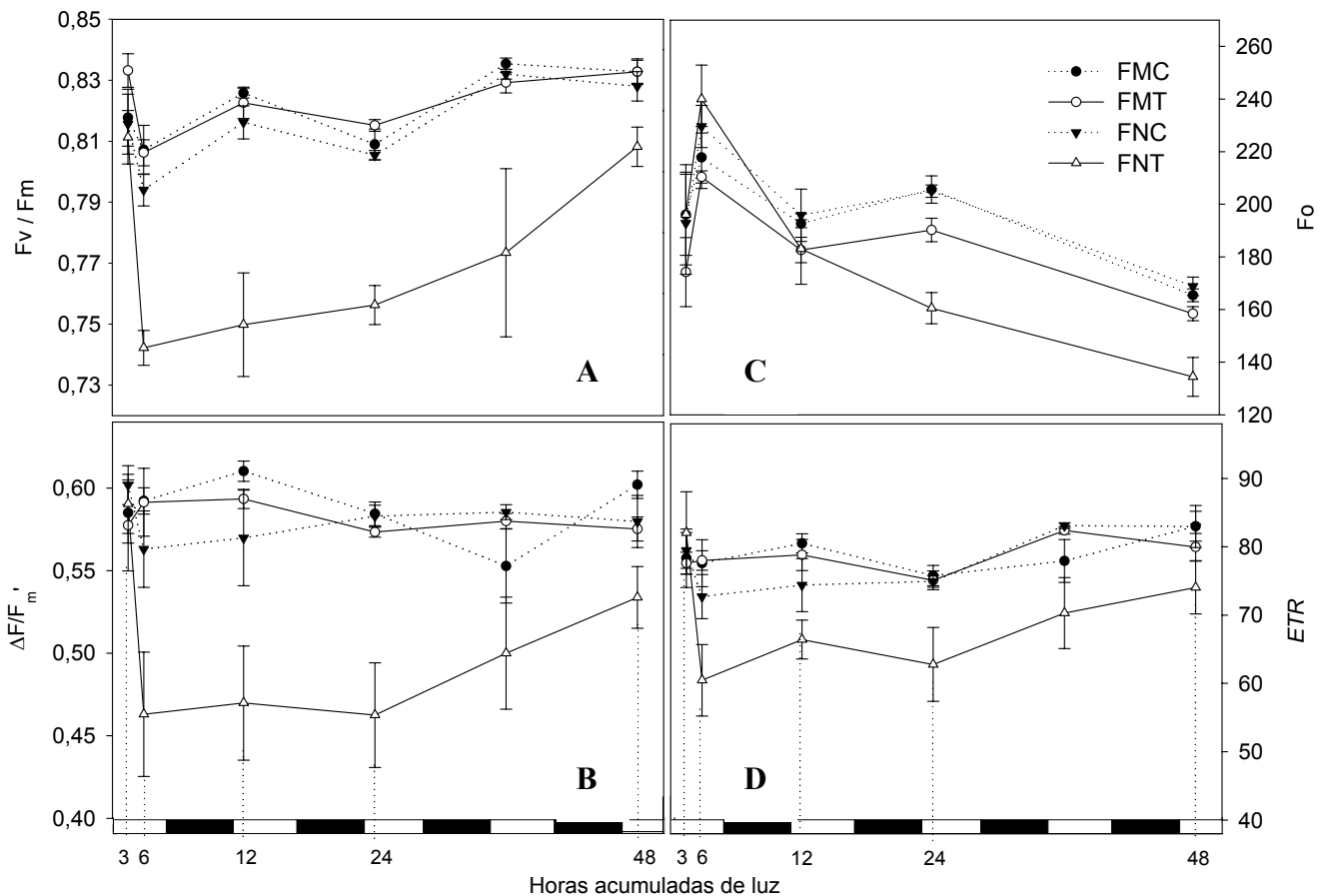


Figura 10 – Variação de F_v/F_m (A), $\Delta F/F_m'$ (B), F_o (C) e ETR (D) em diferentes folhas com e sem aplicação de lactofen. As determinações foram realizadas após 3, 6, 12, 24 e 48 horas acumuladas de luz. Os segmentos claros e escuros na abscissa indicam fotoperíodo (11 h) e período noturno (13 h), respectivamente; (FMC: folha madura controle; FMT: folha madura tratada; FNC: folha nova controle; FNT: folha nova tratada).

Entretanto, incrementos em F_o no período de 6 e 12 horas foi seguido de uma forte redução em 48 horas (pontos amarelados). O $\Delta F/F_m'$ nas áreas afetadas diminuiu (coloração escura) enquanto que as regiões circunvizinhas (não afetadas) aumentou em 48 horas. Esse mesmo comportamento foi observado para ETR e Inh . Para os outros parâmetros, de modo geral, a região afetada tornou-se escura (devido à evolução da necrose), enquanto que as regiões circunvizinhas apresentaram tendência de recuperação ao final de 48 horas.

Com relação aos dados obtidos por regiões pré-determinadas (RPD) (Figura 14 e Anexo 4), de modo geral, as regiões afetadas (A3) apresentou reduções para valores próximos de zero no período de 48 horas em quase todos os parâmetros, exceto para $Y(NO)$ e Inh , cujos valores se elevaram para próximo de 1. Não foram observadas diferenças significativas entre

as regiões não afetadas (A1) e controle (AC), mostrando a existência de regiões circunvizinhas às afetadas que permaneceram sadias. Com relação à regiões intermediária (A2), apenas *ETR* apresentou reduções significativas com relação à AC em 24 horas. A4 (área abrangente), por computar regiões A3, apresentou reduções significativas com relação ao controle nos parâmetros F_o , F_m , *ETR* e $Y(NPQ)$ à medida que aumentou o tempo de exposição à irradiância. Para F_o , no período de 6 horas, observaram-se incrementos em todas as áreas exceto em AC; porém, em 12 horas, os valores destas regiões retornaram para próximos do controle e apenas A3 e A4 continuaram decrescendo a níveis inferiores à AC até 48 horas.

Na figura 15 estão mostradas as diferenças entre os valores de F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$ e *ETR* obtidos por Image-PAM e Mini-PAM. De modo geral, os valores obtidos pelo Image-PAM foram inferiores aos obtidos pelo Mini-PAM. Para o F_v/F_m , a cinética de fluorescência da região A4 apresentou resposta semelhante a FNT obtidas pelo Mini-PAM.

Quando se representa os valores da porcentagem de área foliar (Figura 16 e Anexo 5), áreas com valores de Abs acima de 0,5 reduziram na FNT, passando de 45 para aproximadamente 20% da superfície da folha, respectivamente entre 3 e 48 horas; concomitantemente a essa redução, incrementos de áreas com baixa absorvância ($Abs < 0,11$) foram observadas para o mesmo período; e ao final de 48 horas, 85% da superfície foliar apresentaram $Abs < 0,5$, enquanto na FNC 84% de sua superfície apresentaram valores de $Abs > 0,5$. Para o F_v/F_m em 3 horas, 21% da superfície foliar apresentaram valores acima de 0,78; e, 73% das áreas apresentaram F_v/F_m entre 0,78 e 0,7. Com incremento das horas de irradiância, regiões com F_v/F_m abaixo de 0,7 chegaram a representar 43% da superfície da folha; e, ao final de 48 horas, 68% da superfície foliar foram observados com valores de F_v/F_m abaixo de 0,78. Para FNC, valores de F_v/F_m acima de 0,78 passaram de 25 % (3 horas) para 78% (48 horas), não observando valores abaixo de 0,7.

Para os valores de F_o na FNT, em 87% da área foliar foram observados valores entre 0,122 e 0,075 no período de 3 horas. Porém em 6 horas, áreas com valores acima de 0,122 representavam 37% da folha, incrementando duas vezes com relação a 3 horas de luz. A partir deste ponto, foram observadas incrementos de áreas com valores abaixo de 0,075, chegando a representar 51% da superfície foliar ao final de 48 horas. Para 3 horas, áreas com valores de $\Delta F/F_m'$ acima de 0,4 representavam 28% da folha e, em 24 horas, 15%. Porém, ao final de 48 horas, observaram-se incrementos de 1,16 vezes nas áreas com alto $\Delta F/F_m'$, representando 32% da folha. Concomitantemente, áreas com baixo $\Delta F/F_m'$ ($< 0,3$), que eram desprezíveis em 3 horas, representaram 55% da superfície foliar ao final do experimento (48 horas). Na

FNC, 96% da área foliar foram observados com valores entre 0,4 e 0,3 ao final do experimento. Com relação ao qP, áreas com valores acima de 0,5 (que representavam 83%) em 3 horas decresceram para 33% da superfície foliar em 48 horas. Já para áreas com baixo qP (<0,3), foram observados aumentos progressivos até o final do período experimental, chegando a representar 37% da área da folha.

Figura 11 – Imagem dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* para FNT adaptadas ao escuro: Imagem fotográfica, Rendimento quântico potencial do FSII (F_v/F_m), Fluorescência mínima (F_o) e Fluorescência máxima (F_m), após 3, 6, 12, 24 e 48 horas acumuladas de luz. A imagem fotográfica foi obtida logo após as determinações das imagens da fluorescência. Para cada parâmetro, as imagens de fluorescência foram visualizadas ajustando os valores máximos e mínimos em escalas de cores, variando de 0 a 1, correspondendo respectivamente, ao preto (RGB: 0 0 0) e magenta (RGB: 204 0 204), segundo Munsell (1966).

Figura 12 – Imagem dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* para FNT adaptadas à luz: Absorbância (Abs), Taxa de transporte de elétrons (*ETR*), Coeficiente de dissipação fotoquímica (qP) e Coeficiente de dissipação de energia não-fotoquímica (na forma de calor) (NPQ) após 3, 6, 12, 24 e 48 horas acumuladas de luz. As imagens foram visualizadas idem à Figura 11, com exceção do NPQ, pois para este parâmetro, a imagem corresponde à NPQ/4.

Figura 13 – Imagem dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* para FNT adaptadas à luz: Rendimento quântico efetivo do FSII ($\Delta F/F_m'$), Rendimento quântico de dissipação regulada ($Y(NPQ)$), Rendimento quântico de dissipação não-regulado ($Y(NO)$) e Inibição relativa do FSII (Inh) após 3, 6, 12, 24 e 48 horas acumuladas de luz. As imagens foram visualizadas idem à Figura 11.

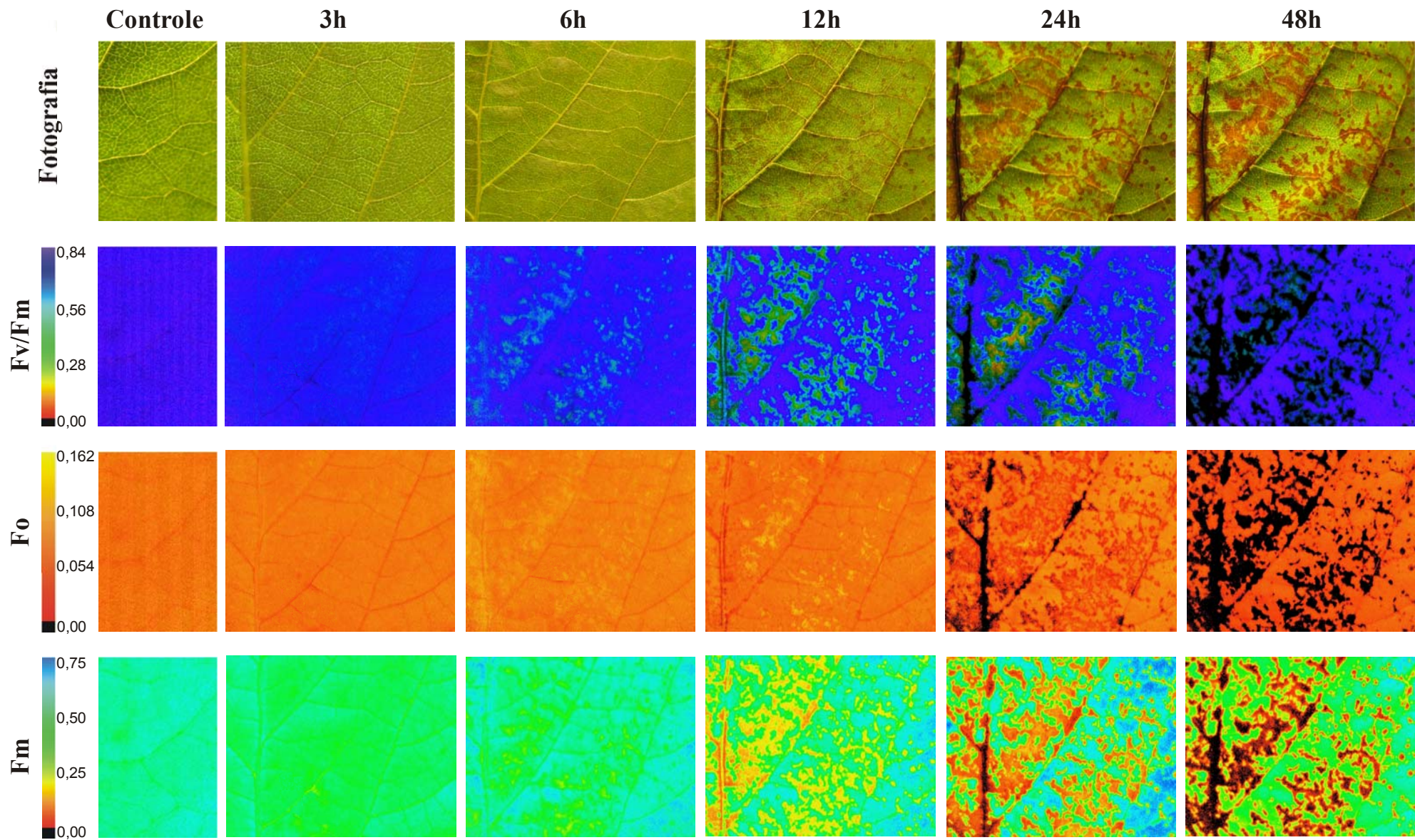


Figura 11

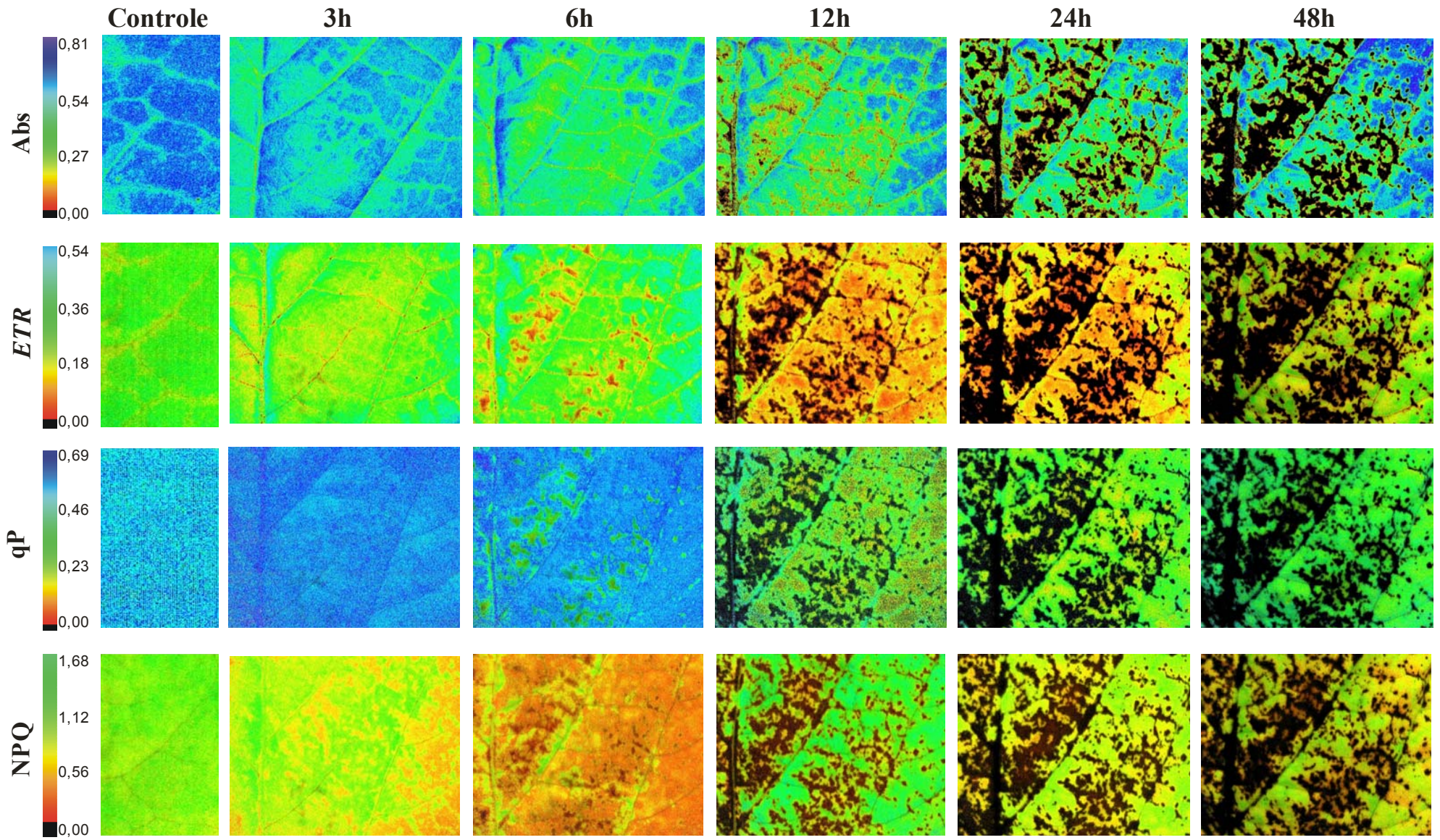


Figura 12

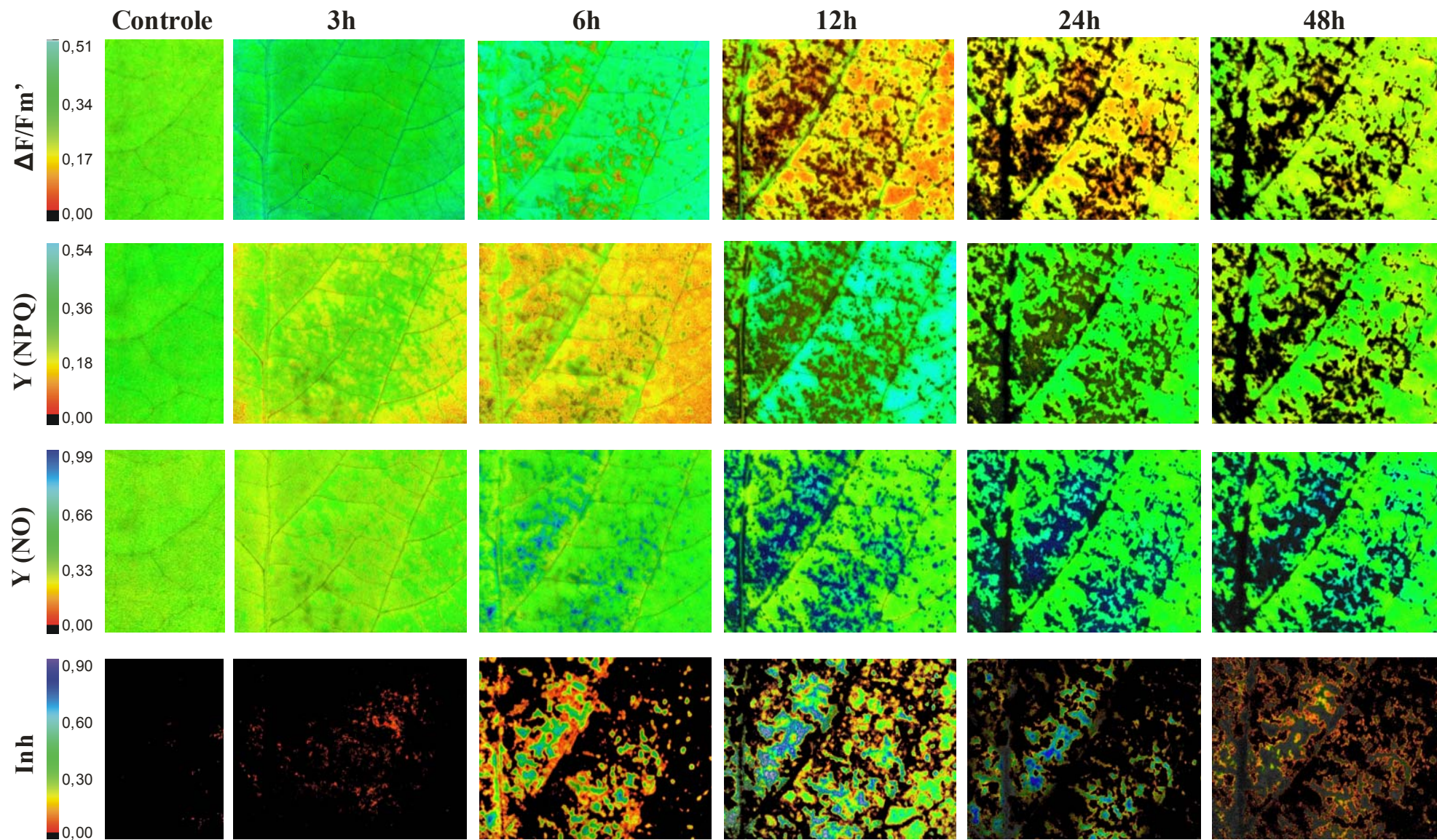


Figura 13

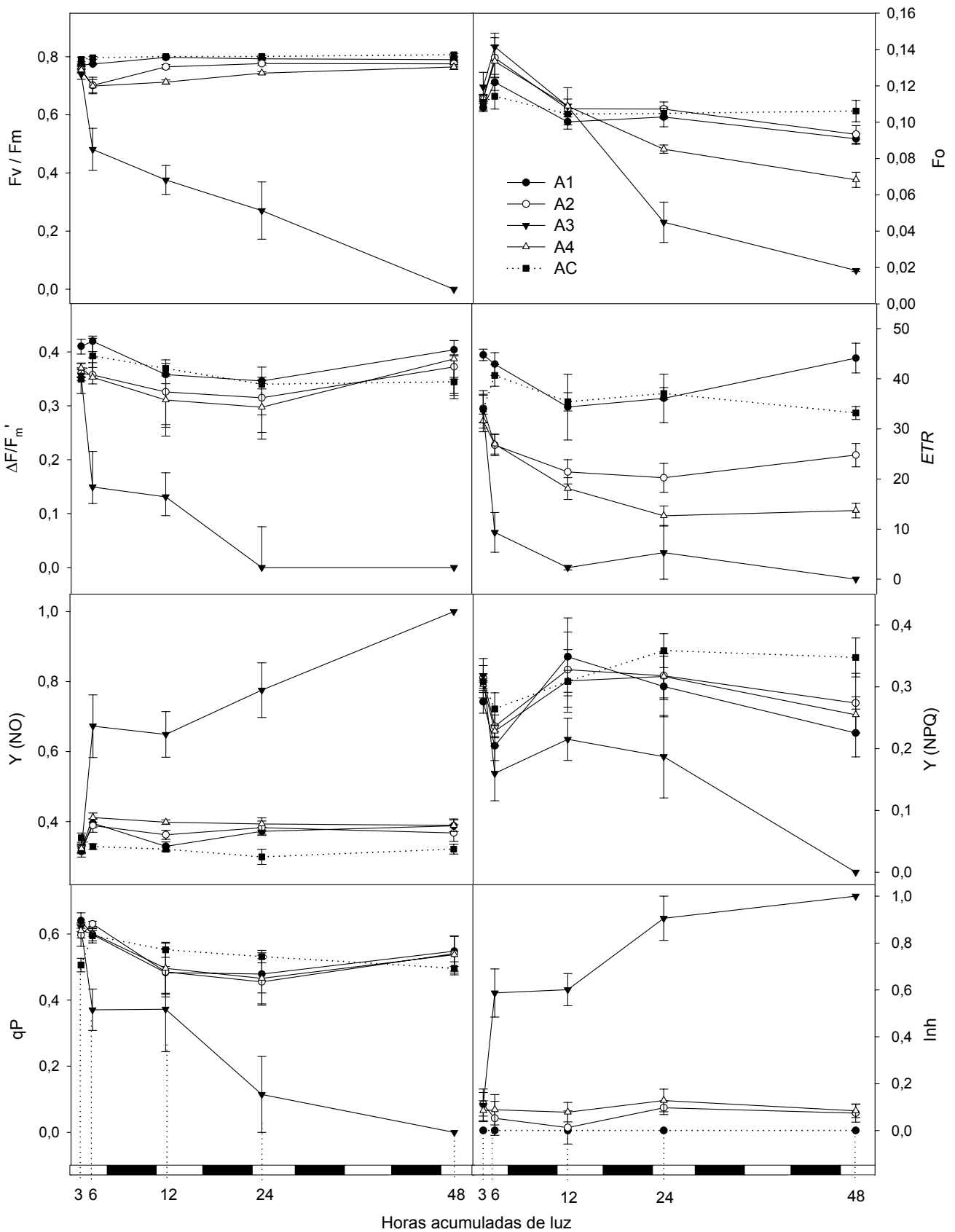


Figura 14 – Evolução do efeito do inibidor em diferentes regiões pré-determinadas na FNT em F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$, $Y(NO)$, qP , F_o , ETR , $Y(NPQ)$ e Inh após 3, 6, 12, 24, e 48 horas acumuladas de luz; A1 (região não afetada), A2 (região moderadamente afetada), A3 (região afetada), A4 (região abrangente) e AC (área controle, obtida na FNC).

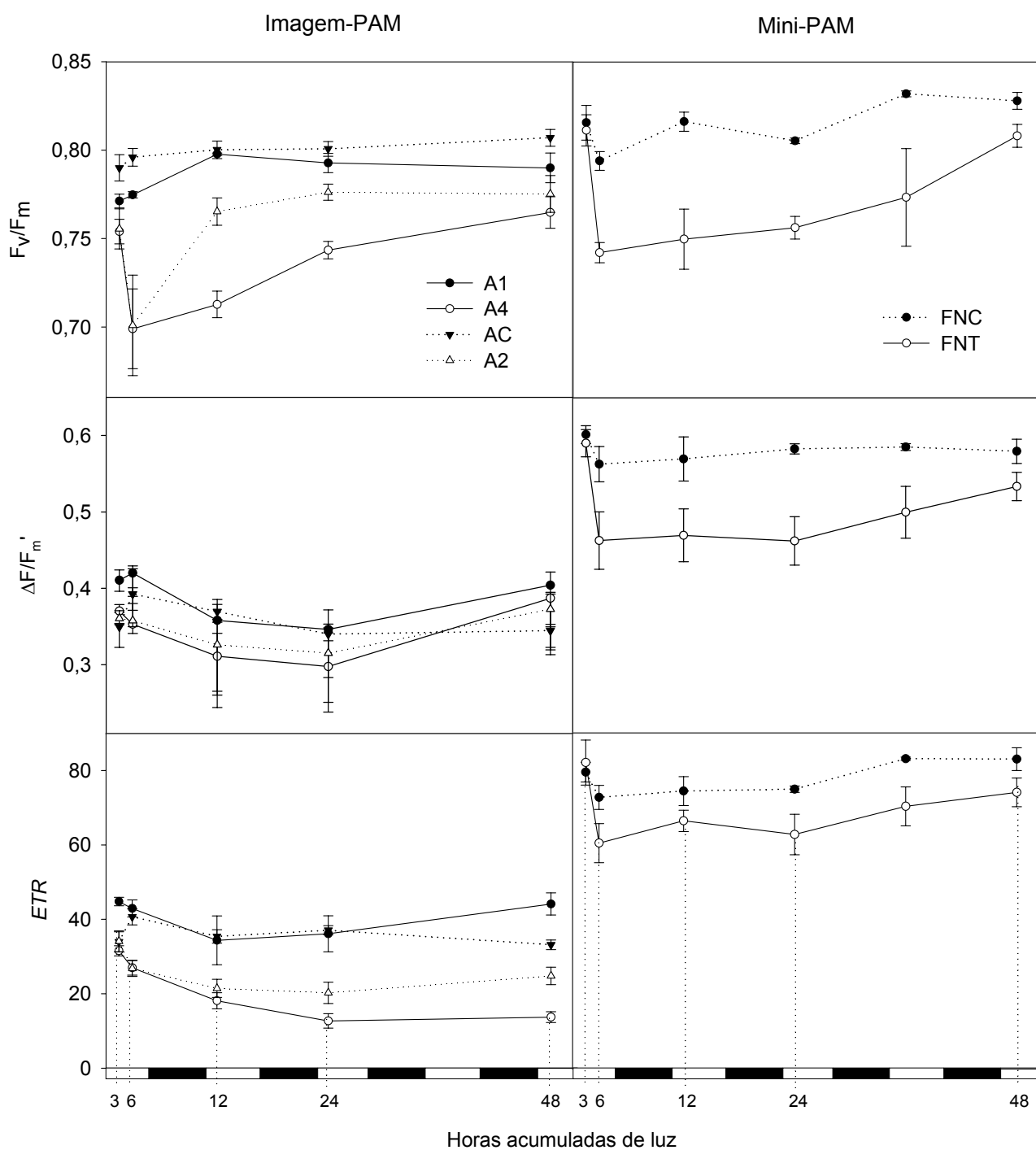


Figura 15 – Comparação dos parâmetros F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$ e ETR obtidos por Imaging-PAM e Mini-PAM no período experimental. A1 (região não afetada), A2 (região moderadamente afetada), A4 (região abrangente) e AC (área controle) obtidos para folhas novas após 3, 6 12 24 e 48 horas acumuladas de luz.

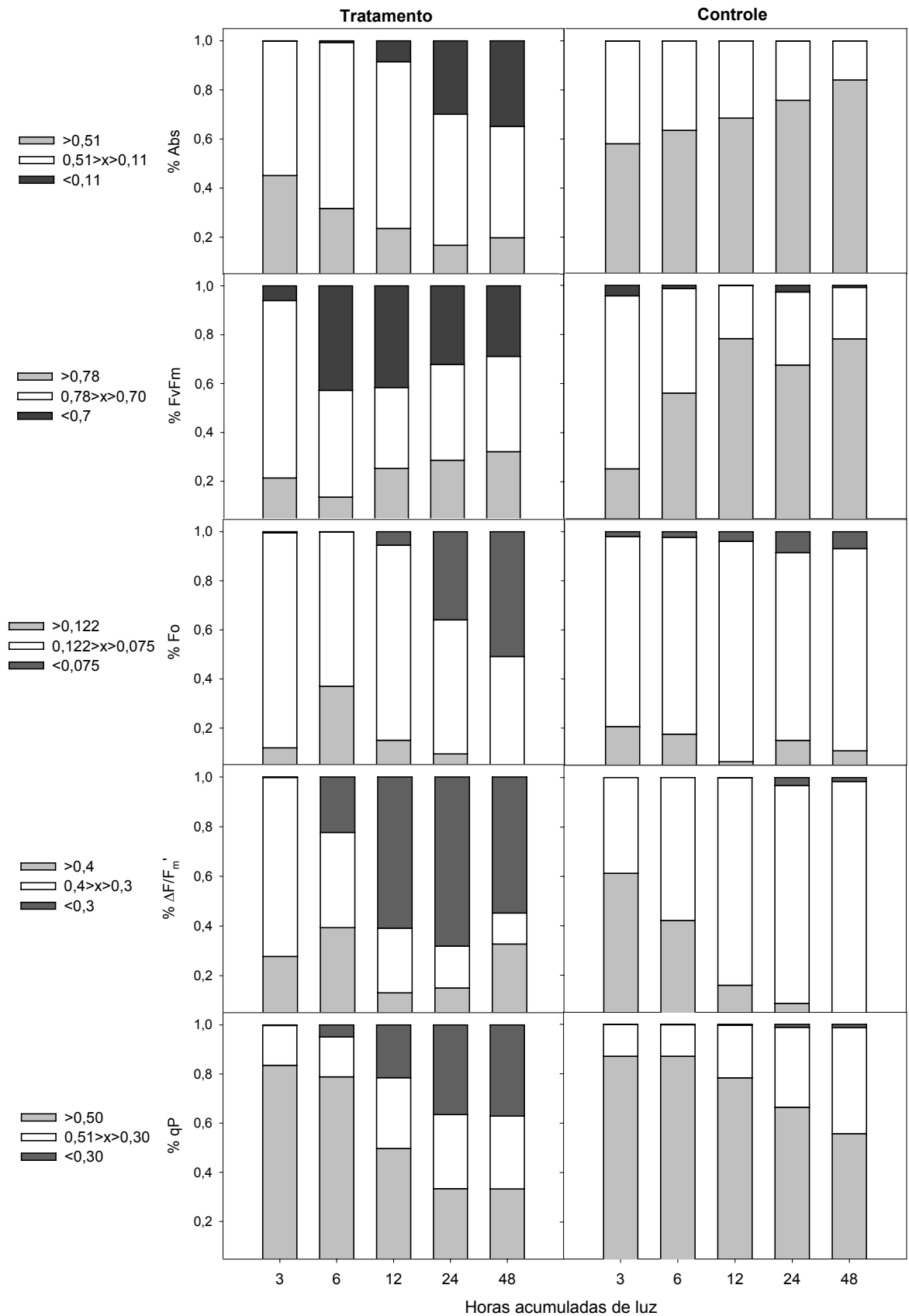


Figura 16 – Porcentagem de área foliar em três intervalos de análise (valores ao lado) em função do tempo, para os parâmetros: absorvância foliar (Abs), rendimento quântico potencial do FSII (F_v/F_m), fluorescência mínima (F_o), rendimento quântico efetivo do FSII ($\Delta F/F_m'$), e, coeficiente de extinção fotoquímico (qP); em folhas novas controle e tratadas com lactofen.

5. DISCUSSÃO

5.1 - Ação da Inibição da PROTOX em Folhas Novas e Maduras

Incrementos da ordem de 40% no teor de clorofila *a* foram observados para FNC após 48 horas de exposição à luz, indicando uma rápida taxa de acúmulo de clorofila, até atingir concentrações de Cl *a* próximas da FMC, apontando uma maior atividade de enzimas correlacionadas à biosíntese de clorofila; porém, para FNT foram observadas reduções nos teores de Cl *a* a partir de 12 horas acumuladas de luz, concomitante a incrementos no extravasamento de eletrólitos. A quantidade de clorofila que as plantas superiores podem acumular, durante um período de luz, é um processo dependente da espécie (Adamson & Packer, 1985) e do estágio de desenvolvimento foliar (Walmsler & Adamson, 1989). A formação de clorofila *a* nas folhas ocorre pelo processo de redução do protoclorofilídeo para clorofilídeo, realizado pela protoclorofilídeo oxidoreductase dependente de luz. Em angiospermas, o acúmulo de clorofila *a* ocorre em 3 fases: (i) fase lag, (ii) fase de acúmulo rápido e (iii) fase estacionária. A duração da fase lag é dependente da idade foliar (Sisler & Klein, 1963; Akoyunoglou & Argyroudi-Akoyunoglou, 1966; Schoejs et al., 1998) sendo maior em folhas novas quando comparadas às folhas maduras. Folhas de *Phaseolus vulgaris* com menos de 5 dias não apresentaram fase lag na biosíntese de clorofila; porém a partir deste estágio, o período da fase lag começa lento e vai tornando-se rápido até atingir um platô (fase estacionária), com aproximadamente 10 dias (Akoyunoglou & Argyroudi-Akoyunoglou, 1969). O período mais lento da fase lag em folhas novas provoca uma persistência do alto conteúdo de protoclorofilídeo *a* remanescente (não-fotoativo), aumentando a sensibilidade dos tecidos ao estresse oxidativo durante a iluminação (Sundqvist, 1969; Schoejs et al., 1998); efeitos semelhantes foram observados pela adição de δ -ALA exógeno no tecido. A maior sensibilidade de folhas novas ao estresse oxidativo, pode estar associada à maior fase lag, sendo uma possível explicação para as diferentes respostas entre folhas novas e maduras tratadas com inibidores da PROTOX.

A severidade do lactofen em folhas de soja com diferentes idades foi observada por Witchert & Talbert (1993), os quais as folhas maduras apresentaram áreas com bronzeamento e eventuais pontos necróticos, enquanto que as folhas novas (em expansão) apresentaram grande porcentagem de áreas necrosadas. Além da fase lag, diferenças na regulação da síntese de clorofila/carotenóide, na estabilidade da clorofila *a* no escuro, após um período de irradiância, e no pool de protoclorofilídeo *a* ester, são características distintas entre folhas novas e maduras (Schoejs et al., 1998). Jiang et al (2006) observaram que folhas novas de soja

exibiram menores A , $A_{\max\text{PAR}}$ e maiores R_1/A comparadas à folhas maduras totalmente expandidas. No presente trabalho, foram observados para FN, maiores valores no rendimento quântico aparente, no ponto de compensação de CO_2 e de luz, na taxa respiratória e fotorrespiratória, concomitantemente a menores valores de fotossíntese e condutância estomática, confirmando as diferenças com relação à maturidade fisiológica entre FN e FM.

Outra possível explicação para as diferentes respostas entre FN e FM tratadas com inibidores da PROTOX é com relação à atividade enzimática, tanto para enzimas envolvidas na biosíntese de clorofila quanto para os outros processos metabólicos, como fixação de N e síntese de açúcares (Turgeon, 1989). Hendry & Stobart (1986) propuseram um método de avaliação do giro da clorofila em folhas de diferentes idades de *Triticum aestivum* L. e *Hordeum vulgare*, e encontraram uma dependência da meia-vida da clorofila com a idade da folha, observando valores abaixo de 16 horas para folhas novas, e de 44 a 73 horas para folhas maduras. A biosíntese de tetrapirrólis é finamente coordenada por ação enzimática (von Wettstein et al., 1995), e o rápido giro da clorofila em folhas novas, poderia estar associado à maior atividade de enzimas, tanto atuando na síntese quanto na degradação, justificando a menor meia vida da clorofila observado por Hendry & Stobart (1986). Como observado na FNC, a atividade de síntese de clorofila a foi mais intensa que a atividade de destruição, apontando um incremento desse pigmento ao final de 48 horas. Para que ocorra a formação de clorofilas, deve também ocorrer uma grande demanda por compostos nitrogenados solúveis para formação do anel pirrólico, sugerindo uma maior atividade enzimática envolvidas no metabolismo de N em folhas novas (Gan, 2007). Se as atividades das enzimas envolvidas na biosíntese de clorofila na FN forem maiores em relação a FM, com a aplicação do lactofen e conseqüente inibição da PROTOX, mais protoporfirinogênio IX poderia acumular fora do cloroplasto, gerando maiores formações de ROS e um estresse oxidativo mais intenso.

Além da diferença na atividade enzimática entre FN e FM, outra possível explicação estaria relacionada às características da cutícula foliar, afetando as taxas de penetração do lactofen na superfície da folha. Todas as folhas possuem cutículas, sendo uma formidável barreira à entrada de herbicidas foliares (Zimdahl, 2007) e folhas novas possuem cutículas mais finas e de composições diferentes em relação às folhas maduras (Riederer & Müller, 2006), sendo uma das razões que plantas velhas são mais tolerantes as aplicações de herbicidas comparadas às plantas novas (Zimdahl, 2007). Nesse sentido, a maior severidade ao estresse oxidativo observado na FN, poderia também estar associado à penetração de maiores quantidades de lactofen comparado à FM. Por isso, o efeito combinado da maior atividade de enzimas envolvidas na síntese de clorofila e maiores taxas de penetração do

lactofen, devido às características da cutícula, resultaria na maior sensibilidade ao estresse oxidativo na FNT, comparada a FMT.

5. 2 - Efeitos na Concentração dos Pigmentos e na Integridade das Membranas

Reduções do teor de pigmentos devido à ação de inibidores da PROTOX foram encontradas por diversos autores (Kunert & Böger, 1981; Witkowski & Halling, 1988; Sherman et al., 1991; Mostowska, et al., 1996; Triphany et al., 2007) como consequência do estresse oxidativo, levando uma redução da maquinaria fotossintética. O inibidor reduziu 25% da concentração inicial de Cl *a* na FNT ao final do experimento, estando de acordo com os resultados encontrados na literatura. Falbel & Staehelin (1996) utilizando plantas mutantes de *Triticum aestivum* L. com um bloqueio parcial da rota biosintética da clorofila, encontraram reduções do conteúdo de clorofila *a* e *b*, redução do complexo coletor de luz (antena), formação de membranas do tilacóide deficientes em grana e acúmulo de pigmentos do ciclo das xantofilas.

Considerando o giro da clorofila mais rápido para FN comparado às FM, devido a uma maior atividade enzimática, isso pode contribuir para um maior acúmulo de protoporfirinogênio IX fora do cloroplasto quando a PROTOX é inibida, acarretando em maiores taxas de formação de ROS e maior severidade do estresse oxidativo quando na presença de luz (Jacobs et al, 1991). A inibição da síntese de clorofila foi observada em ambas as folhas tratadas, porém o efeito foi mais pronunciado nas folhas novas. As horas acumuladas de luz causaram uma diminuição progressiva nos teores de pigmentos, possivelmente devido à maior geração de protoporfirina IX instável, acarretando maiores concentrações de ROS. Ao final de 48 horas, foram observadas reduções nos teores de carotenóides em ambas as folhas tratadas e a concentração de clorofila *a* na FNT foi 41 % inferior ao controle.

Quando folhas são tratadas com inibidores da PROTOX, o primeiro dano detectável é o extravasamento celular, seguido da inibição da fotossíntese, liberação de etileno e etano, produção de aldeído malônico (MDA) e destruição dos pigmentos do cloroplasto (Kenyon et al., 1985), características do “efeito fotodinâmico” destes inibidores na peroxidação das membranas. O maior extravasamento de eletrólitos, encontrado para FNT, foi observado no período entre 3 e 6 horas de exposição à luz, resultados semelhantes foram observados por Kenyon et al. (1985), Duke & Kenyon (1986) e Matringe & Scalla (1988). Inibidores da PROTOX podem ser rapidamente detectados pela mensuração do aumento da condutividade

eletrolítica na solução (Koo et al, 1994; Vanstone & Stobbe, 1997; Yanase et al., 1990). Li et al. (2000) estudaram o extravasamento de eletrólitos em diferentes variedades de soja causado por sulfentrazone, outro inibidor da PROTOX, e observaram um aumento no dano celular, em resposta, tanto da intensidade da luz quanto da concentração do inibidor.

As aplicações foliares desses inibidores originaram áreas afetadas e não afetadas na superfície da folha (ação de contato), não apresentando efeito em outras partes da planta. Murata et al. (2004) sugeriram que o acúmulo de protoporfirinogênio IX em plantas intactas poderia ser a primeira resposta biológica após aplicação foliar de inibidores da PROTOX. Em estudos com estes inibidores, em cotilédones de *Cucumis sativus* L., no nível ultra-estrutural, o tonoplasto e a plasmalema são geralmente as primeiras membranas a se romper como resultado da geração de ROS, em resposta ao acúmulo de protoporfirinogênio IX (Kenyon et al., 1985). Primeiramente ocorre a formação de citoplasma vesiculado, seguido do rompimento do tonoplasto. A perda da densidade citoplasmática, devido ao extravasamento do conteúdo do vacúolo, inicialmente não afeta o cloroplasto, porém à medida que avança o estresse oxidativo, a membrana plasmática é rompida e os cloroplastos são danificados, alterando seu estado funcional e estrutural, devido a mudanças no potencial osmótico (Kenyon et al., 1985; Duke & Kenyon, 1986). Mostowska et al. (1991; 1996) encontraram severa perda da turgescência, inibição da fotossíntese e mudanças na estrutura celular, como protuberância dos tilacóides, dilatação do retículo endoplasmático, degeneração das membranas internas da mitocôndria e desorganização do envelope cloroplastídico, em tecidos tratados com inibidores da síntese de clorofilas, após 4 horas de iluminação. Os autores sugerem uma ligação entre a rápida inibição da fotossíntese e as deformações ultra-estruturais, causados por mudanças na permeabilidade das membranas.

5.3 - Efeitos nas Trocas Gasosas e Fotorrespiração

Não foram observadas diferenças em A entre os tratamentos para o período de 3 horas de irradiância. Porém, a partir de 6 horas de irradiância, reduções em A , g_s e E foram observadas, concomitantemente a aumentos do extravasamento de eletrólitos, sem reduções significativas nos teores de clorofila. A e E diminuíram principalmente devido ao rápido fechamento estomático, corroborando com Wichert & Talbert (1993), os quais apontaram que lactofen reduziu a condutância estomática após 6 horas da aplicação foliar em soja e *Portulaca oleracea* L. cultivadas em campo. Com o rompimento da membrana plasmática nas células afetadas, comprovado pela elevada taxa de extravasamento de eletrólitos, pode estar ocorrendo uma deficiência hídrica devida à diminuição do potencial osmótico nas células

adjacentes (Mostowska et al., 1991, 1996; Opanasenko et al., 1999). Este efeito poderia estimular um aumento da ação do ácido abscísico (ABA), acarretando um rápido fechamento estomático entre 3 e 6 horas de exposição à luz, reduzindo A antes da perda da integridade dos cloroplastos e do aparecimento de necroses. A Mg-protoporfirina é formada pela ação da Mg-quelatase, enzima composta de três sub-unidades: CHLD, CHLI e CHLH (Walker & Willows, 1997). Segundo Wang & Zhang (2008) a sub-unidade CHLH está envolvida na percepção de ABA como um receptor, possuindo um papel importante na sinalização entre plastídios e núcleo. Se ocorrer um aumento do estresse osmótico nas células afetadas pela aplicação do lactofen, concomitantemente a um aumento nos níveis de ABA, o aumento da sinalização devido à inibição da formação de Mg-protoporfirina poderia estar envolvido no mecanismo de fechamento estomático observado na FNT após 6 horas acumuladas de luz. Uma evidência encontrada apontando um possível acúmulo de ABA foi a diminuição da concentração de carotenóides, pois Qin & Jad (1999) sugeriram que a quebra oxidativa das xantofilas é um importante passo regulatório para acúmulo de ABA em plantas de *Phaseolus vulgaris* sob estresse hídrico, estando o gene *PvNCEDI* envolvido nessa resposta.

Outra possível explicação para a redução na g_s , após 6 horas acumuladas de luz, seria um envolvimento do óxido nítrico (NO) em resposta ao estresse oxidativo. NO é uma molécula chave na sinalização em plantas, mediando respostas a vários estresses bióticos e abióticos (Delledonne et al., 1998; Clarke et al., 2000; Beligni & Lamattina, 2001). O fechamento estomático em resposta ao ABA é mediado por uma complexa rede de sinalização, envolvendo Ca^{2+} e vias dependes de Ca^{2+} , ativados por vários intermediários sinalizadores, incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), lipídeos e NO (Assmann & Shimazaki, 1999; Mata & Lamattina, 2001; Webb et al., 2001). Na célula guarda, NO endógeno é sintetizado, tanto pela redutase do nitrato quanto pelo sintetase do óxido nítrico, dependendo da espécie e da condição fisiológica; o efeito do NO no fechamento estomático tem sido recentemente confirmado (Lamattina & Polacco, 2007). Com o estresse oxidativo causado pela aplicação de lactofen, a concentração de NO poderiam incrementar-se e também sinalizar o mecanismo de fechamento estomático observado no presente trabalho.

À medida que aumenta o estresse oxidativo em função do tempo de exposição à luz, os tilacóides são danificados e perdem sua capacidade de realizar fotossíntese, devido a danos na maquinaria fotoquímica (Tripathy et al., 2007). Após 12 horas acumuladas de luz, as taxas fotossintéticas de folhas novas e maduras comportaram-se de forma distinta em resposta ao inibidor, sob diferentes níveis de luz (300 e 1000 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na curva A/C_i . Segundo Long et al. (1994), o aumento da intensidade luminosa na curva A/C_i aumenta A devido à

redução da limitação pelo processo de regeneração do substrato (RuBP) para Rubisco, estimulando uma maior demanda de elétrons para suportar maiores taxas de fixação de CO_2 . Com exceção da FNT, foram observados aumentos significativos em A_{maxCO_2} , concomitantemente a aumentos em V_{max} e J_{max} com incrementos do PAR na curva A/C_i . Sob baixa irradiância e numa situação em que a Rubisco não é danificada, a A é limitada devido à falta de poder redutor (ATP e NADPH) necessários para regeneração do substrato no ciclo de Calvin, comparados a uma condição de alta irradiância (Cure & Acock, 1986; Long et al., 1994; Hay & Poter, 2006). Porém, na FNT a redução de A_{maxCO_2} foi observada devido a danos na Rubisco, pois a taxa de carboxilação não foi incrementada com o aumento da irradiância, concomitantemente a reduções em V_{max} e J_{max} , apontando redução na demanda de poder redutor para o processo fotossintético. Além disso, aumentos significativos em Γ_{CO_2} foram observados na FNT devido à diminuição de A , acarretando aumentos do substrato não utilizado para fixação, outra indicação de danos na Rubisco, diminuindo sua capacidade de carboxilação.

Altos níveis de C_i na curva A/PAR reduzem as limitações de resistência estomática para o processo fotossintético (Long et al., 1994). Com exceção da FNT, todos os tratamentos incrementaram A_{maxPAR} sob concentração saturada de CO_2 , comparado à concentração ambiente. O severo dano ao FSII frequentemente decresce A_{maxPAR} (Tenhunen et al., 1984; Quick et al., 1992; Cheeseman & Lexa, 1996), confirmando o efeito nas FNT, os quais não apresentaram respostas ao incremento de C_i na curva A/PAR , reduzindo A_{maxPAR} e α quando comparados ao controle; ao diminuir a clorofila, a quantidade de CO_2 para fixação demandará maior quantidade de energia, aumentando assim, o Γ_{PAR} . Estas observações confirmam a ocorrência de danos bioquímicos na maquinaria fotossintética, reduzindo a fixação de CO_2 pela Rubisco, em folhas novas tratadas com inibidores da PROTOX.

Considerando-se que, a fixação fotossintética de CO_2 seja um evento difusivo (Loreto et al., 1992), limitações estomáticas (L_s) e mesofílicas (L_m) podem atuar como importantes barreiras ao CO_2 até o sítio de carboxilação no cloroplasto. Como discutido anteriormente, o acúmulo de compostos tetrapirrólicos causado por inibidores da PROTOX na presença de luz, gerou um extravasamento de eletrólitos em tecidos sensíveis e um rápido fechamento estomático, aumentando as resistências difusivas para o CO_2 . Por isso, na FNT tanto L_s quanto L_m foram incrementadas independentes da intensidade luminosa utilizada. Estes resultados apontam uma maior sensibilidade da FN ao efeito de inibidores da PROTOX, e que, além de ocorrerem limitações bioquímicas, também limitações mesofílicas contribuem para diminuição das trocas gasosas para nível foliar.

A utilização de curvas de respostas à luz nos parâmetros de fluorescência proporcionou uma análise detalhada de características que não são possíveis de quantificação com medições momentâneas em luz ambiente (Rascher et al., 2000). Observou-se reduções significativas em ETR e no $\Delta F/F_m'$ em função da luz apenas para FNT, devido a uma redução da demanda de poder redutor para o processo fotossintético, acarretando reduções também em Φ_e . Se diminuir a utilização do poder redutor no ciclo de Calvin, concomitante a uma redução na condutância estomática, possivelmente pode ocorrer aumentos nas taxas fotorrespiratórias em folhas tratadas com inibidores da síntese de clorofila. A fotorrespiração é a atividade oxigenativa da Rubisco, observada principalmente em plantas C3, que acarreta em perdas de CO_2 dependente de luz (Canvin, 1979; Husic et al., 1987; Ogren, 1984). As taxas fotorrespiratórias (R_1) aumentam quando a relação CO_2/O_2 diminui, causadas tanto por fechamento estomático quanto pelo aumento da temperatura foliar (Muraoka et al., 2000). Sugere-se que os inibidores da PROTOX podem incrementar as taxas fotorrespiratórias na FM devido ao rápido fechamento estomático, diminuindo a relação CO_2/O_2 ; porém, o intenso estresse oxidativo observado na FNT diminui a atividade da Rubisco, afetando tanto a capacidade carboxilativa quanto a oxigenativa. Após 12 horas de irradiância, a FMT não apresentou sintomas visuais de dano (necroses) devido à ação do inibidor, tampouco reduziu a atividade carboxilativa da Rubisco, observado pelos valores de A_{maxCO_2} , $V_{c,max}$ e J_{max} semelhantes ao controle; porém observou-se reduções em A e g_s , incrementando R_1 em 1,2 vezes quando comparado ao controle, representando 32% da taxa fotossintética. Concomitantemente ao aumento de R_1 , a taxa de transporte de elétrons estimada para o processo carboxilativo (J_c) reduziu, enquanto que para o processo oxigenativo (J_o) incrementou, mas o J_t (taxa de transporte de elétrons total para A e R_1) não diferiu do controle. Com a redução da g_s na FMT, a disponibilidade do CO_2 para o ciclo de Calvin irá diminuir, acarretando numa subutilização de NADPH e ATP, que poderia estar sendo desviado para a rota fotorrespiratória como um mecanismo de proteção frente ao excesso de poder redutor. Osmond & Björkman (1972) e Osmond (1981) sugerem que a fotorrespiração pode contribuir para proteção do sistema fotossintético, reduzindo os efeitos deletérios causados por altas irradiâncias sob baixo C_i . Com relação à FNT, após 6 horas de luz a redução na g_s foi mais pronunciada de que na FMT; porém após 12 horas acumuladas de luz observaram-se reduções na atividade carboxilativa da Rubisco, apresentando reduções em $V_{c,max}$ e na concentração de clorofila a comparados ao controle, acarretando em menores valores de ETR_{max} e $\Delta F/F_m'_{max}$. Como a folha nova apresentou maior sensibilidade frente à inibição da PROTOX comparado à FMT, o aumento da R_1 não foi suficiente para proteger contra os danos oxidativos, acarretando no surgimento de necroses e morte do tecido, à medida que incrementava o ROS

em função da quantidade de horas acumuladas de luz. Nesse caso, a baixa captação de energia pela redução concentração de clorofila *a*, concomitante à baixa utilização do CO₂ devido ao fechamento estomático e também ao dano na Rubisco acarretaram reduções significativas em *A*, ocasionando uma alta relação R_1/A na FNT comparado ao controle.

5. 4 - Efeitos na Fluorescência da Clorofila *a*

A fluorescência da clorofila *a* tem sido utilizada como uma ferramenta efetiva e não-destrutiva para elucidar vários aspectos relacionados ao estado fisiológico da maquinaria fotossintética, em folhas intactas de plantas superiores (Krause & Weis, 1991). Alterações significativas nos parâmetros de fluorescência foram observadas apenas na FNT a partir do período de 6 horas. O rendimento quântico potencial (F_v/F_m) dos tratamentos no início do período experimental (3 horas) foram superiores a 0,81, indicando ausência de fotoinibição. Após 6 horas, foram observadas reduções no F_v/F_m para FNT, concomitantemente à reduções na fluorescência máxima (F_m) e incrementos na fluorescência mínima (F_o). Tripathy et al. (2007) sugeriram que incrementos em F_o , devido ao efeito de inibidores da PROTOX, estariam relacionados a redução da transferência de energia de excitação, do complexo antena do FSII para os centros de reação. Peltier & Cournac (2002) relacionaram a F_o com o estado redox da quinona (Q_A), primeiro acceptor do FSII. Em folhas de soja sob estresse luminoso, Hong & Xu (1999) sugeriram que aumentos de F_o , concomitante a reduções no F_v/F_m , poderiam atuar como um eficiente mecanismo de dissipação da energia, devido à inativação reversível do FSII (fotoinibição dinâmica), protegendo os centros de reação aos fotodanos irreversíveis. Porém, à medida que o estresse oxidativo avança na FNT, F_o reduz linearmente a partir de 12 horas de irradiância, concomitantemente a reduções de F_m e F_v/F_m , indicando ocorrência de danos no centro de reação do FSII. Ao final de 48 horas de luz observou-se incrementos em F_m que, juntamente com a redução em F_o , contribuíram para um aumento significativo em F_v/F_m . Haworth & Hess (1988) observaram que inibidores da PROTOX causam uma rápida, forte e inespecífica redução em F_m , indicativo da peroxidação de membranas. Como o inibidor foi aplicado via pulverização foliar, o espectro de gotas formado pode ter causado o surgimento de regiões afetadas e sadias no tecido foliar, possibilitando uma ocorrência de acúmulo de clorofila nas regiões não afetadas, aumentando a quantidade de centros de reação ativos do FSII, justificando esse ligeiro aumento em F_m . Porém, na região afetada essa tendência não poderia ser observada, devido à morte do tecido foliar. Estudos recentes mostraram reduções significativas na atividade fotoquímica em membranas de tilacóide (*Cucumis sativus*) tratadas com inibidores da PROTOX, após várias horas na

presença de luz (Tripathy et al., 2007). Sugere-se que esse aumento de F_v/F_m pode estar relacionado com os baixos níveis de F_o , principalmente na região necrosada, gerando uma “falsa” recuperação nos níveis de F_v/F_m , visto que F_v é a diferença entre F_m e F_o . Se o F_o reduzir a valores muito baixos, o valor do F_v/F_m aumentará pois F_m está tanto no divisor quanto no denominador dessa relação.

O rendimento quântico efetivo do FSII ($\Delta F/F_m'$) e a taxa de transporte de elétrons (*ETR*) apresentaram respostas distintas do controle apenas para FNT, em função do tempo. Semelhantemente ao F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$ e *ETR* foram reduzidos entre o período de 6 e 24 horas, devido a geração de ROS, semelhante aos resultados encontrados por Tripathy et al. (2007) sugerindo que a diminuição de *ETR* pela geração de 1O_2 via reação de fotossensibilização (tipo II), afetando a atividade do FSI e FSII. Porém, após 48 horas, $\Delta F/F_m'$ e *ETR* incrementaram sem alterações nas trocas gasosas, que permaneceram baixas. Essa tendência de aumento ao final de 48 horas em $\Delta F/F_m'$ e *ETR* pode estar também relacionado à uma recuperação da região foliar não atingida pelo inibidor.

5.5 - Efeitos na Imagem da Fluorescência da Clorofila *a*

A fluorescência da clorofila tem sido usada como um método rápido e não-invasivo de monitorar o desempenho fotossintético (Baker & Rosenqvist, 2004). Com o desenvolvimento de equipamentos capazes de captar o sinal heterogêneo da fluorescência sob a superfície foliar, a geração de imagens dos parâmetros de fluorescência contribuiu para um maior entendimento na dinâmica com que determinados estresses podem afetar a superfície foliar (Oxborough, 2004). A utilização de imagens da fluorescência contribuiu para analisar diferentes regiões numa mesma folha, facilitando o entendimento do efeito de inibidores da PROTOX em função do tempo. Trabalhos correlacionando imagem da fluorescência, estresse oxidativo e fotossíntese têm sido realizados por Fryer et al. (2002) e Hideg & Schreiber (2007). Neste trabalho, utilizando regiões pré-determinadas (RPD), com exceção de F_o , para todos os parâmetros analisados as regiões A1 e AC não diferiram entre si, independentes do tempo de exposição à irradiância, apontando que o espectro de gotas utilizado na aplicação do inibidor criou regiões afetadas e não afetadas na superfície foliar. Se existe regiões saudáveis na FNT, então, a maquinaria fotossintética nessas áreas não foi afetada. Regiões A2 apenas distinguiram de AC para os parâmetros F_o e *ETR*, pois, sendo uma área de transição, a maquinaria fotossintética poderia estar sendo moderadamente afetado, não acarretando em reduções significativas, visto que o $\Delta F/F_m'$ não apresentou redução.

Com relação à região A3, todos os parâmetros foram afetados com o aumento da irradiância, mostrando que o tecido fotossintético foi severamente danificado, não observando recuperação das áreas afetadas pelos inibidores da PROTOX. Vass et al. (1992) e Aro et al (1993) sugerem que o $^1\text{O}_2$ estaria envolvido no dano à proteína D1 no centro de reação do FSII. O F_v/F_m , F_0 , $\Delta F/F_m'$, ETR , $Y(\text{NPQ})$ e qP da região A3 reduziram a valores próximos de zero ao final de 48 horas, enquanto $Y(\text{NO})$ e Inh incrementaram até valores próximos de 1. Segundo Klughammer & Schreiber (2008), o $Y(\text{NO})$ reflete a fração da energia que é dissipada na forma de calor e fluorescência (perdas constitutivas) principalmente quando os centros de reação do FSII estão fechados (ou danificados). Como os inibidores da PROTOX causam um forte estresse oxidativo à medida que aumenta o tempo de exposição à luz, o incremento observado em $Y(\text{NO})$ aponta que a energia que chega ao complexo antena não estaria sendo transmitida para Q_A ; sendo assim, as imagens de $Y(\text{NO})$ apontam as regiões na superfície foliar em que ocorre formação de ROS, danificando os centros de reação do FSII. O $Y(\text{NPQ})$ corresponde a fração de energia dissipada na forma de calor que é regulada como um mecanismo de fotoproteção, os quais altos valores de $Y(\text{NPQ})$ indicam alta capacidade de fotoproteção. Nas regiões A3, o $Y(\text{NPQ})$ diminuiu significativamente até valores próximos de zero ao final de 48 horas de luz, indicando uma perda total da capacidade de fotoproteção devido à ação dos inibidores da PROTOX, inabilitando essa região de proteger-se contra um estresse luminoso. Se está ocorrendo diminuição do qP , o $\Delta F/F_m'$ também irá diminuir, concomitante a um aumento da fotoinibição do FSII; conseqüentemente, os valores de $Y(\text{NO})$ serão incrementados enquanto que os de $Y(\text{NPQ})$ serão reduzidos. Sendo assim, regiões na folha que foram afetadas por inibidores da PROTOX não apresentaram tendência de recuperação, semelhantemente aos resultados encontrados por Hideg & Schreiber (2007), os quais sugerem que a utilização da energia para os processos fotossintéticos e a capacidade de dissipação do excesso de energia na maquinaria fotossintética são afetadas por ROS, diminuindo o rendimento fotoquímico. Ao evoluir para necroses, as regiões A3 não apresentaram sinais de fluorescência, reduzindo a absorvância e a capacidade de realizar fotossíntese.

Ao observarem os valores de F_v/F_m na FNT obtido pelo Mini-PAM e compará-los com as regiões pré-determinadas A4 obtidas pelo Imaging-PAM (Figura 15), ambas apresentaram uma cinética de fluorescência semelhante, enquanto que as regiões não afetadas (A1 e AC) não variaram. Assim, sugere-se que a região afetada pelo inibidor (A3) reduz tanto a fluorescência, a ponto de ocorrerem perdas de captação do sinal, e deste modo, os incrementos observados nas regiões A4 para o parâmetro F_v/F_m podem ser o resultado de uma

maior participação do sinal de fluorescência das áreas não afetadas (A1). O mesmo comportamento foi observado para o $\Delta F/F_m'$, apontando incrementos tanto nas regiões A4 quanto na A1 ocorreram ao final de 48 horas de luz. Os menores valores de $\Delta F/F_m'$ e *ETR* obtidos pelo Imaging-PAM são devidos à utilização de luz actínica (azul) no comprimento de onda 470nm, enquanto no Mini-PAM utiliza-se com pico máximo de 650nm; outra característica distinta é que o Imaging-PAM obtém o valor real da absorbância foliar para o cálculo de *ETR*, enquanto que no Mini-PAM esse valor é pré-estabelecido em 0,84, superestimando os valores de *ETR* em folhas com baixa absorbância. Outra diferença observada foi com relação à faixa de frequência para obtenção de F_o , F_m , F e F_m' entre os fluorômetros (Mini-PAM: 0,6-20 kHz; Imaging-PAM: 1-8 Hz). Porém, o objetivo de utilizar diferentes fluorômetros modulados não foi compará-los, e sim integrar as informações obtidas por ambos, contribuindo para o melhor entendimento da cinética de fluorescência após aplicação do lactofen.

A obtenção de porcentagens de áreas sadias e afetadas na superfície foliar atingida pelo espectro de gotas do inibidor apontou um aumento significativo de áreas com baixos valores de Abs, F_v/F_m , F_o , $\Delta F/F_m'$ e qP na FNT ao final de 48 horas, indicativo do aparecimento de regiões necróticas. Áreas com Abs abaixo de 0,5 representaram 85% da superfície foliar na FNT, justificando a baixa atividade fotossintética nas áreas afetadas. As áreas da FNT com intervalos de valores intermediários, de modo geral, diminuíram após 48 horas devido ao aumento da porcentagem de áreas com baixos ou altos valores. Ao analisar a porcentagem das áreas dos intervalos de valores para Abs, observaram-se aumentos de áreas com valores abaixo de 0,1 e diminuição das áreas com valores acima de 0,5 após 48 horas de luz na FNT; porém na FNC observaram-se aumentos significativos nas áreas com valores de Abs acima de 0,5, provavelmente devido ao acúmulo de clorofila *a* ao final de 48 horas. Com relação ao F_o , foram observadas incrementos na porcentagem de área com valores acima de 0,122 no período de 6 horas de luz. Como discutido anteriormente, esse aumento pode estar relacionado à uma inativação do FSII como um mecanismo de minimizar a pressão de excitação sobre a maquinaria fotossintética. Porém, a partir de 12 horas de luz, observou-se aumentos nas áreas de baixo F_o e redução de áreas com alto F_o , indicando efeito do estresse oxidativo sobre os pigmentos antena.

6. CONCLUSÕES

A aplicação do lactofen em plantas de soja apresentou resposta distinta em função da idade fisiológica das folhas, afetando o giro da clorofila *a* na sua fase de síntese e induzindo um estresse oxidativo. Folhas novas tratadas (FNT) foram mais sensíveis à inibição da PROTOX comparado a folhas maduras tratadas (FMT). Após 6 horas acumuladas de luz, a FNT apresentou variações significativas em vários parâmetros com relação ao controle, como diminuição da concentração de clorofila *a* e carotenóides, aumento do extravasamento de eletrólitos, reduções nos parâmetros fotossintéticos e na fluorescência da clorofila *a*. Após 12 horas, foi detectada redução da atividade carboxilativa da Rubisco na FNT, devido ao aumento do estresse oxidativo nas áreas em contato com o inibidor, assim como o aumento das taxas fotorrespiratórias. A diminuição dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* indicou que o complexo-antena foi danificado na FNT, diminuindo o fluxo de energia na cadeia transportadora de elétrons e a fase fotoquímica da fotossíntese. Ao final de 48 horas ocorreu perda na captação do sinal de fluorescência nas áreas necróticas, porém, as áreas circunvizinhas às afetadas não apresentaram alterações com a aplicação do lactofen, permanecendo com a maquinaria fotossintética intacta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamson, H. Y.; Hiller, R. G.; Walmsley, J. (1997) Protochlorophyllide reduction and greening in angiosperms: an evolutionary perspective. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41: 201-221.
- Adamson, H. Y.; Packer, N.; Gregory, J. (1985) chloroplast development and the synthesis of chlorophyll and protochlorophyllide in *Zoster* transferred to darkness. *Planta* 165: 469-476.
- Ahrens, W. H.; Arntzen, C. J.; Stoller, E. W. (1981) Chlorophyll fluorescence assay for the determination of triazine resistance. *Weed Science* 29: 316-322.
- Akoyunoglou, G.; Argyroudi-Akoyunoglou, J. H. (1966) Effects of intermittent and continuous light on the chlorophyll formation in etiolated plants at various ages. *Physiologia Plantarum* 22: 288-295.
- Aro, E-M.; Vigin, I.; Andersson, B. (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143: 113-134.
- Assmann, S. M.; Shimazaki, K-I. (1999) The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiology* 119: 809-815.

- Baker, N. R.; Rosenqvist, E. (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55: 1607-1621.
- Baker, N. R. (2008) Chlorophyll fluorescence: A Probe of Photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59: 89-113.
- Beligni, M. V.; Lamattina, L. (2002) Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant Cell Environment* 25: 737-748.
- Bilger, W.; Schreiber, U.; Bock, M. (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102: 425-432.
- Bilger, W.; Björkman, O. (1990) Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25: 173-185.
- Canvin, D. T. (1979) Comparison between C₃ and C₄ plants. In *Encyclopedia of Plant Physiology* (eds: Gibbs, M.; Latzko, E.) Dordrecht: Springer-Verlag, Berlin, p. 368-396.
- Chapin, F. S.; Bloom, A. J.; Field, C., B.; Waring, R. H. (1987) Plant responses to multiple environmental factors. *BioScience* 37: 49-57.
- Cheeseman, J. M.; Lexa, M. (1996) Gas exchange: model and measurements. In *Photosynthesis and the Environment*, (ed: Baker, N. R.) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 223-240.
- Christoffoleti, P. J. (2004) Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. *Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas* (HRAC-BR), 100p.
- Clarke, A.; Desikan, R.; Hurst, R.; Hancock, J. T.; Neill, S. J. (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *The Plant Journal* 24: 667-677.
- Cure, J. D.; Acock, B. (1986) Crop responses to carbon dioxide doubling: a literature survey. *Agricultural Forest and Meteorology* 38: 127-145.
- Delledonne, M.; Xia, Y.; Dixon, R. A.; Lamb, C. (1998) Nitric oxide signal functions in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- Duke, S. O.; Kenyon, W. H. (1986) Photosynthesis is not involved in the mechanism of action of acifluorfen in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiology* 81: 882-888.
- Ehleringer, J. (1981) Leaf absorptances of Mohave and Sonoran desert plants. *Oecologia* 102: 366-370.
- Escalona, J. M.; Flexas, J.; Medrano, H. (1999) Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 421-433.

- Falbel, T. G.; Meehl, J. B.; Staehelin, L. A. (1996) Severity of mutant phenotype in a series of chlorophyll-deficient wheat mutants depends on light intensity and the severity of the block in chlorophyll synthesis. *Plant Physiology* 112: 821-832.
- Farquhar, G. D.; Sharkey, T. D. (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review Plant Physiology* 33: 317-345.
- Feedtke, C. (1979) Physiological responses of soybean (*Glycine max*) plants to metribuzin. *Weed Science* 27: 192-195.
- Fehr, W. R.; Caviness, C. E.; Burmood, D. T.; Pennington, J. S. (1971) Stages of development descriptions for soybeans, *Glycine max* L. Merrill. *Crop Science* 11: 929-931.
- Frankart, C.; Eullaffroy, P.; Vernet, G. (2003) Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. *Environmental and Experimental Botany* 49: 159-168.
- Fryer, M. J.; Oxborough, K.; Mullineaux, P. M.; Baker, N. R. (2002) Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *Journal of Experimental Botany* 53: 1249-1254.
- Gan, S. (2007) Senescence Processes in Plants. Blackwell Publishing Ltd, Iowa, USA, p 332.
- Genty, B.; Briantais, J.M.; Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92.
- González-Moro, M. B.; Lacuesta, M.; Iriberry, N.; Muñoz-Rueda, A.; Ganzález-Murua, C. (1997) Comparative effects of PPT and AOA on photosynthesis and fluorescent chlorophyll parameters in *Zea mays*. *Journal of Plant Physiology* 151: 641-648.
- Graham, M. Y. (2005) The diphenylether herbicide lactofen induces cell death and expression defense-related genes in soybean. *Plant Physiology* 139: 1784-1794.
- Halling, B. P.; Peters, G. R. (1987) Influence of chloroplast development on the activation of the diphenyl ether herbicide acifluorfen-methyl. *Plant Physiology* 84: 1114-1120.
- Haworth, P.; Hess, F. D. (1988) The generation of singlet oxygen (1O_2) by the nitrodiphenyl ether herbicides oxyfluorfen is independent of photosynthesis. *Plant Physiology* 86: 672-676.
- Hay, R.; Porter, J. (2006) Photosynthetic Processes. In *The Physiology of Crop Yield - Second edition* (eds: Hay, R.; Porter, J.) Longman Scientific & Technical, New York, 314 p.
- Hendrickson, L. Furbank, R. T.; Chow, W. S. (2004) A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research* 82: 73-81.
- Hendry, G. A. F.; Stobart, A. K. (1986) Chlorophyll turnover in greening barley. *Phytochemistry* 25: 2735-2737.
- Hess, F. D. (2000) Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Science* 48: 160-170.

- Hideg, E.; Schreiber, U. (2007) Parallel assessment of ROS formation and photosynthesis in leaves by fluorescence imaging. *Photosynthesis Research* 92: 103-108.
- Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. (1938) The method for growing plants without soil: water-culture. Berkeley: Univ. of California, *Circular oh the Agricultural Experimentation Station*, 32p.
- Hong, S-S.; Xu, D-Q. (1999) Light-induced increase in initial chlorophyll fluorescence F_0 level and the reversible inactivation of PSII reaction centers in soybean leaves. *Photosynthesis Research* 61: 269-280.
- Husic, D. W.; Husic, H. D.; Tolbert, N. E. (1987) The oxidative photosynthetic carbon cycle or C_2 cycle. *Plant Sciences* 5: 45-100.
- Iqbal, R.M.; Rao, Aur-R.; Rasul, E.; Wahid, A. (1997) Mathematical models and response functions in photosynthesis: an exponential model. In: Pessaraki, M. (Ed.), *Handbook of photosynthesis*. Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 803-810.
- Jacob, J.; Lawlor, D.W. (1991) Stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in phosphate deficient sunflower, maize and wheat plants. *Journal Experimental Botany* 42: 1003-1011.
- Jacobs, J. M.; Jacobs, N. J. (1993) Porphyrin accumulation and export by isolated barley (*Hordeum vulgare*) plastids. *Plant Physiology* 101: 1181-1187.
- Jacobs, J. M.; Jacobs, N. J.; Sherman, T. D.; Duke, S. O. (1991) Effects of diphenyl ether herbicides on oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin in organellar and plasma membrane enriched fractions of barley. *Plant Physiology* 97: 197-203.
- Jacobs, J. M.; Jacobs, N. J.; Duke, S. (1996) Protoporphyrinogen destruction by plant extracts and correlation with tolerance to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Pesticide, Biochemistry and Physiology* 55: 77-83.
- Jiang, C. D.; Gao, H. Y.; Zou, Q.; Jiang, G. M.; Li, L. H. (2006) Leaf orientation, photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybean leaves against high irradiance in field. *Environmental and Experimental Botany* 55: 87-96.
- Jung, H. L.; Kuk, Y. I.; Burgos, N. R. (2008) Resistance pattern and antioxidant enzyme profiles of protoporphyrinogen oxidase (PROTOX) inhibitor-resistant transgenic rice *Pesticide, Biochemistry and Physiology*: (10.1016/j.pestbp. 2008.01.005
- Kenyon, W. H.; Duke, S. O. (1985) Effects of acifluorfen on endogenous antioxidants and protective enzymes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons. *Plant Physiology* 79: 862-866.
- Kim, J. S.; Jung, S.; Hwang, I. T.; Cho, K. Y. (1999) Characteristics of chlorophyll a fluorescence induction in cucumber cotyledons treated with diuron, norflurazon, and sulcotrione. *Pesticide, Biochemistry and Physiology* 65: 73-81.
- Kitajima, M.; Buter, W. L. (1975) Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta* 376: 105-115.

- Klughammer, C.; Schreiber, U. (2008) Complementary PSII quantum yield calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and saturation pulse method. *PAM Application Notes* 1: 27-35. http://www.walz.com/e_journal/pdfs/PAN078007.pdf
- Koo, S. J.; Neal, J. C.; Tomaso, J. M. (1994) Quinclorac-induced electrolyte leakage in seedling grasses. *Weed Science* 42: 1-7.
- Kramer, D. M.; Johnson, G.; Kiirats, O; Edwards, G.E. (2004) New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research* 79: 209-218.
- Krause, G. H.; Weis, A. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology* 42: 313-349.
- Kunert, K. J.; Böger, P. (1981) The bleaching effect of the diphenyl ether oxyfluorfen. *Weed Science* 29: 169-173.
- Laisk, A.; Loreto, F. (1996) Determining photosynthetic parameters from leaf CO_2 exchange and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology* 110: 903-912.
- Lamattina, L.; Polacco, J. C. (2007) Nitric Oxide in Plant Growth Development and Stress Physiology. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, p 283.
- Li, Z.; Walker, R. H.; Wehtje, G.; Hancock, G. (2000) Using electrolyte leakage to detect soybean (*Glycine max*) cultivars sensitive to sulfentrazone. *Weed Technology* 14: 699-704.
- Long, S. P.; Bernacchi, C. J. (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* 54: 2393-2401.
- Long, S. P.; Humphries, S.; Falkowski, P. G. (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 45: 633-662.
- Loreto, F.; Harley, P. C.; Marco, G. D.; Sharkey, T. D. (1992) Estimation of mesophyll conductance to CO_2 flux by three different methods. *Plant Physiology* 98: 1437-1443.
- Lydon, J.; Duke, S. O. (1988) Porphyrin synthesis is required for photobleaching activity of the nitrosubstituted diphenyl ether herbicides. *Pesticide, Biochemistry and Physiology* 31: 74-78.
- MacCann, J. H.; Solomon, K. R. (2000) The effect of creosote on membrane ion leakage in *Myriophyllum spicatum* L. *Aquatic Toxicology* 50: 274-284.
- Marschner, H. (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants, 2 ed. Academy, New York, p 889.
- Mata, C. G.; Lamattina, L. (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology* 126: 1196-1204.
- Matringe, M.; Scala, R. (1987) Induction of tetrapyrrole accumulation by diphenyl ether-type herbicides. *Processes Crop Protection Conferences Weeds* 3: 981-988.

- Matringe, M.; Scalla, R. (1988) Studies on the mode of action of acifluorfen-methyl in nonchlorophyllous soybean cells. *Plant Physiology* 86: 619-622.
- Matringe, M., Camadro, J. M. Labbe, P.; Scalla, R. (1989) Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides. *Biochemical Journal* 260: 231-235.
- Mostowska, A.; Kittsteiner, U.; Rüdiger, W. (1991) Effect of 1,10-phenanthroline on ultrastructure of pea leaves. *Protoplasma* 161: 23-30.
- Mostowska, A.; Siedlecka, M.; Parys, E. (1996) Effect of 2,22-bipyridyl, a photodynamic herbicide, on chloroplast ultrastructure, pigment content and photosynthesis rate in pea seedlings. *Acta Physiology Plant* 18: 153-164.
- Munsell, A. H. (1966) *The Munsell Book of Color*. MacBeth Color and Photometry. Kollmorgen Corporation, Newburgh, New York.
- Muraoka, H.; Tang, Y.; Terashima, I.; Koizumi, H.; Washitani, I. (2000) Contributions of diffusional limitation, photoinhibition and photorespiration to midday depression of photosynthesis in *Arisaema heterophyllum* in natural high light. *Plant, Cell and Environment* 23: 235-250.
- Murata, S.; Kimura, Y.; Mabuchi, T.; Miura, Y. (2004) Accumulation of protoporphyrinogen IX prior to protoporphyrin IX in intact plants treated with protoporphyrinogen IX oxidase-inhibiting herbicides. *Journal Pesticide Science* 29: 195-199.
- Ogren, W. L. (1984) Photorespiration pathways, regulation and modification. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 415-442.
- Opanasenko, V.; Semenova, G.; Agafonov, A. (1999) Changes in the structure and the functional state of thylakoids under the conditions of osmotic shock. *Photosynthesis Research* 62: 281-290.
- Osmond, C. B.; Björkman, O. (1972) Simultaneous measurements of oxygen effects on net photosynthesis and glycolate metabolism in C₃ and C₄ species of *Atriplex*. *Carnegie Intitute of Washington Yearbook* 71: 141-148.
- Osmond, C. B. (1981) Photorespiration and photoinhibition. *Biochimica et Biophysica Acta* 639: 77-98.
- Oxborough, K.; Baker, N. R. (1997) Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components: calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo'. *Photosynthesis Research* 54: 135-142.
- Oxborough, K. (2004) Using chlorophyll a fluorescence imaging to monitor photosynthetic performance. In *Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis* (ed: Govindjee, P. G.) Dordrecht: Springer, p.409-429.
- Pallett, K. E.; Dodge, A. D. (1980) Studies into the action of some photosynthetic inhibitor herbicides. *Journal Experimental Botany* 31: 1051-1066.

- Peltier, G.; Cournac, L. (2002) Chlororespiration. *Annual Review of Plant Biology* 53: 523-550.
- Qin, X. Q.; Jad, Z. (1999) The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 1554-1561.
- Quick, W. P.; Chaves, M. M.; Wendler, R. (1992) The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant, Cell and Environment* 15: 25-36.
- Rascher, U.; Liebing, M.; Lüttge, U. (2000) Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. *Plant Cell Environment* 23: 1397-1405.
- Rebeiz, C. A.; Belanger, F. C.; McCarty, S. A.; Freyssinet, G.; Duggan, J. X.; Wu, S. M.; Mattheis, J. R. (1981) Chloroplast Development. In *Photosynthesis V* (ed: Akoyunoglou, G.) Balaban International Services, Philadelphia, p.197-212.
- Rebeiz, C. A.; Montazer-Zouhoor, A.; Hopen, H. J.; Wu, S. M. (1984) Photodynamic herbicides: concept and phenomenology. *Enzyme and Microbial Technology* 6: 390-401.
- Rebeiz, C. A.; Ioannides, I. M.; Kolossov, V.; Kopetz, K. J. (1999) Chloroplast Biogenesis. Proposal of a unified multibranch chlorophyll a/b biosynthetic pathway. *Photosynthetica* 36: 117-128.
- Rebeiz, C. A. (2002) Analysis of intermediate and end products of chlorophyll. In *Heme, chlorophyll, and bilins: methods and protocols* (eds: Smith, A. G.; Witty, M.) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, p.111-155.
- Riederer, M.; Müller, C. (2006) *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing Ltd, Iowa, USA, p 438.
- Roman, E. S. (2007) *Como funcionam os herbicidas – da biologia à aplicação*. Ed Berthier, Passo Fundo, RS, p 159.
- Schoefs, B.; Bertrand, M.; Lemoine, Y. (1998) Changes in the photosynthetic pigments in bean leaves during the first photoperiod of greening and the subsequent dark-phase. Comparison between old (10-d-old) leaves and young (2-d-old) leaves. *Photosynthesis Research* 57: 203-213.
- Schoonhoven, L. M.; van Loon, J. J. A.; Dicke, M. (2005) *Insect-Plant Biology*, 2 ed. Oxford University Press Inc., New York, p 421.
- Sharkey, T. D.; Bernacchi, C. J.; Farquhar, G. H.; Singsaas, E. L. (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ leaves. *Plant, Cell and Environment* 30: 1035-1040.
- Sherman, T. D.; Becerril, J. M.; Matsumoto, H.; Duke, M. V.; Jacobs, J. M.; Jacobs, N. J.; Duke, S. O. (1991) Physiological basis for differential sensitivities of plant species to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Plant Physiology* 97: 280-287.

- Sisler, E. C.; Klein, W. H. (1963) The effect of age and various chemicals on the lag phase of chlorophyll synthesis in dark-grown bean seedlings. *Physiologia Plantarum* 16: 315-322.
- Stobart, A. K.; Ameen-Bukhari (1984) Regulation of 5-aminolevulinic acid synthesis and protochlorophyllide regeneration in the leaves of dark grown barley seedlings. *Biochemical Journal* 222: 419-426.
- Sundqvist, C. (1969) Transformation of protochlorophyllide formed from δ -aminolevulinic acid in continuous light and in flashlight. *Physiologia Plantarum* 22: 147-156.
- Tanaka, R.; Tanaka, A. (2007) Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 321-346.
- Tarhanen, S.; Metsärinne, S.; Holopainen, T.; Oksanen, J. (1999) membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscescens* to wet deposited heavy metals and acid rain. *Environmental Pollution* 104: 121-129.
- Tenhunen, J. D.; Lange, O. L.; Geble, J.; Beyschlag, W.; Weber, J. A. (1984) Changes in photosynthetic capacity, carboxylation efficiency, and CO₂ compensation point associated with midday stomatal closure and midday depression of net CO₂ exchange of leaves of *Quercus suber*. *Planta* 162: 193-203.
- Tripathy, B. C.; Mohapatra, A.; Gupta, I. (2007) Impairment of the photosynthetic apparatus by oxidative stress induced by photosensitization reaction of protoporphyrin IX. *Biochimica et Biophysica Acta* 1767: 860-868.
- Turgeon, R. (1989) The sink-source transition in leaves. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 119-138.
- Valentini, R.; Epron, D.; Angelis, P. D.; Matteucci, G.; Dreyer, E. (1995) *In situ* estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration of Turkey oak (*Quercus cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different water supply. *Plant, Cell and Environment* 18: 631-640.
- Vanstone, D. E.; Stobbe, E. H. (1997) Electrolyte conductivity – a rapid measure of herbicide injury. *Weed Science* 25: 352-354.
- Vass, I.; Styring, S.; Hundal, T.; Koivuniemi, A.; Aro, E-M.; Andersson, B. (1992) Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced Q_A species promoted chlorophyll triplet formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 1408-1412.
- Vassilev, A.; Manolov, P. (1999) Chlorophyll fluorescence of barley (*H. vulgare* L.) seedlings grown in excess of Cd. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 25: 67-76.
- van Kooten, O.; Snel, J. (1990) The use of chlorophyll nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* 25: 147-150.
- von Caemmerer, S.; Farquhar, G. D. (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387.

- von Wettstein, D.; Gough, S.; Kannangara, C. G. (1995) Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1039-1057.
- Vredenberg, W. J. (2000) A three-state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in photosystem II incorporating radical pair recombination. *Biophysical Journal* 79: 26-38.
- Wakabayashi, K.; Böger, P. (1999) General physiological characteristics and mode of action of peroxidizing herbicides. In: “*Peroxidizing Herbicides*”; Springer, Heidelberg, p.163-190.
- Walker, C. J.; Willows, R. D. (1997) Mechanism and regulation of Mg-chelatase. *Biochemical Journal* 327: 321–333.
- Walmsley, J.; Adamson, H. (1989) Chlorophyll accumulation and breakdown in light-grown barley seedlings transferred to darkness: effect of seedling age. *Physiologia Plantarum* 77: 312-319.
- Wang, X-F.; Zhang, D-P. (2008) Abscisic acid receptors: multiple signal-perception sites. *Annals of Botany* 101: 311-317.
- Webb, A. A. R.; Larman, M. G.; Montgomery, L. T.; Taylor, J. E.; Hetherington, A. M. (2001) The role of calcium in ABA-induced gene expression and stomatal movements. *Plant Journal* 26: 351-362.
- Wellburn, A. R. (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307-314.
- Wichert, R. A.; Talbert, R. E. (1993) Soybean (*Glycine max* L.) response to lactofen. *Weed Science* 41: 23-27.
- Witkowski, D. A.; Halling, B. P. (1988) Accumulation of photodynamic tetrapyrroles induced by acifluorfen-methyl. *Plant Physiology* 87: 632-637.
- Witkowski, D. A.; Halling, B. P. (1989) Inhibition of plant protoporphyrinogen oxidase by the herbicide acyfluorfen-methyl. *Plant Physiology* 90: 1239-1242.
- Yanase, D.; Andoh, A.; Yasudomi, N. (1990) A new simple bioassay to evaluate photosynthetic electron transport inhibition utilizing paraquat phytotoxicity. *Pesticide, Biochemistry and Physiology* 35: 92-98.
- Yang, Y. S.; Bingham, W. (1984) Effects of metribuzin on net photosynthesis of goosegrass (*Eleusine indica*) and bermudagrass (*Cynodon* spp.). *Weed Science* 32: 247-250.
- York, A. C.; Arntzen, C. J.; Slife, F. W. (1981) Photosynthetic electron transport inhibition by buthidazole. *Weed Science* 29: 59-64.
- Zimdahl, R. L. (2007) *Fundamentals of Weed Science*. Elsevier Inc. California, USA, p 666.

Anexo 1 – Teores de pigmentos (Cl *a*, Cl *b*, Cl totais e Carotenóides), expressos com base em área e massa, em diferentes folhas de soja, com e sem aplicação do lactofen após 3, 6, 12, 24 e 48 horas acumuladas de luz (FMC: folha madura controle; FMT: folha madura tratada; FNC: folha nova controle; FNT: folha nova tratada).

Folha	Trat	Horas	$\mu\text{g.cm}^{-2}$ Área				mg.g MS^{-1} Massa				Cl <i>a</i> / <i>b</i>	Cl t / Carot
			Cl <i>a</i>	Cl <i>b</i>	Cl totais	Carot	Cl <i>a</i>	Cl <i>b</i>	Cl totais	Carot		
FM	C	3	40,84 ^a	19,70 ^a	60,55 ^a	8,04 ^a	12,16 ^a	5,93 ^a	18,09 ^a	2,38 ^a	2,53 ^a	9,62 ^a
		6	37,38 ^a	20,66 ^a	58,04 ^a	7,59 ^a	11,96 ^a	6,67 ^a	18,64 ^a	2,42 ^a	3,75 ^a	8,97 ^a
		12	36,88 ^a	22,10 ^a	58,98 ^a	6,45 ^a	11,04 ^a	6,66 ^a	17,70 ^a	1,94 ^a	1,96 ^a	10,47 ^a
		24	42,51 ^a	21,47 ^a	63,98 ^a	7,30 ^a	10,90 ^a	5,66 ^a	16,57 ^a	1,83 ^a	2,32 ^a	11,06 ^a
		48	40,23 ^a	23,73 ^a	63,96 ^a	7,79 ^a	10,45 ^a	6,05 ^a	16,50 ^a	2,03 ^a	2,01 ^a	9,90 ^a
	T	3	39,48 ^a	21,64 ^a	61,12 ^a	9,12 ^a	11,65 ^a	6,33 ^a	17,98 ^a	2,69 ^a	2,06 ^a	7,16 ^a
		6	37,45 ^a	21,12 ^a	58,57 ^a	7,57 ^a	11,00 ^{ab}	6,21 ^a	17,21 ^a	2,24 ^a	1,92 ^a	8,27 ^a
		12	37,85 ^a	19,87 ^a	57,73 ^a	8,20 ^a	11,49 ^a	6,07 ^a	17,57 ^a	2,48 ^a	2,33 ^a	7,77 ^a
		24	35,92 ^a	22,03 ^a	57,95 ^a	6,46 ^a	9,35 ^b	6,01 ^a	15,37 ^a	1,65 ^{ab}	1,92 ^a	10,03 ^a
		48	37,01 ^a	26,61 ^a	63,63 ^a	5,66 ^a	9,55 ^b	6,81 ^a	16,36 ^a	1,47 ^b	1,91 ^a	16,57 ^a
FN	C	3	28,44 ^b	19,43 ^a	47,87 ^b	5,58 ^a	10,08 ^a	6,76 ^a	16,84 ^a	2,02 ^a	1,84 ^a	11,32 ^a
		6	28,47 ^b	19,54 ^a	48,02 ^b	6,35 ^a	9,80 ^a	6,70 ^a	16,50 ^a	2,20 ^a	1,95 ^a	8,02 ^a
		12	33,05 ^b	19,94 ^a	52,99 ^{ab}	6,31 ^a	11,08 ^a	6,60 ^a	17,68 ^a	2,13 ^a	2,54 ^a	12,69 ^a
		24	35,79 ^{ab}	19,33 ^a	55,12 ^{ab}	4,86 ^a	9,81 ^a	5,36 ^a	15,16 ^a	1,31 ^a	2,29 ^a	14,46 ^a
		48	39,71 ^a	23,37 ^a	63,08 ^a	7,15 ^a	10,42 ^a	5,96 ^a	16,37 ^a	1,92 ^a	2,12 ^a	10,31 ^a
	T	3	31,14 ^a	16,02 ^a	47,16 ^a	8,10 ^a	11,13 ^a	5,78 ^a	16,91 ^a	2,88 ^a	2,26 ^a	6,46 ^a
		6	30,64 ^a	16,72 ^a	47,36 ^a	6,64 ^a	10,86 ^a	5,86 ^a	16,73 ^a	2,35 ^{ab}	2,52 ^a	7,92 ^a
		12	28,94 ^{ab}	17,11 ^a	46,04 ^a	6,28 ^a	10,35 ^{ab}	6,04 ^a	16,39 ^a	2,25 ^{ab}	2,35 ^a	8,63 ^a
		24	30,49 ^{ab}	10,28 ^a	40,78 ^{a*}	5,88 ^a	8,29 ^b	2,85 ^a	11,14 ^b	1,59 ^{bc}	3,82 ^a	8,05 ^a
		48	23,12 ^{b*}	13,09 ^a	36,20 ^{a*}	4,88 ^a	6,12 ^{c*}	3,57 ^a	9,69 ^{b*}	1,28 ^c	2,27 ^a	14,80 ^a

Letras minúsculas representam diferenças significativas das médias pelo Teste de Tukey (5%) no período experimental;
* representam diferenças significativas entre C e T (P<0,05).

Anexo 2 – Parâmetros de trocas gasosas: taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), taxa transpiratória (E) e relação C_i/C_a em diferentes folhas de soja, com e sem aplicação do lactofen após 3, 6, 12, 24 e 48 horas acumuladas de luz (FMC: folha madura controle; FMT: folha madura tratada; FNC: folha nova controle; FNT: folha nova tratada). Letras minúsculas e (*), idem ao Anexo 1.

Folha	Horas	A		g_s		E		C_i/C_a	
		$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$		$\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$		$\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$			
		C	T	C	T	C	T	C	T
FM	3	13,16 ^a	11,58 ^a	0,235 ^a	0,191 ^a	1,69 ^b	1,56 ^b	0,71 ^a	0,66 ^{ab}
	6	12,77 ^a	11,67 ^a	0,240 ^a	0,225 ^a	2,5 ^a	2,62 ^a	0,73 ^a	0,73 ^a
	12	12,26 ^a	9,23 ^a	0,123 ^b	0,073 ^b	1,2 ^c	0,8 ^c	0,57 ^a	0,46 ^b
	24	13,51 ^a	11,61 ^a	0,162 ^b	0,115 ^b	1,72 ^{ab}	1,34 ^b	0,67 ^a	0,61 ^{ab}
	48	12,33 ^a	10,15 ^a	0,133 ^b	0,105 ^b	1,22 ^c	1,01 ^{bc}	0,61 ^a	0,57 ^b
FN	3	11,13 ^a	10,14 ^a	0,173 ^a	0,126 ^a	1,64 ^a	1,53 ^a	0,66 ^a	0,61 ^a
	6	10,67 ^a	2,47 ^{b*}	0,175 ^a	0,029 ^b	2,06 ^a	0,42 ^{bc*}	0,69 ^a	0,60 ^a
	12	7,84 ^a	1,60 ^{b*}	0,053 ^b	0,015 ^b	0,65 ^b	0,21 ^c	0,37 ^b	0,56 ^{a*}
	24	11,30 ^a	2,76 ^{b*}	0,103 ^b	0,030 ^{b*}	1,25 ^b	0,35 ^{c*}	0,58 ^a	0,61 ^a
	48	10,24 ^a	3,70 ^{b*}	0,098 ^b	0,031 ^{b*}	1,02 ^b	0,37 ^c	0,56 ^a	0,58 ^a

Anexo 3 – Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* obtidos por fluorometria modulada: Fluorescência mínima (F_o) e máxima (F_m), rendimento quântico potencial (F_v/F_m) e efetivo ($\Delta F/F_m'$) do FSII, taxa de transporte de elétrons (ETR), coeficiente de extinção fotoquímico (qP) e coeficiente de extinção não-fotoquímico através de dissipação de calor (NPQ) em diferentes folhas de soja, com e sem aplicação do lactofen após 3, 6, 12, 24 e 48 horas acumuladas de luz (FMC: folha madura controle; FMT: folha madura tratada; FNC: folha nova controle; FNT: folha nova tratada). Letras minúsculas e (*), idem ao Anexo 1.

Folha	Trat	Horas	F_o	F_m	F_v/F_m	$\Delta F/F_m'$	ETR	qP	NPQ
FM	C	3	196 ^{ab}	1068 ^a	0,82 ^a	0,58 ^a	78,32 ^a	0,78 ^a	0,49 ^a
		6	218 ^a	1131 ^a	0,81 ^a	0,59 ^a	77,60 ^a	0,79 ^a	0,42 ^a
		12	193 ^{ab}	1108 ^a	0,82 ^a	0,61 ^a	80,50 ^a	0,81 ^a	0,52 ^a
		24	206 ^a	1080 ^a	0,81 ^a	0,58 ^a	75,78 ^a	0,79 ^a	0,49 ^a
		48	165 ^b	997 ^a	0,83 ^a	0,60 ^a	83,00 ^a	0,77 ^a	0,42 ^a
	T	3	174 ^b	1044 ^a	0,83 ^a	0,58 ^a	77,60 ^a	0,76 ^a	0,59 ^a
		6	210 ^a	1090 ^a	0,81 ^a	0,59 ^a	78,00 ^a	0,80 ^a	0,46 ^a
		12	183 ^{ab}	1035 ^a	0,82 ^a	0,59 ^a	78,80 ^a	0,80 ^a	0,64 ^a
		24	190 ^{ab}	1032 ^a	0,81 ^a	0,57 ^a	75,10 ^a	0,77 ^a	0,48 ^a
		48	158 ^b	952 ^a	0,83 ^a	0,58 ^a	79,96 ^a	0,75 ^a	0,48 ^a
FN	C	3	193 ^b	1038 ^a	0,82 ^a	0,60 ^a	79,46 ^a	0,81 ^a	0,56 ^a
		6	230 ^a	1115 ^a	0,79 ^a	0,56 ^a	72,70 ^a	0,81 ^a	0,57 ^a
		12	196 ^{ab}	1067 ^a	0,82 ^a	0,57 ^a	74,40 ^a	0,79 ^a	0,71 ^a
		24	205 ^{ab}	1057 ^a	0,80 ^a	0,58 ^a	74,92 ^a	0,81 ^a	0,59 ^a
		48	169 ^b	984 ^a	0,83 ^a	0,58 ^a	82,96 ^a	0,77 ^a	0,58 ^a
	T	3	196 ^b	1037 ^a	0,81 ^a	0,59 ^a	82,0 ^a	0,81 ^a	0,62 ^a
		6	240 ^a	947 ^a	0,74 ^{b*}	0,46 ^{b*}	60,5 ^b	0,83 ^a	0,65 ^a
		12	183 ^b	734 ^{b*}	0,75 ^{b*}	0,47 ^{b*}	66,4 ^b	0,79 ^a	0,80 ^a
		24	161 ^{b*}	637 ^{b*}	0,76 ^{b*}	0,46 ^{b*}	62,8 ^b	0,74 ^a	0,54 ^a
		48	134 ^{c*}	707 ^{b*}	0,81 ^a	0,53 ^a	74,0 ^{ab}	0,76 ^a	0,83 ^a

Anexo 4 – Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* obtidos por imagem da fluorescência: Fluorescência mínima (F_o) e máxima (F_m), rendimento quântico potencial (F_v/F_m) e efetivo ($\Delta F/F_m'$) do FSII, taxa de transporte de elétrons (ETR), rendimento quântico de dissipação não-regulada de energia do FSII ($Y(NO)$) e regulado ($Y(NPQ)$), coeficiente de extinção fotoquímico (qP) e inibição relativa do FSII (Inh) em diferentes regiões de folhas novas de soja com aplicação do lactofen (A1: não afetada; A2: moderadamente afetada; A3: área afetada; A4: área abrangendo A1, A2 e A3) e AC (área não afetada do controle) após 3, 6, 12, 24 e 48 horas acumuladas de luz. Letras minúsculas idem ao Anexo 1; (*) representa diferenças significativas em relação à AC ($P<0,05$); valores entre parênteses representam desvio padrão da média.

Parâmetro	Área	3h	6h	12h	24h	48h
F_v/F_m	A1	0,77 (0,01) ^a	0,77 (0,01) ^a	0,79 (0,01) ^a	0,79 (0,01) ^a	0,79 (0,01) ^a
	A2	0,75 (0,02) ^a	0,70 (0,05) ^a	0,76 (0,01) ^a	0,78 (0,01) ^a	0,78 (0,02) ^a
	A3	0,74 (0,03) ^a	0,48 (0,13) ^{b*}	0,38 (0,09) ^{bc*}	0,27 (0,17) ^{c*}	0,00 (0,0) ^{d*}
	A4	0,75 (0,01) ^a	0,70 (0,04) ^a	0,71 (0,01) ^a	0,74 (0,01) ^a	0,76 (0,02) ^a
	AC	0,79 (0,01) ^a	0,80 (0,01) ^a	0,80 (0,01) ^a	0,80 (0,01) ^a	0,81 (0,01) ^a
F_o	A1	0,18 (0,004) ^{ab}	0,122 (0,008) ^a	0,100 (0,007) ^{ab}	0,103 (0,009) ^{ab}	0,091 (0,005) ^b
	A2	0,113 (0,002) ^{ab}	0,135 (0,019) ^a	0,107 (0,004) ^{ab}	0,107 (0,007) ^{ab}	0,093 (0,008) ^b
	A3	0,119 (0,001) ^{ab}	0,141 (0,013) ^a	0,109 (0,018) ^{ab}	0,045 (0,019) ^{bc*}	0,018 (0,001) ^{c*}
	A4	0,113 (0,004) ^{ab}	0,133 (0,015) ^a	0,109 (0,007) ^{ab}	0,085 (0,004) ^{bc}	0,068 (0,007) ^{c*}
	AC	0,111 (0,007) ^a	0,114 (0,012) ^a	0,104 (0,003) ^a	0,105 (0,005) ^a	0,106 (0,010) ^a
F_m	A1	0,47 (0,03) ^a	0,50 (0,08) ^a	0,49 (0,03) ^a	0,50 (0,04) ^a	0,43 (0,05) ^a
	A2	0,46 (0,03) ^a	0,45 (0,03) ^a	0,46 (0,03) ^a	0,48 (0,02) ^a	0,42 (0,05) ^a
	A3	0,46 (0,01) ^a	0,28 (0,05) ^{b*}	0,17 (0,03) ^{bc*}	0,07 (0,02) ^{cd*}	0,04 (0,01) ^{d*}
	A4	0,46 (0,02) ^a	0,44 (0,02) ^{ab}	0,38 (0,03) ^{abc*}	0,33 (0,01) ^{bc*}	0,29 (0,04) ^{c*}
	AC	0,53 (0,04) ^a	0,56 (0,07) ^a	0,52 (0,02) ^a	0,53 (0,04) ^a	0,55 (0,07) ^a
$\Delta F/F_m'$	A1	0,41(0,02) ^a	0,40 (0,05) ^a	0,32 (0,10) ^a	0,33 (0,08) ^a	0,39 (0,06) ^a
	A2	0,36 (0,01) ^a	0,38 (0,04) ^a	0,31 (0,09) ^a	0,30 (0,08) ^a	0,36 (0,06) ^a
	A3	0,36 (0,03) ^a	0,17 (0,08) ^{b*}	0,14 (0,07) ^{b*}	0,04 (0,03) ^{b*}	0,00 (0,0) ^{b*}
	A4	0,37 (0,01) ^a	0,36 (0,03) ^a	0,29 (0,08) ^a	0,29 (0,09) ^a	0,36 (0,06) ^a
	AC	0,34 (0,03) ^a	0,41 (0,03) ^a	0,37 (0,03) ^a	0,34 (0,02) ^a	0,33 (0,03) ^a
ETR	A1	44,78 (1,96) ^a	42,93 (3,96) ^a	34,35 (11,38) ^a	36,10 (8,40) ^a	44,13 (5,16) ^a
	A2	34,1 (4,83) ^a	26,78 (3,70) ^a	21,43 (4,19) ^a	20,23 (4,98) ^{a*}	24,78 (4,07) ^a
	A3	33,53 (7,09) ^a	9,35 (6,85) ^{b*}	2,3 (0,76) ^{b*}	5,30 (9,18) ^{b*}	0,00 (0,0) ^{b*}
	A4	31,55 (2,40) ^a	26,98 (3,45) ^{ab}	18,1 (3,74) ^{ab*}	12,68 (3,37) ^{b*}	13,70 (2,54) ^{b*}
	AC	33,95 (4,73) ^a	40,67 (3,73) ^a	35,40 (3,14) ^a	37,05 (2,13) ^a	33,18 (2,26) ^a
$Y(NO)$	A1	0,31 (0,03) ^a	0,40 (0,02) ^a	0,33 (0,02) ^a	0,37 (0,02) ^a	0,39 (0,03) ^a
	A2	0,32 (0,02) ^a	0,39 (0,03) ^a	0,36 (0,02) ^a	0,38 (0,03) ^a	0,37 (0,03) ^a
	A3	0,32 (0,02) ^c	0,67 (0,15) ^{b*}	0,65 (0,11) ^{b*}	0,78 (0,14) ^{b*}	1,00 (0,001) ^{a*}
	A4	0,32 (0,02) ^a	0,41 (0,02) ^a	0,40 (0,01) ^a	0,39 (0,03) ^a	0,39 (0,03) ^a
	AC	0,35 (0,02) ^a	0,33 (0,01) ^a	0,32 (0,01) ^a	0,30 (0,04) ^a	0,32 (0,02) ^a
$Y(NPQ)$	A1	0,28 (0,03) ^a	0,20 (0,04) ^a	0,35 (0,11) ^a	0,30 (0,08) ^a	0,23 (0,07) ^a
	A2	0,31 (0,01) ^a	0,24 (0,03) ^a	0,33 (0,11) ^a	0,32 (0,06) ^a	0,27 (0,08) ^a
	A3	0,32 (0,05) ^a	0,16 (0,08) ^{ab}	0,22 (0,06) ^a	0,19 (0,12) ^{ab}	0,00 (0,0) ^{b*}
	A4	0,30 (0,01) ^a	0,23 (0,02) ^a	0,31 (0,09) ^a	0,32 (0,07) ^a	0,25 (0,05) ^{b*}
	AC	0,31 (0,05) ^a	0,26 (0,05) ^a	0,31 (0,03) ^a	0,36 (0,05) ^a	0,35 (0,05) ^a
qP	A1	0,64 (0,04) ^a	0,60 (0,03) ^a	0,48 (0,13) ^a	0,48 (0,10) ^a	0,55 (0,08) ^a
	A2	0,60 (0,06) ^a	0,63 (0,01) ^a	0,49 (0,12) ^a	0,46 (0,12) ^a	0,54 (0,09) ^a
	A3	0,62 (0,02) ^a	0,37 (0,11) ^{ab}	0,37 (0,22) ^{ab}	0,11 (0,10) ^{bc*}	0,00 (0,0) ^{c*}
	A4	0,61 (0,04) ^a	0,60 (0,02) ^a	0,50 (0,13) ^a	0,46 (0,13) ^a	0,54 (0,10) ^a
	AC	0,51 (0,04) ^a	0,60 (0,04) ^a	0,55 (0,04) ^a	0,53 (0,03) ^a	0,50 (0,03) ^a
Inh	A1	0,00 (0,0) ^a	0,00 (0,0) ^a	0,00 (0,0) ^a	0,00 (0,0) ^a	0,00 (0,0) ^a
	A2	0,11 (0,09) ^a	0,13 (0,05) ^a	0,12 (0,05) ^a	0,10 (0,05) ^a	0,07 (0,06) ^a
	A3	0,11 (0,12) ^a	0,59 (0,18) ^b	0,60 (0,12) ^b	0,91 (0,16) ^c	1,00 (0,001) ^c
	A4	0,08 (0,07) ^a	0,09 (0,08) ^a	0,08 (0,07) ^a	0,13 (0,08) ^a	0,08 (0,05) ^a

Anexo 5 – Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* obtidos por imagem da fluorescência: Absorbância foliar (Abs), fluorescência mínima (Fo), rendimento quântico potencial (F_v/F_m) e efetivo ($\Delta F/F_m'$) do FSII e coeficiente de extinção fotoquímico (qP) representados em porcentagem de área foliar em função de intervalos de valores, em folhas novas de soja com e sem aplicação do lactofen (T e C) após 3, 6, 12, 24 2 48 horas acumuladas de luz. Letras minúsculas idem ao Anexo 1, valores entre parênteses representam desvio padrão da média..

	Intervalos	3h	6h	12h	24h	48h	
Abs	C	> 0,51	0,58 (0,08) ^b	0,63 (0,10) ^b	0,68 (0,05) ^b	0,76 (0,07) ^b	0,84 (0,03) ^a
		0,51>x>0,11	0,42 (0,08) ^a	0,36 (0,10) ^a	0,31 (0,05) ^{ab}	0,24 (0,07) ^{ab}	0,16 (0,03) ^b
		<0,11	0,00 (0,00) ^a	0,00 (0,00) ^a	0,00 (0,00) ^a	0,00 (0,00) ^a	0,00 (0,00) ^a
	T	> 0,51	0,45 (0,16) ^a	0,32 (0,06) ^b	0,24 (0,07) ^b	0,17 (0,03) ^b	0,20 (0,07) ^b
		0,51>x>0,11	0,55 (0,16) ^a	0,68 (0,06) ^a	0,68 (0,05) ^a	0,53 (0,04) ^a	0,45 (0,07) ^a
		<0,11	0,00 (0,00) ^b	0,01 (0,00) ^b	0,08 (0,04) ^b	0,30 (0,02) ^a	0,35 (0,02) ^a
F_v/F_m	C	>0,78	0,25 (0,02) ^b	0,56 (0,15) ^a	0,78 (0,10) ^a	0,68 (0,05) ^a	0,78 (0,08) ^a
		0,78>x>0,7	0,70 (0,04) ^a	0,43 (0,15) ^b	0,22 (0,10) ^b	0,30 (0,04) ^b	0,21 (0,07) ^b
		<0,7	0,04 (0,04) ^a	0,01 (0,02) ^a	0,00 (0,00) ^a	0,03 (0,01) ^a	0,01 (0,01) ^a
	T	>0,78	0,21 (0,09) ^{ab}	0,13 (0,12) ^b	0,25 (0,06) ^{ab}	0,29 (0,03) ^{ab}	0,32 (0,09) ^a
		0,78>x>0,7	0,73 (0,06) ^a	0,44 (0,08) ^b	0,33 (0,02) ^b	0,39 (0,05) ^b	0,39 (0,10) ^b
		<0,7	0,06 (0,05) ^b	0,43 (0,19) ^a	0,42 (0,04) ^a	0,32 (0,04) ^a	0,29 (0,04) ^{ab}
Fo	C	>0,122	0,21 (0,02) ^a	0,18 (0,04) ^{ab}	0,06 (0,03) ^c	0,15 (0,03) ^{abc}	0,11 (0,04) ^{bc}
		0,122>x>0,075	0,77 (0,03) ^b	0,80 (0,05) ^{ab}	0,90 (0,01) ^a	0,76 (0,05) ^b	0,82 (0,01) ^{ab}
		<0,075	0,02 (0,02) ^a	0,02 (0,01) ^a	0,04 (0,02) ^a	0,09 (0,02) ^a	0,07 (0,03) ^a
	T	>0,122	0,12 (0,01) ^{bc}	0,37 (0,04) ^a	0,15 (0,03) ^b	0,09 (0,02) ^{bc}	0,03 (0,02) ^c
		0,122>x>0,075	0,88 (0,01) ^a	0,63 (0,04) ^b	0,79 (0,03) ^a	0,55 (0,01) ^{bc}	0,46 (0,05) ^c
		<0,075	0,00 (0,00) ^c	0,02 (0,00) ^c	0,05 (0,02) ^c	0,36 (0,02) ^b	0,51 (0,07) ^a
$\Delta F/F_m'$	C	>0,4	0,61 (0,19) ^a	0,42 (0,06) ^{ab}	0,16 (0,08) ^{bc}	0,09 (0,06) ^{bc}	0,02 (0,01) ^c
		0,4>x>0,3	0,39 (0,19) ^b	0,58 (0,06) ^{ab}	0,84 (0,08) ^a	0,88 (0,05) ^a	0,97 (0,01) ^a
		<0,3	0,00 (0,00) ^a	0,00 (0,00) ^a	0,00 (0,00) ^a	0,03 (0,04) ^a	0,02 (0,01) ^a
	T	>0,4	0,28 (0,04) ^a	0,39 (0,19) ^a	0,13 (0,13) ^a	0,15 (0,10) ^a	0,32 (0,10) ^a
		0,4>x>0,3	0,72 (0,04) ^a	0,38 (0,11) ^{ab}	0,26 (0,19) ^b	0,17 (0,12) ^b	0,13 (0,03) ^b
		<0,3	0,00 (0,00) ^b	0,22 (0,11) ^a	0,61 (0,31) ^a	0,68 (0,30) ^a	0,55 (0,12) ^a
qP	C	>0,5	0,87 (0,02) ^a	0,87 (0,02) ^a	0,78 (0,10) ^a	0,66 (0,07) ^a	0,56 (0,02) ^b
		0,51>x>0,3	0,13 (0,02) ^b	0,13 (0,01) ^b	0,21 (0,10) ^{ab}	0,32 (0,06) ^{ab}	0,43 (0,02) ^a
		<0,3	0,00 (0,00) ^a	0,00 (0,00) ^a	0,00 (0,00) ^a	0,01 (0,00) ^a	0,01 (0,00) ^a
	T	>0,5	0,84 (0,06) ^a	0,79 (0,06) ^a	0,50 (0,27) ^b	0,33 (0,20) ^b	0,33 (0,12) ^b
		0,51>x>0,3	0,16 (0,06) ^a	0,16 (0,03) ^a	0,29 (0,19) ^a	0,30 (0,13) ^a	0,30 (0,13) ^a
		<0,3	0,00 (0,00) ^b	0,05 (0,03) ^b	0,21 (0,16) ^{ab}	0,37 (0,08) ^a	0,37 (0,03) ^a