

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

TESE DE DOUTORADO

**PADRÕES DE ATIVIDADE FOTOQUÍMICA EM GRAMINÓIDES DE
ECOSSISTEMAS CAMPESTRES**

CLODOALDO LEITES PINHEIRO

PORTO ALEGRE, DEZEMBRO DE 2016

PADRÕES DE ATIVIDADE FOTOQUÍMICA EM GRAMINÓIDES DE
ECOSSISTEMAS CAMPESTRES

Clodoaldo Leites Pinheiro

Técnico Agrícola – Embrapa Pecuária Sul

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Botânica, área de concentração em Ecofisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Luís Mauro Gonçalves Rosa

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Felipe dos Santos Maraschin (UFRGS)

Prof. Dr. Fernando Luiz Ferreira de Quadros (UFSM)

Prof^ª. Dr^ª. Tanise Luisa Sausen (URI)

Porto Alegre, Dezembro de 2016

Dedico aos meus pais,
Luiz Alberto Pinheiro (*in memoriam*) e Maria Elcy Leites Pinheiro (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Luís Mauro por acreditar no projeto apresentado, pela liberdade de construção de conhecimento, por permitir uma forma nada conservadora de apresentar os resultados e, pelo uso de equipamentos do laboratório de Ecofisiologia Vegetal.

Aos estagiários do Laboratório de Estudos em Agroecologia e Recursos Naturais da Embrapa Pecuária Sul (LABECO CPPSul) pela companhia durante as diversas saídas de campo pelo interior de Pinheiro Machado, Piratini, Caçapava do Sul e Bagé. Um agradecimento muito especial a Graciela Jaskulsky, a Josiele Dutra e a Tamires Soares! Colegas de trabalho e amigas de valor. Aprendemos muito sobre taxonomia de plantas de ecossistemas campestres, foi produtivo, construtivo e muito divertido, muito trabalho e sem acochambrar.

Aos estudantes dos Programas de Pós-Graduação em Agrobiologia e Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (Laboratório de Pastagens Naturais – LEPAN) que sempre enriqueceram as discussões no LABECO e me proporcionaram um rico dum espaço para crescer profissionalmente. Uma dedicação especial à bióloga Lidiane da Rosa Boavista, sem dúvidas um exemplo, um objetivo de chegar um pouco perto de tanta dedicação, conhecimento e amor a profissão. Um forte abraço ao Fernando Furquim e a Gabriela Dutra, que me oportunizaram um ambiente exemplar de trabalho em equipe, de honestidade, de sucesso e companheirismo. Ao André Coelho pelos momentos de descontração e o ímpeto de produção e conhecer. Esse LABECO só tem ouro!

Aos pesquisadores da Embrapa Pecuária Sul: Leandro Volk, José Pedro Trindade e Marcos Borba pela acolhida no LABECO e por sustentar o meu crescimento ao longo desta caminhada.

Ao meu orientador de Mestrado, professor Antelmo Falqueto por me apresentar o mundo da fotoquímica da fotossíntese. A professora Diolina Moura Silva pelas valiosas contribuições durante o Mestrado. A professora Etiane Skrebsky por iniciar a Fisiologia Vegetal na minha formação acadêmica. Professores que somaram momentos muito importantes na minha vida pessoal e profissional. Sem dúvidas foram experiências marcantes.

Aos professores Gerhard Overbeck, Ilsi Boldrini, Hilda Longhi-Wagner e Silvia Miotto por todo conhecimento compartilhado de ecologia e taxonomia de espécies vegetais de ecossistemas campestres. A professora Lucia Dillenburg pelas duras críticas construtivas, pelo espaço e privilégio de acompanhar as disciplinas de graduação durante o estágio docência, sem dúvidas um didática que supera a excelência.

A minha irmã, professora Cristina Pinheiro Machado por me alfabetizar e incentivar a sempre estudar mais e mais durante estes trinta e poucos anos de vida que eu tenho. Por me tranquilizar nos momentos de perda na família, por cuidar das 700 ± 150 orquídeas e das 50 ± 7 aves enquanto eu estava fora do estado ou no campo fazendo ciência. Tenho muito respeito por ti, e devo muita gratidão. Uma mulher guerreira, que venceu até um terrível câncer.

A minha grande amiga e segunda mãe, Dona Delanei Ornellas. Companhia de saída de campo, cultivo de orquídeas, de plantas ornamentais, de muitas risadas, de causos, almoços e momentos muito divertidos.

Aos meus pais, hoje falecidos, que me oportunizaram uma infância saudável, com contato com o meio natural, foram muitos domingos de sol na Campanha de Pinheiro Machado. Acredito que aprendi a gostar do campo e das plantas antes mesmo de aprender a caminhar.

Agradeço a Embrapa Pecuária Sul permitir amplo ambiente de trabalho, contatos, estrutura e mecanismos para crescimento continuado.

Ao professor Eduardo Schwengber que compartilha comigo valores de profissionalismo, honestidade e cumplicidade.

PADRÕES DE ATIVIDADE FOTOQUÍMICA EM GRAMINÓIDES DE ECOSISTEMAS CAMPESTRES

Autor: Clodoaldo Leites Pinheiro

Orientador: Luís Mauro Gonçalves Rosa

RESUMO

A complexidade da vegetação campestre pode ser explicada a partir de uma abordagem de tipologia funcional, juntando espécies diferentes em grupos relacionados a estratégias de captura ou conservação de recursos. Os grupos assim formados podem relacionar os aspectos adaptativos das plantas aos processos dominantes no ecossistema. Os campos de dupla estrutura contemporânea no Sul do Brasil, mostram-se como resultante da interação de múltiplos fatores ambientais expressados nos fenótipos de uma composição vegetal pouco estudada. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade fotoquímica de graminóides dominantes, buscando testar a hipótese da existência de um padrão fisiológico compatível com a tipologia funcional de captura ou conservação de recursos. Posteriormente, foi feita a descrição dos mecanismos da atividade fotoquímica de *Axonopus affinis* (Poaceae) que sustentam a hipótese de que a rápida ciclagem de nutrientes intrínseca de plantas de captura de recursos é precedida por plasticidade fisiológica no uso da energia luminosa. O estudo foi conduzido em vegetação campestre de áreas experimentais da Embrapa Pecuária Sul em Bagé/RS e Hulha Negra/RS (primavera-verão 2014-2016). A amostragem preferencial foi precedida por reconhecimento visual da composição e estrutura da vegetação, utilizando unidades amostrais de espécies dos tipos funcionais de captura ou conservação de recursos (folhas jovens, não danificadas e totalmente expandidas). Os resultados encontrados corroboraram

a abordagem de tipológica funcional construída a partir do teor de matéria seca e área foliar específica em estudos de ecossistemas campestres de contemporânea dupla estrutura. A similaridade para respostas na atividade fotoquímica de espécies graminóides de mesmo tipo funcional encontrada mostrou que emissões de fluorescência basal e maior *pool* de transportadores de elétrons fotossintetizantes, dependência de mecanismos de *quenching* não fotoquímico e fotoinibição dinâmica foram características do tipo funcional de captura de recursos. Entretanto, o tipo funcional de conservação de recursos mostrou maior estabilidade em emissão de fluorescência basal e menor *pool* de transportadores de elétrons associado a mecanismos de *quenching* fotoquímico e tamanho efetivo da antena do complexo coletor de luz. O padrão estável de atividade fotoquímica observado em *A. affinis* foi direcionado por mecanismos de *quenching* da emissão de fluorescência de clorofila *a* e pelo comportamento do transiente OJIP, os quais revelaram plasticidade fisiológica a partir de mudanças reversíveis na estrutura e função de cloroplastos.

PATTERNS OF PHOTOCHEMICAL ACTIVITY IN GRAMINOIDS OF
GRASSLAND ECOSYSTEMS

Author: Clodoaldo Leites Pinheiro

Advisor: Luís Mauro Gonçalves Rosa

ABSTRACT

The complexity of grassland vegetation can be explained based on functional typology, grouping different species regarding strategies for capture or conservation of resources. The groups thus formed can be related to adaptive aspects of plants to the dominant processes in the ecosystem. The grassland having double structure in southern Brazil are the result of interaction of multiple environmental factors, expressed in the phenotypes of a vegetative composition that has not been widely studied. Thus, the objective of this study was to investigate the photochemical activity of the dominant graminoids, by testing the hypothesis of the existence of a physiological pattern compatible with the functional typology of capture or conservation of resources. This analysis was followed by examination to describe the mechanisms of the photochemical activity of *Axonopus affinis* (Poaceae), supporting the hypothesis that the rapid cycling of nutrients that is intrinsic to plants for capture of resources is preceded by physiological plasticity in the use of light energy. The study was conducted in grassland vegetation of experimental grassland of Embrapa Pecuária Sul (Embrapa Southern Livestock research unit), located in the municipalities of Bagé and Hulha Negra, both in the state of Rio Grande do Sul, in the spring-summer of 2014-2016. The preferential sampling was preceded by visual recognition of the composition and structure of the vegetation, using sampling units consisting of species of the functional types for capture or conservation of resources (fully

expanded and undamaged young leaves). The results found corroborate the typological-functional approach formulated based on the dry matter content and specific leaf area in studies of grassland ecosystems with double contemporary structure. The similarity of responses in the photochemical activity of species of graminoids with the same functional type found showed that emission of basal fluorescence, a greater pool of photosynthetic electron transporters, dependence on non-photochemical quenching, and dynamic photoinhibition were characteristics of the functional type for resource capture. However, the functional type for conservation of resources showed greater stability in emission of basal fluorescence and a smaller pool of electron transporters associated with photochemical quenching mechanisms and effective size of the antenna of the light collection complex. The stable pattern of photochemical activity observed in *A. affinis* was guided by quenching mechanisms in the emission of chlorophyll *a* fluorescence and by the behavior of the OJIP transient, revealing the physiological plasticity based on reversible changes in the structure and function of chloroplasts.

Keywords: double structure grasslands, light energy, OJIP, quenching, functional typology.

SUMÁRIO

1.1 Introdução Geral	11
1.2 Referências Bibliográficas:	22
Capítulo 1	32
2.1 Transdução de energia fotoquímica em graminóides de um campo de dupla estrutura	32
2.2 Introdução:	33
2.3 Materiais e métodos:	35
2.4 Resultados e discussão:	40
2.5 Considerações finais:.....	50
2.6 Referências bibliográficas	51
Capítulo 2	61
3.1 Quenching da fluorescência da clorofila <i>a</i> revela plasticidade de atividade fotoquímica em <i>Axonopus affinis</i> Chase (Poaceae)	61
3.2 Introdução:	62
3.3 Materiais e métodos:	64
3.4 Resultados e discussão:	67
3.5 Considerações finais:.....	74
3.6 Referências bibliográficas:.....	75
4. Conclusão Geral	83

1.1 Introdução Geral

Os ecossistemas campestres fazem parte de vários biomas do mundo e podem ser definidos como uma cobertura vegetal onde ocorre o predomínio de vegetação herbácea, com pouca ou ausência de cobertura arbustivo-arbórea (Suttie *et al.* 2005). Um ecossistema dominado por vegetação campestre é assim mantido devido à limitação de um ou mais fatores que impedem a formação ou o avanço de arbustos ou árvores. Dentre estes fatores os principais são climáticos (seca, inundações, fogo), edáficos (estrutura física e fertilidade do solo), bióticos (herbivoria) e antrópicos (atividades agropecuárias, roçadas, queimadas, entre outros) (Quadros *et al.* 2009).

Os distúrbios naturais e antrópicos presentes em ecossistemas campestres no sul do Brasil foram intensificados com a chegada dos primeiros colonizadores e com eles, cabeças de gado e de cavalos. A este novo cenário somava-se, então, o distúrbio do fogo, o efeito de pastejo, dos rebanhos da população de veado campeiro e da população de bovinos e equinos. A biodiversidade de espécies vegetais de clima subtropical aumenta quando é manejada sob pastejo moderado, devido à menor competição entre as espécies. Assim, torna-se possível o aparecimento de espécies anuais dentre as perenes (Boldrini e Eggers 1996, McIntyre *et al.* 2003).

A intensificação produtiva, a inovação tecnológica e a orientação crescente para o mercado tiveram menor repercussão na Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul. Assim, o contexto socioeconômico e cultural local apresentou-se incompatível com as estratégias técnico-produtivas. Esta impossibilidade de adotar modelos produtivos modernos levou esta região ao atraso tecnológico e ao subdesenvolvimento econômico (Borba e Trindade 2009). É neste cenário de pecuária de pasto em ecossistema campestre de marcada dupla estrutura (plantas cespitosas e prostradas) compreendendo espécies vegetais e fisionomia

característica da Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul foi utilizado para gerar hipóteses e coletar dados da atividade fotoquímica.

Ecosistemas campestres podem ser abordados a partir de três tipos de diversidade: a taxonômica (referente à nomenclatura de espécies para levantamentos florísticos), a ecológica (dinâmica da composição florística em resposta a distúrbios naturais ou antrópicos) e a funcional (agrupamento de espécies segundo características morfológicas e fisiológicas dos indivíduos) (Pillar e Orłóci 1993, Box 1996). Diante da complexidade da vegetação campestre, a abordagem de uma tipologia funcional pode reunir espécies em grupos distintos relacionados à captura ou conservação de recursos naturais disponíveis no ambiente a partir da quantificação do teor de matéria seca e da área foliar (Cruz *et al.* 2010). A captura de recursos está associada às espécies prostradas, estoloníferas ou rizomatosas, com uma taxa de alongação foliar e uma duração de vida das folhas menor que as espécies relacionadas à conservação de recursos, as quais são geralmente gramíneas formadoras de touceiras com maiores quantidades de biomassa (Quadros *et al.* 2009).

Desta forma, é possível agrupar as plantas de acordo com as respostas ao ambiente, considerando os aspectos adaptativos das plantas e os processos dominantes do ecossistema (Pillar e Orłóci 1993, Box 1996, Lavorel *et al.* 1997, Weiher *et al.* 1999, Lavorel e Garnier 2002). A interação das espécies vegetais com o ambiente envolve um complexo de fatores dinâmicos que se desenvolvem no tempo e no espaço. O mosaico de campo-floresta que caracteriza esta vegetação é composto por espécies de hábito cespitoso e herbáceo que competem pelos recursos naturais, sobretudo por luz (Nabinger *et al.* 2009). Sabe-se que a biodiversidade em um ecossistema campestre sustenta redundância funcional, o que implica em certo grau de resiliência (Joner 2008). Neste contexto, a compreensão da fisiologia vegetal de graminóides de uma determinada

comunidade, pode ser uma abordagem eficiente para contribuir com os questionamentos ecológicos em ecossistemas campestres.

Welker e Longhi-Wagner (2007), resumem as principais características morfológicas dos graminóides que foram utilizados como plantas modelo deste estudo: 1 - *Axonopus affinis* Chase (grama tapete) ocorre em campos úmidos. São plantas estoloníferas de prefoliação conduplicada, lateralmente comprimida e lâminas foliares planas. A inflorescência apresenta o antécio superior esverdeado a estramíneo na maturação. 2 - *Axonopus argentinus* Parodi ocorre em campos secos. São plantas cespitosas de inflorescência de cor castanho a castanho escuro na maturação. A folha apresenta uma dobradura devido a marcação do colo. 3 - *Paspalum pumilum* Ness (grama baixa) ocorre em campos úmidos e beira de banhados. São plantas que apresentam rizomas subterrâneos, geralmente, em posição oblíqua, curtos e vigorosos, o que confere um aspecto de touceira achatada e circular. A inflorescência apresenta dois ramos, raramente três, unilaterais espiciformes conjugados em forma de V na extremidade do ramo florífero. As epiguetas medem 1.6 -2.5mm de comprimento e as folhas não apresentam estreitamento na base. 4 - *Saccharum angustifolium* (Ness) Trin., popularmente conhecida como macega-estaladeira, ocorre em campos úmidos ou secos. São plantas cespitosas de inflorescência composta por espiguetas pediceladas e aristadas. A panícula é pilosa e frequentemente apresenta uma espata formada pelo desenvolvimento da bainha da folha mais apical.

A importância da energia solar para as plantas não se restringe apenas a fixação de carbono pela fotossíntese. Ela determina, também, o balanço energético nos ecossistemas. Para uma planta o balanço energético condiciona a sua temperatura e afeta processos fisiológicos como a transpiração, fotossíntese e respiração. Desta forma, a radiação solar pode atuar na plasticidade fenotípica como um desencadeador de fluxos de

tecido conduzindo a morfogênese, de energia direcionada entre rendimentos quânticos fotoquímicos e emissão de fluorescência de clorofila *a*, da emissão de energia livre sob forma de calor, da regulação fitocrômica pela expressão de desenvolvimento e de tropismos (Nobel 1991; Strasser *et al.* 2004).

A relação existente entre reações luminosas da fotoquímica da fotossíntese e a emissão de fluorescência da clorofila *a*, pode ser investigada pela indução de cinética de elétrons em ultra estrutura de cloroplasto. Strasser *et al.* (2004), propuseram a leitura do desempenho fotoquímico das plantas a partir de variáveis biofísicas intrínsecas as unidades fotossintéticas *via* pulsos de excitação contínua ou modulada pelo uso de fluorômetros portáteis, os quais induzem a emissão da fluorescência da clorofila *a*. A derivação destas variáveis biofísicas está de acordo com a Teoria de Fluxo de Energia em Biomembranas, a qual é baseada na ligação entre o comportamento energético do aparato fotossintético e os sinais de fluorescência. Desta forma, é possível um estudo criterioso de todos os processos da distribuição de energia em quaisquer aparatos fotossintéticos, considerando os fluxos específicos, fenomenológicos, rendimentos quânticos e probabilidades de transferência de energia (Strasser *et al.* 2004).

Esta técnica, então denominada fluorescência de cinética rápida, passou a ser extensivamente utilizada como ferramenta não invasiva eficiente na investigação das reações fotoquímicas da fotossíntese associadas a diversos cenários ecofisiológicos como o estresses abióticos tais como o salino (Mehta *et al.* 2010, Liu e Shi 2010), déficit hídrico (Strasser *et al.* 2010), estresse por contaminação por resíduos de óleo (Naidoo *et al.* 2010, Gao e Tam 2011), deficiência nutricional (Lin *et al.* 2009; Li *et al.* 2010), exposição ao ozônio e alta luminosidade (Bussotti *et al.* 2007, Cascio *et al.* 2010), mitigação de estresse (Strasser *et al.* 2004, Strasser *et al.* 2007, Tsimilli-Michael e Strasser 2008, Jiang *et al.* 2009, Zubek *et al.* 2009, Yusuf *et al.* 2010), estresse biótico da infecção por fitopatógenos

(Christen *et al.* 2007) e do impacto de insetos fitófagos (Zangerl *et al.* 2002, Tang *et al.* 2006). O estudo da fluorescência da clorofila *a* permite o acesso em riqueza de detalhes os processos ecofisiológicos de dissipação fotoquímica e não fotoquímica da energia de excitação que ocorre nas membranas dos tilacóides na presença da luz (Krause e Weis 1991, Lazár 1999, Rosenqvist e Van Kooten 2003, Oukarroum *et al.* 2007, Redillas *et al.* 2011, Stirbet e Govindjee 2011).

O processo de análise da fluorescência de cinética rápida (Fig. 1) consiste em acondicionar a unidade amostral ao escuro por determinado tempo e após emitir um pulso de luz suficiente para saturar os aceptores de elétrons, obtendo sinais de emissão de fluorescência basal (F_0) e máxima (F_m). Entre estes dois pontos são registrados uma série de vários outros sinais de intensidade de fluorescência (F_t) que estão associados a reações de combinações e separações de cargas intrínsecas a cadeia transportadora de elétrons entre fotossistemas (Fig. 2). Desta forma são formulados links entre sinais de fluorescência (F_t) e os eventos biofísicos e bioquímicos da fotoquímica da fotossíntese (banda K e banda I) e para os eventos de transdução (Tabela 1) que incluem: absorção (ABS), captura (TR_0), transporte de elétrons (ET_0), dissipação (DI_0), e redução dos aceptores de elétrons do lado acceptor do fotossistema I (RE_0) (Strasser *et al.* 2004, Stirbet e Govindjee 2011).

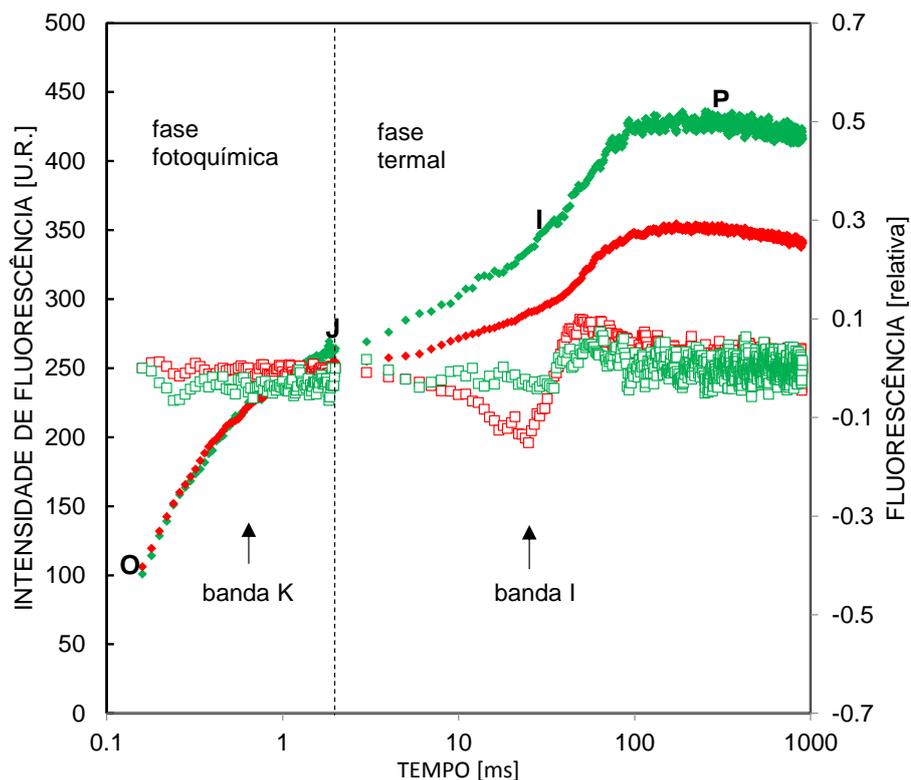


Fig. 1: Os dados utilizados nesta figura são meramente ilustrativos, as cores, portanto, representam duas condições distintas de atividade fotoquímica. A intensidade de fluorescência representa o processo de indução de cinética de elétrons *via* cinética rápida, partindo de um ponto basal O até um máximo P (neste processo o ápice da curva em P representa a saturação dos aceptores de elétrons da cadeia de transportadores de elétrons). A diferença de cinética, apresentado como fluorescência relativa, entre O e J para banda K e entre J e P para banda I é obtida subtraindo a dupla normalização do comportamento tratamento da atividade fotoquímica de uma condição considerada controle. Desvios hiperbólicos positivos são associados a decremento da atividade fotoquímica, enquanto que os desvios negativos representam incremento.

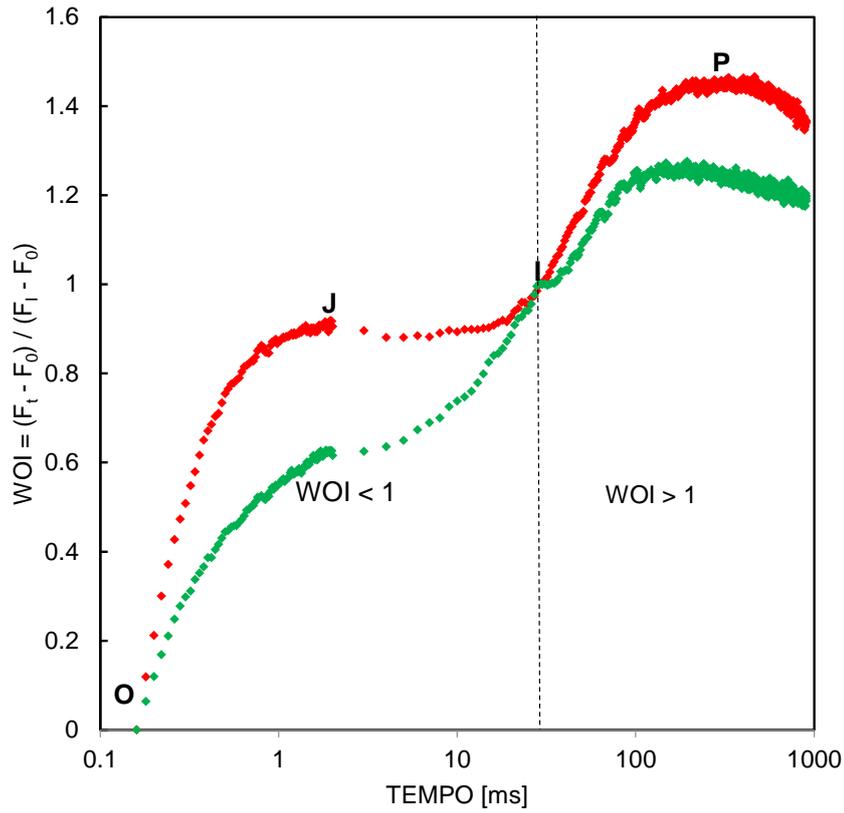


Fig. 2: Os dados utilizados nesta figura são meramente ilustrativos, as cores, portanto, representam duas condições distintas de partição de energia entre subunidades do aparato fotossintético, isto é, uma condição tratamento e uma outra considerada controle. $WOI < 1$ é relativo a eventos de transdução de energia do FSII e $WOI > 1$ aos eventos de FSI. Desvios positivos são associados ao acúmulo de formas reduzidas de transportadores de elétrons.

Tabela 1: Variáveis do Teste Jip

Variáveis da análise da fluorescência da cinética rápida - Teste JIP	
Parâmetros Técnicos	
Intensidade de fluorescência aos 0.16ms (considerado como F_0)	$F_0 = F_1$
Intensidade de fluorescência aos 0.3ms, 2 ms, e 30 ms	$F_2, F_3 \text{ e } F_4$
Intensidade máxima de fluorescência	F_m
Fluorescência variável	$F_v = F_m - F_0$
Origem da inclinação da curva de fluorescência [= taxa relativa de redução de Q_A^- (dQ_A^-/dt_0 por $Q_{A, total}$)]	$M_0 = dV/dt_0 = [4 (F_{0.3ms} - F_0)/(F_m - F_0)]$
Fluorescência relativa variável aos 0.3ms	$V_K = (F_{0.3ms} - F_0)/(F_m - F_0)$
Fluorescência relativa variável aos 2ms	$V_J = (F_{2ms} - F_0)/(F_m - F_0)$
Fluorescência relativa variável aos 30ms	$V_I = (F_{30ms} - F_0)/(F_m - F_0)$
Rendimentos ou razões de fluxo de energia	
Rendimento quântico fotoquímico máximo para fotoquímica primária	$\Phi_{P_0} = TR_0/ABS = (F_m - F_0)/F_m = 1 - (F_0/F_m)$
Probabilidade de um éxciton capturado de se mover para além de Q_A^-	$\Psi_{E_0} = ET_0/TR_0 = 1 - V_J$
Probabilidade de um fóton absorvido tem de se mover além de Q_A^-	$\Phi_{E_0} = \Phi_{P_0} \Psi_{E_0} = (TR_0/ABS)(ET_0/TR_0) = ET_0/ABS = (1 - F_0/F_m)(1 - V_J)$
Rendimento quântico fotoquímico para dissipação de calor	$[\Phi_{D_0} = DI_0/ABS = 1 - \Phi_{P_0} = F_0/F_m]$
Eficiência/ Probabilidade que um elétron do intersistema mover-se para o lado acceptor do FSI	$\bar{\delta}_{R_0} = RE_0/ET_0 = (1 - V_J)/(1 - V_J)$
Eficiência de um exciton capturado de mover um elétron dentro da cadeia transportadora a partir de Q_A^- até os aceptores finais do PSI	$\rho_{R_0} = RE_0/TR_0 = \Psi_{E_0} \bar{\delta}_{R_0}$
Rendimento quântico para redução dos aceptores finais do FSI por fóton absorvido	$\Phi_{R_0} = RE_0/ABS = \Phi_{P_0} \Psi_{E_0} \bar{\delta}_{R_0}$
Fluxos específicos	
Fluxo de absorção por centro de reação RC	$ABS/RC = M_0/V_J \Phi_{P_0}$
Fluxo de energia capturada por CR em $t = 0$	$TR_0/RC = M_0/V_J$
Fluxo de elétrons transportados por CR em $t = 0$	$ET_0/RC = (M_0/V_J) \Psi_{E_0} = (M_0/V_J)(1 - V_J)$
Dissipação de calor por CR em $t = 0$	$[DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)]$
Redução de aceptores finais do lado acceptor do FSI por CR no $t = 0$	$RE_0/RC = M_0 (1/V_J) \Psi_{E_0} \bar{\delta}_{R_0}$
Fluxos fenomenológicos	
Absorção por sessão transversal (<i>cross section</i> - CS)	ABS/CS_0
Captura no instante 0 por CS	$TR_0/CS_0 = (TR_0/ABS)/(ABS/CS)$
Transporte de elétrons no instante 0 por CS	$ET_0/CS_0 = (ET_0/RC)(RC/CS)$
Dissipação de energia no instante 0 por CS	$DI_0/CS = (ABS/CS) - (TR_0/CS)$
Índices de Desempenho	
Densidade de CR por clorofila	$[Y_{RC}/(1 - Y_{RC})] = RC/ABS = (RC/TR_0)(TR_0/ABS) = (V_J/M_0) (F_0/F_m)$
Desempenho para reações redox da fotoquímica primária	$[\Phi_{P_0}/(1 - \Phi_{P_0})] = TR_0/DI_0 = F_0/F_0$
Desempenho das reações das fases termais da fotoquímica	$[\Psi_{E_0}/(1 - \Psi_{E_0})] = ET_0/(d Q_A^-/dt_0)$
Desempenho das reações para as reações redox dos aceptores finais no lado acceptor do FSI	$[\bar{\delta}_{R_0}/(1 - \bar{\delta}_{R_0})]$
Índice de vitalidade para conservação de energia para redução do intersistema	$PI_{ABS} = [Y_{RC}/(1 - Y_{RC})] [\Phi_{P_0}/(1 - \Phi_{P_0})] [\Psi_{E_0}/(1 - \Psi_{E_0})]$
Índice de vitalidade para conservação de energia para redução dos aceptores finais do FSI	$PI_{total} = [Y_{RC}/(1 - Y_{RC})] [\Phi_{P_0}/(1 - \Phi_{P_0})] [\Psi_{E_0}/(1 - \Psi_{E_0})] [\bar{\delta}_{R_0}/(1 - \bar{\delta}_{R_0})]$

A clorofila então excitada durante o princípio da cinética rápida, inevitavelmente retorna a seu estado basal a partir de mecanismos de relaxamento do aparato fotossintético (Tabela 2) *via* fluorescência de cinética lenta (Falkowski *et al.* 1986, Seaton e Walker 1990, Kolber e Falkowski 1993, Nicklisch e Köhler 2001). Este tipo de fluorescência qualifica o estado relaxado pós excitação da clorofila como *quenched* e os mecanismos que permitem o relaxamento como *quenching* (Baker 2008). Desta forma, é possível estudar tais mecanismos a partir da análise de *quenching* (Fig. 3), a qual está associado a

três eventos concorrentes (Krause e Weis 1991, Havaux *et al.* 1991, Roháček 2002): 1 *quenching* fotoquímico relativo a utilização da energia luminosa para os processos fotoquímicos da fotossíntese (Genty *et al.* 1989, Roháček e Bartak 1999), 2 *quenching* não fotoquímico relativo a produção de calor (Krause e Jahns 2004, Demming-Adams *et al.* 1999; Ralph *et al.* 2002) e, 3 relaxamento relativo a emissão de sinais de fluorescência que tem sido relacionado a um *quenching* de fotoinibição (Oxborough e Baker 1997, Klughammer e Schreiber 2008).

Tabela 2: Variáveis da Análise de *Quenching*

Variáveis da análise da fluorescência da cinética lenta - Análise de <i>quenching</i>	
Parâmetros Técnicos - Sinais de emissão de fluorescência	
Fluorescência basal de unidade amostral acondicionada ao escuro	F _o
Fluorescência máxima de unidade amostral acondicionada ao escuro	F _m
Fluorescência basal de unidade amostral não acondicionada ao escuro	F _{o'} = F _o / [(F _v /F _m) + F _o /F _m ']
Fluorescência máxima de unidade amostral não acondicionada ao escuro	F _m '
Variáveis relacionadas ao <i>Quenching</i> da fotoinibição	
<i>Quenching</i> da fotoinibição	F _o /F _m
Fração de energia passivamente dissipada na forma de calor, principalmente devido ao fechamento de centros de reação no FSII	YNO = F/F _m
Variáveis relacionadas ao <i>Quenching</i> fotoquímico	
Máxima eficiência dos processos fotoquímicos no FSII	F _v /F _o
Rendimento quântico fotoquímico máximo	F _v /F _m
Rendimento quântico fotoquímico operacional	F _v /F _m '
<i>Quenching</i> fotoquímico	q _p = (F _m ' - F) / (F _m ' - F _o)
Eficiência fotoquímica do FSII	ΔF/F _m ' = (F _m ' - F) / F _m '
Taxa de transporte de elétrons	ETR = ΔF/F _m ' * FFF * 0.42
Variáveis relacionadas ao <i>Quenching</i> não fotoquímico	
Coefficiente do <i>u</i> enching não fotoquímico	q _N = 1 - (F _m ' - F _o) / (F _m - F _o)
<i>Quenching</i> não fotoquímico	NPQ = (F _m - F _m ') / F _m '
Fração de energia dissipada na forma de calor <i>via</i> mecanismos regulatórios de fotoproteção	YNPQ = (F / F _m ') - (F / F _m)
Frações de energia dos processos concorrentes da fotoquímica da fotossíntese	
Rendimento quântico total	Y _{total} = ΔF/F _m ' + YNPQ + YNO = 1
Fração de energia remanescente de ΔF/F _m	YLOSS = 1 - ΔF/F _m '

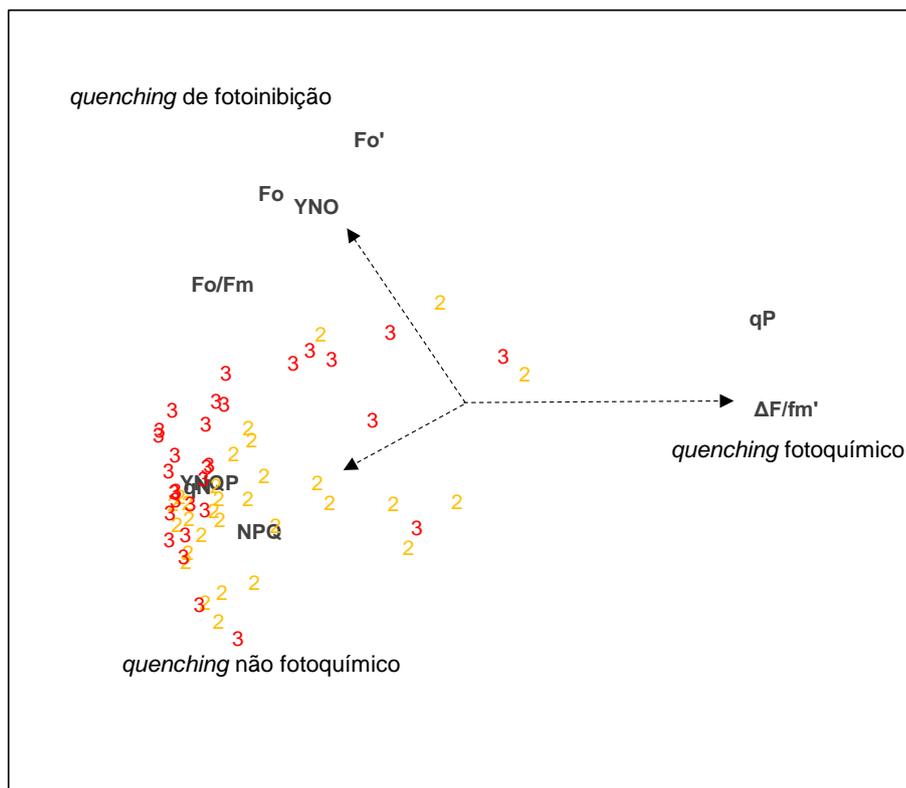


Fig. 3: Análise de *quenching* dos processos concorrentes do uso de energia luminosa durante a fotoquímica da fotossíntese pelo aparato fotossintético. Os caracteres numéricos representam unidades amostrais em uma avaliação experimental. F_0 (F_0' Oxborough e Baker 1997) – emissão de fluorescência basal; F_0/F_m – *quenching* de fotoinibição; q_N – coeficiente de *quenching* não fotoquímico; q_P – *quenching* fotoquímico; NPQ – *quenching* não fotoquímico; $Y(NO)$ – fração de energia passivamente dissipada na forma de calor, principalmente devido ao fechamento de centros de reação do FSII; $Y(NPQ)$ – fração de energia dissipada na forma de calor *via* mecanismos regulatórios de fotoproteção; $\Delta F/F_m'$ – eficiência fotoquímica do FSII.

Neste cenário, a abordagem da tipologia funcional de graminóides de ecossistemas campestres tem sido empregada para compreender a complexidade das formações naturais a partir das variáveis do teor de matéria seca e área foliar específica (Quadros et al. 2009). Assim, podemos, de forma grosseira, considerar dois grupos: plantas cespitosas e plantas prostradas. Estes grupos formados apresentam características morfológicas distintas, entretanto, ainda permanece como incógnita quão funcional é esta classificação. A variação de luz em um ambiente natural exige alto grau de flexibilidade dos vegetais no uso deste recurso de disponibilidade imprevisível, o que pode predizer em parte o sucesso de ocupação no espaço a partir de respostas rápidas ao estímulo

luminoso (Lüttge 1997). Buscando testar a hipótese da existência de um padrão fisiológico compatível com a tipologia funcional, foram utilizadas análises da cinética rápida e lenta da emissão de fluorescência de clorofila *a*. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade fotoquímica de graminóides em um ambiente natural.

Para este estudo, foi considerado a presença do sombreamento natural produzido por nuvens, aferido por sensor de luz, como parte integrante das investigações das respostas das espécies vegetais ao estímulo de luz natural do ambiente. O estudo apresenta no primeiro capítulo a busca por um possível padrão de atividade fotoquímica de graminóides de mesmo tipo funcional. No segundo capítulo, é investigado o mecanismo responsável pela estabilidade da atividade fotoquímica de uma espécie de captura de recursos que apresentou a maior frequência de ocupação dos campos estudados.

1.2 Referências Bibliográficas:

- Baker N.R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. – Annual Review Plant Biol. **59**: 89-113, 2008.
- Boldrini I.L., Eggers L.: Vegetação campestre do sul do Brasil: resposta e dinâmica de espécies à exclusão. – Acta Bot. Bras. **10**: 37-50, 1996.
- Borba M.F.S., Trindade J.P.P. Desafios para conservação e a valorização da pecuária sustentável. In: Pillar V.P., Müller S.C., Castilhos Z.M.S., Jacques A.V.A. Editores. Campos sulinos: Conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília: MMA, 391-403, 2009.
- Box E.O.: Plant functional types and climate at the global scale. – J. Veg. Sci. **7**: 309-320, 1996.
- Bussotti F., Strasser R.J., Schaub M. Photosynthetic behavior of woody species under high ozone exposure probed with the JIP-test: A review. – Environ. Pollution **147**: 430-437, 2007.
- Cascio C., Schaub M., Novak K., Desotgiu R., Bussotti F., Strasser R.J.: Foliar responses to ozone of *Fagus sylvatica* L. seedlings grow in shaded and in full sunlight conditions. – Env. Exp. Bot. **68** (2): 188-197. 2010
- Christen D., Schönmann S., Jermini M., Strasser R. J., Défago G. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ

chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. – *Environ. Exp. Bot.* **60**: 504-514, 2007.

Cruz P., Quadros F.L.F., Theau J.P. *et al.*: Leaf Traits as Functional Descriptors of the Intensity of Continuous Grazing in Native Grasslands in the South of Brazil. – *Rangeland Ecol. Manag.* **63**: 350-338, 2010.

Demmig-Adams B., Adams III.W., Ebbert V., Logan B.A.: Ecophysiology of the xanthophyll cycle. – In: Frank H.A., Young A.J., Britton G., Cogdell R.J. (ed.): *The Photochemistry of Carotenoids*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, Pp. 245–269, 1999.

Falkowski P, Wyman K, Ley A, Mauzerall D. Relationship of steady state photosynthesis to fluorescence in eukaryotic algae. – *Biochim. Biophys. Acta* **849**: 183-192, 1986.

Gao Q.T., Tam, N.F.Y. Growth, photosynthesis and antioxidant responses of two microalgal species, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*, to nonylphenol stress. – *Chemosphere* **82**: 346-354, 2011.

Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. The relationship between the quantum yield of the photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. – *Biochim. Biophys. Acta.* **990**: 87-92, 1989.

Havaux M, Strasser R.J, Greppin H. A theoretical and experimental analysis of the q_P and q_N coefficients of chlorophyll fluorescence quenching and their relation to photochemical and nonphotochemical events. – *Photosynth. Res.* **27**: 41–55, 1991.

Jiang H.X., Tang N., Zheng J.G., Li Y., Chen L.S. Phosphorus alleviates aluminum-induced inhibition of growth and photosynthesis in *Citrus grandis* seedlings. – *Physiol. Plant.* **137**: 298-311, 2009.

Joner F. Redundância funcional em comunidades campestres. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Porto Alegre, 2008.

Klughammer C., Schreiber U.: Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. – *PAM Application Notes* **1**: 27-35, 2008.

Kolber Z, Falkowski P. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ. – *Limnol Oceanogr.* **38**: 1646-1665, 1993.

Krause G.H., Jahns P.: Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. – In: Papageorgiou G, Govindjee (ed.): *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer, Dordrecht, Pp. 463-495, 2004.

Krause G.H., Weis E.: Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. – *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* **42**, 313-349, 1991.

Lavorel S., Garnier E.: Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. – *Func. Ecol.* **16**: 545-556, 2002.

Lavorel S., McIntyre S., Landsberg J., Forbes T.D.: Plant functional classifications: from general groups to specific groups based on response to disturbance. – *Trends Ecol. Evol.* **12**: 474-478, 1997.

Lazár D. Chlorophyll a fluorescence induction. – *Biochim biophys. Acta.* **1412**: 1-28, 1999.

Li Q., Chen L.S., Jiang H.X., Tang N., Yang, L.T., Lin Z.H., Li Y., Yang G.H. Effects of manganese-excess on CO₂ assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport of leaves, and antioxidant systems of leaves and roots in *Citrus grandis* seedlings. – *BMC Plant Biology* **10** (42): 1-16, 2010.

Lin Z.H., Chen L.S., Chen, R.B., Zhang, F.Z., Jiang H.X., Tang N.: CO₂ assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of tea leaves in response to phosphorus supply. – *BMC Plant Biology* **9** (43): 1-12, 2009.

Liu J., Shi D.C. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, inorganic ion and organic acid accumulations of sunflower in responses to salt and salt-alkaline mixed stress. – *Photosynthetica* **48**: 127-134, 2010.

Lüttge U.: *Physiological ecology of tropical plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Pp. 387, 1997.

Mccintyre S., Heard K.M., Martin T.G.: The relative importance of cattle grazing in subtropical grasslands: does it reduce or enhance plant biodiversity? – *J. Appl. Ecol.* **40**: 445-457, 2003.

Mehta P., Jajoo A., Mathur S., Bharti S.: Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. – *Plant Physiol. Bioch.* **48**:16-20, 2010.

Murchie E. H., Lawson T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J Exp. Bot.* 2013.

Nabinger C., Ferreira E.T., Freitas P.C.F.C., Sant'anna, D.M. Produção animal com base no campo nativo: aplicações de resultados de pesquisa. In: Pillar V.P., Müller S.C., Castilhos Z.M.S., Jacques A.V.A. Editores. *Campos sulinos: Conservação e uso sustentável da biodiversidade*. Brasília: MMA, 175-198, 2009.

Naidoo G.N., Naidoo Y., Achar P. Responses of the mangroves *Avicennia marina* and *Bruguiera gymnorrhiza* to oil contamination. – *Flora* **205**: 357-362, 2010.

Nicklisch A.; Köhler J.: Estimation of primary production with Phyto-PAM-Fluorometry. – Ann Rep Inst Freshw Ecol. **13**: 47-60, 2001.

Nobel P.S. Physicochemical and Environmental Plant Physiology. New York: Academic Press. 1991.

Oukarroum A., Madidi S.E.L., Schansker G., Strasser R.J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. – Env. Exp. Bot. **60**: 438-446, 2007.

Oxborough K., Baker N.R.: Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components - calculation of qP and F_v'/F_m' without measuring F_o' . – Photosynth. Res. **54**: 135-142, 1997.

Pillar V.D., Orloci, L.: Character-based community analysis: The Theory and an application program. – Haia, Holanda: SPB Academic Publishing. 1993.

Quadros F.L.F., Trindade J.P.P., Borba M.F. S.: A abordagem funcional da ecologia campestre como instrumento de pesquisa e apropriação do conhecimento pelos produtores rurais. – In: Pillar V.P., Müller S.C., Castilhos Z.M.S., Jacques A.V.A. (ed.): Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Pp. 206-213, 2009.

Ralph P.J., Polk S., Moore K.A., Orth R.J., Smith W.A.: Operation of the xanthophyll cycle in the seagrass *Zostera marina* in response to variable light. – J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **271**: 189-207, 2002.

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

Roháček, K; Bartak, M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. – *Photosynthetica* **37**: 339-363, 1999.

Redillas M.C.F.R., Strasser R.J., Jeong J.S., Kim Y.S., Kim J.K.: The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing OsNAC10. – *Plant Biotech Report*: **5**:169-175. 2011.

Rosenqvist E., Van Kooten O.: Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature. In: DeEll, J.R., Toivonen, P.M.A. (ed), *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pp. 31-77, 2003.

Seaton G.G.R., Walker D.A. Chlorophyll fluorescence as a measure of photosynthetic carbon assimilation. – *Proc Roy Soc London* **242**: 29-35, 1990.

Stibert A., Govindjee: On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. – *J. Photoch. Photobio. B* **104**: 236-257, 2011.

Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M.: Analysis of fluorescence transient. – In: Papageogiou G., Govindjee (ed.): Chlorophyll Fluorescence: a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration. Pp. 321-362. Springer, Dordrecht, 2004.

Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Dangre D., Rai M.: Biophysical phenomics reveals functional building blocks of plants systems biology: a case study for the evaluation of the impact of Mycorrhization with *Piriformospora indica*. In: Varma A., Oelmüller R.: (ed.): Advanced Techniques in Soil Microbiology, Soil Biology. Heidelberg, Berlin, Pp. 319-341, 2007.

Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Qiang S., Goltsev V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. – Biochim. Biophys. Acta **1797**: 1313–1326, 2010.

Strasser R.J.: Donor side capacity of photosystem II probed by Polifasic chlorophyll *a* fluorescence transients. – Photosynth. Res. **52**: 147-155, 1997.

Suttie J.M., Reynolds S.G., Batello C.: Grasslands of the world. Rome: FAO – Food and Agriculture of the United Nations. Pp. 514, 2005.

Tang J.Y., Zielinski R.E., Zangerl A.R., Crofts A.R., Berenbaum M.R, Delucia E.M. The differential effects of herbivory by first and fourth instars of Trichoptera (Lepidoptera:

Noctuidae) on photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. – *Environ. Exp. Bot.* **57**: 527-536, 2006.

Tsimilli-Michael M., Strasser, R.J. In vivo assessment of plants' vitality: applications in detecting and evaluating the impact of Mycorrhization on host plants, In: A. Varma (ed.), *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*, 3rd edition, Springer, Dordrecht, 679-703, 2008.

Weiher E., Werf A., Thompson K., *et al.*: Challenging Theophrastus: A common core list of plant traits for functional ecology. – *J. Veg. Sci.* **10**: 609-620, 1999.

Welker C.A.D., Longhi-Wagner H.M. A família Poaceae no Morro Santana, Rio Grande do Sul, Brasil. – *R. Bras. Biociências.* **5**: 53-92, 2007.

Yusuf M.A., Kumar D., Rajwanshi R., *et al.*: Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. – *Biochim. Biophys. Acta* **1797**: 1428-1438, 2010.

Zangerl A.R., Hamilton J.G., Miller T.J., Crofts A.R., Oxborough K., Bercllbaum M.R., Delucia E.H. Impact of folivory on photosynthesis is greater than the sum of its holes. – *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**: 1088-1091, 2002.

Zubek S., Turnau K., Tsimilli-Michael M., Strasser R.J. Response of endangered plant species to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. – *Mycorrhiza* **19**: 113-123, 2009.

Capítulo 1

2.1 Transdução de energia fotoquímica em graminóides de um campo de dupla estrutura

2.2 Introdução:

O campo de dupla que compõe grande parte vegetação campestre no Sul do Brasil foi moldado ao longo de milhares de anos, principalmente, por meio de queimadas e pastejo, resultando nas fisionomias contemporâneas dos Campos Sulinos (Araújo et al. 1948, Saint-Hillaire et al. 2002, Soares et al. 2002, Rambo 2005, Overbeck et al. 2007, Andrade et al. 2015). Tais áreas evidenciam um estado de transição pela sucessão de espécies (Boldrini e Eggers 1996, McIntyre et al. 2003, Stringham et al, 2003). Neste ambiente são encontradas espécies prostradas como o *Axonopus affinis* Chase (grama tapete) e *Paspalum pumilum* Ness (grama baixa) que contrastam com as cespitosas *Axonopus argentinus* Parodi (grama argentina) e *Saccharum angustifolium* (Ness) Trin. (macega-estaladeira) (Welker e Longhi-Wagner 2007).

A abordagem de tipologia funcional surge como tentativa de compreender a complexidade da vegetação campestre, agrupando espécies diferentes em grupos relacionados a estratégias de captura ou conservação de recursos (Pillar e Quadros 1997, Focht e Pillar 2003, Suttie *et al.* 2005, Quadros *et al.* 2009, Cruz *et al.* 2010). As características fisiológicas marcantes nesta abordagem são a rápida ciclagem de nutrientes para espécies de captura de recursos (plantas prostradas) e a alocação de carbono na parte aérea (plantas cespitosas). Assim, os grupos formados podem relacionar os aspectos adaptativos das plantas aos processos dominantes no ecossistema (Pillar e Orlóci 1993, Box 1996, Lavorel *et al.* 1997, Weiher *et al.* 1999, Lavorel e Garnier 2002).

A variação de luz em um ambiente natural exige alto grau de plasticidade dos vegetais no uso deste recurso de disponibilidade imprevisível, o que pode predizer em parte o sucesso de ocupação no espaço a partir de respostas rápidas ao estímulo luminoso (Lüttge 1997). A energia luminosa do meio abiótico capturada pelo complexo coletor de

luz (*light harvesting complex* – LHC) presente nos cloroplastos é direcionada a uma série de proteínas transmembranas, as quais são hábeis no uso eficiente de energia *via* mecanismos físicos de ressonância e químicos de reações de oxi redução da transdução de energia fotoquímica (Strasser *et al.* 2004). Os fenômenos concorrentes inerentes desta atividade fotoquímica podem ser analisados a partir da fluorescência transiente da clorofila *a* e da análise de *quenching* (Stirbet e Govindjee 2012, Murchie e Lawson 2013).

Para uma planta o balanço energético condiciona a sua temperatura e afeta processos fisiológicos como a transpiração, fotossíntese e respiração. Desta forma, a radiação solar pode atuar na plasticidade fenotípica como um desencadeador de fluxos de tecido conduzindo a morfogênese, de energia direcionada entre rendimentos quânticos fotoquímicos e emissão de fluorescência de clorofila *a*, da emissão de energia livre sob forma de calor, da regulação fitocrômica pela expressão de desenvolvimento e de tropismos (Nobel 1991; Strasser *et al.* 2004). Os campos de dupla estrutura no Sul do Brasil, mostram-se como resultante da interação de múltiplos fatores ambientais expressados nos fenótipos de uma composição vegetal pouco estudada (Overbeck *et al.* 2007, Quadros *et al.* 2009, Andrade *et al.* 2015). Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade fotoquímica de graminóides dominantes em um campo natural, buscando testar a hipótese da existência de um padrão fisiológico compatível com a tipologia funcional de captura ou conservação de recursos.

2.3 Materiais e métodos:

O estudo foi conduzido em vegetação campestre de uma área experimental da Embrapa Pecuária Sul, Hulha Negra/RS (verão 2015-2016). Os dados foram coletadas de duas espécies do tipo funcional de captura de recursos: *Axonopus affinis* Chase e *Paspalum pumilum* Ness; e de duas espécies de conservação de recursos: *Axonopus argentinus* Parodi e *Saccharum angustifolium* (Ness) Trin.. O clima da área experimental é classificado como *Marine – Mild Winter* [Cfb (Köppen)] (Moreno 1961). As temperaturas apresentam variação sazonal com média de temperatura máxima de 20–24°C, média de temperatura mínima de 12–16°C e média de precipitação mensal de 118.7mm.

A amostragem preferencial (Mueller-Dombois and Ellenberg 1974) foi precedida por reconhecimento visual da composição e estrutura da vegetação. Desta forma, condições homogêneas com 90% de dominância de cada espécie foram mantidas. Neste estudo foram utilizadas 188 unidades amostrais (folhas jovens, não danificadas e totalmente expandidas).

Para acessar mudanças nos transientes da emissão de fluorescência de clorofila *a* (cinética OJIP) as unidades amostrais foram acondicionadas ao escuro por 30 minutos (Fluorômetro *OS-30p* (*Opti-Sciences* Hudson, NH, USA)). As medidas foram feitas durante o início da manhã (controle) e ao longo de um dia ensolarado, respeitando o intervalo de uma hora entre cada nova medida durante o período da tarde (14, 15 e 16 horas). Adicionalmente uma nova medida as 15 horas foi repetida na presença de muitas nuvens. Os dados foram plotados em escala logarítmica partindo de um ponto basal de emissão de fluorescência (O) até um nível máximo desta emissão (P), destacando inflexões intermediárias destes pontos (pontos J e I da curva OJIP). Após este tratamento, os dados da curva OJIP foram duplamente normalizados entre O-I e I-P e, apresentados

como cinética relativa variável de fluorescência no tempo t conforme segue: $V_t = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$ representado por $W_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_P)$ e $W_{JP} = (F_t - F_J)/(F_m - F_J)$ separando eventos fotoquímicos de oxidação associados ao fotossistema II (FSII) dos que ocorrem no fotossistema I (FSI) (Yusuf *et al.* 2010).

O teste JIP (Tabela 1) (Strasser e Strasser 1995, Strasser e Tsimilli-Michael 2008, Stirbet e Govindjee 2011) foi utilizado para analisar cada transiente da fluorescência da clorofila a . O conceito do teste JIP é fundamentado na Teoria de Fluxo de Energia em Bio-membranas (Strasser *et al.* 2004), que define o fluxo de energia fotoquímica para os eventos de transdução de energia que incluem: absorção de energia (ABS), captura de elétrons (TR_0), transporte de elétrons (ET_0) e dissipação de calor (Di_0).

As variáveis da análise de *quenching* foram obtidas em três etapas (tabela 2): (1) para monitorar as variáveis F_0 , F_m , F_0/F_m , F_v/F_0 and F_v/F_m (Roháček 2002) foram utilizadas unidades amostrais acondicionadas ao escuro por 30 minutos; (2) as variáveis F_0' (F_0' como $F_0' = F_0 / [(F_v/F_m) + F_0/F_m']$) foi calculada de acordo com Oxborough e Baker (1997)), F_m' e F_v'/F_m' foram monitoradas a partir de unidades amostrais acondicionadas a luz ambiente; (3) em seguida, foram calculados valores para as variáveis $\Delta F/F_m'$, q_P , q_N , YNO, YNPQ, NPQ e ETR (Schreiber *et al.* 1986, Genty *et al.* 1989, Klughammer e Schreiber 2008). A densidade de fluxo de fótons fotossintetizantes (*photosynthetic photon flux density* - PPF) foi determinada a partir de um sensor quântico de luz LI-190R (*Li-COR*, Lincoln, NE, USA).

Tabela 1: Teste Jip

Variáveis da análise da fluorescência da cinética rápida - Teste JIP	
Parâmetros Técnicos	
Intensidade de fluorescência aos 0.16ms (considerado como F_0)	$F_0 = F_1$
Intensidade de fluorescência aos 0.3ms, 2 ms, e 30 ms	$F_2, F_3 \text{ e } F_4$
Intensidade máxima de fluorescência	F_m
Fluorescência variável	$F_v = F_m - F_0$
Origem da inclinação da curva de fluorescência [= taxa relativa de redução de Q_A^- (dQ_A^-/dt_0 por $Q_{A\text{ total}}^-$)]	$M_0 = dV/dt_0 = [4 (F_{0.3ms} - F_0)/(F_m - F_0)]$
Fluorescência relativa variável aos 0.3ms	$V_K = (F_{0.3ms} - F_0)/(F_m - F_0)$
Fluorescência relativa variável aos 2ms	$V_J = (F_{2ms} - F_0)/(F_m - F_0)$
Fluorescência relativa variável aos 30ms	$V_I = (F_{30ms} - F_0)/(F_m - F_0)$
Rendimentos ou razões de fluxo de energia	
Rendimento quântico fotoquímico máximo para fotoquímica primária	$\Phi_{P_0} = TR_0/ABS = (F_m - F_0)/F_m = 1 - (F_0/F_m)$
Probabilidade de um éxíton capturado de se mover para além de Q_A^-	$\Psi_{E_0} = ET_0/TR_0 = 1 - V_J$
Probabilidade de um fóton absorvido tem de se mover além de Q_A^-	$\Phi_{E_0} = \Phi_{P_0} \Psi_{E_0} = (TR_0/ABS)(ET_0/TR_0) = ET_0/ABS = (1 - F_0/F_m)(1 - V_J)$
Rendimento quântico fotoquímico para dissipação de calor	$[\Phi_{D_0} = DI_0/ABS = 1 - \Phi_{P_0} = F_0/F_m]$
Eficiência/ Probabilidade que um elétron do intersistema mover-se para o lado acceptor do FSI	$\delta_{R_0} = RE_0/ET_0 = (1 - V_I)/(1 - V_J)$
Eficiência de um exciton capturado de mover um elétron dentro da cadeia transportadora a partir de Q_A^- até os aceptores finais do PSI	$\rho_{R_0} = RE_0/TR_0 = \Psi_{E_0} \delta_{R_0}$
Rendimento quântico para redução dos aceptores finais do FSI por fóton absorvido	$\Phi_{R_0} = RE_0/ABS = \Phi_{P_0} \Psi_{E_0} \delta_{R_0}$
Fluxos específicos	
Fluxo de absorção por centro de reação RC	$ABS/RC = M_0 V_J / \Phi_{P_0}$
Fluxo de energia capturada por CR em $t = 0$	$TR_0/RC = M_0 V_J$
Fluxo de elétrons transportados por CR em $t = 0$	$ET_0/RC = (M_0 V_J) \Psi_{E_0} = (M_0 V_J)(1 - V_J)$
Dissipação de calor por CR em $t = 0$	$[DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)]$
Redução de aceptores finais do lado acceptor do FSI por CR no $t = 0$	$RE_0/RC = M_0 (1/V_J) \Psi_{E_0} \delta_{R_0}$
Fluxos fenomenológicos	
Absorção por sessão transversal (<i>cross section</i> - CS)	ABS/CS_0
Captura no instante 0 por CS	$TR_0/CS_0 = (TR_0/ABS)/(ABS/CS)$
Transporte de elétrons no instante 0 por CS	$ET_0/CS_0 = (ET_0/RC)(RC/CS)$
Dissipação de energia no instante 0 por CS	$DI_0/CS = (ABS/CS) - (TR_0/CS)$
Índices de Desempenho	
Densidade de CR por clorofila	$[Y_{RC}/(1 - Y_{RC})] = RC/ABS = (RC/TR_0)(TR_0/ABS) = (V_J/M_0) (F_v/F_m)$
Desempenho para reações redox da fotoquímica primária	$[\Phi_{P_0}/(1 - \Phi_{P_0})] = TR_0/DI_0 = F_v/F_0$
Desempenho das reações das fases termais da fotoquímica	$[\Psi_{E_0}/(1 - \Psi_{E_0})] = ET_0/(d Q_A^-/dt_0)$
Desempenho das reações para as reações redox dos aceptores finais no lado acceptor do FSI	$[\delta_{R_0}/(1 - \delta_{R_0})]$
Índice de vitalidade para conservação de energia para redução do intersistema	$PI_{ABS} = [Y_{RC}/(1 - Y_{RC})] [\Phi_{P_0}/(1 - \Phi_{P_0})] [\Psi_{E_0}/(1 - \Psi_{E_0})]$
Índice de vitalidade para conservação de energia para redução dos aceptores finais do FSI	$PI_{total} = [Y_{RC}/(1 - Y_{RC})] [\Phi_{P_0}/(1 - \Phi_{P_0})] [\Psi_{E_0}/(1 - \Psi_{E_0})] [\delta_{R_0}/(1 - \delta_{R_0})]$

Tabela 2: Análise de *quenching*

Variáveis da análise da fluorescência da cinética lenta - Análise de <i>quenching</i>	
Parâmetros Técnicos - Sinais de emissão de fluorescência	
Fluorescência basal de unidade amostral acondicionada ao escuro	F_o
Fluorescência máxima de unidade amostral acondicionada ao escuro	F_m
Fluorescência basal de unidade amostral não acondicionada ao escuro	$F_o' = F_o / [F_v/F_m] + F_o/F_m'$
Fluorescência máxima de unidade amostral não acondicionada ao escuro	F_m'
Variáveis relacionadas ao <i>Quenching</i> da fotoinibição	
<i>Quenching</i> da fotoinibição	F_o/F_m
Fração de energia passivamente dissipada na forma de calor, principalmente devido ao fechamento de centros de reação no FSII	$YNO = F/F_m$
Variáveis relacionadas ao <i>Quenching</i> fotoquímico	
Máxima eficiência dos processos fotoquímicos no FSII	F_v/F_o
Rendimento quântico fotoquímico máximo	F_v/F_m
Rendimento quântico fotoquímico operacional	F_v/F_m'
<i>Quenching</i> fotoquímico	$q_p = (F_m' - F) / (F_m' - F_o')$
Eficiência fotoquímica do FSII	$\Delta F/F_m' = (F_m' - F) / F_m'$
Taxa de transporte de elétrons	$ETR = \Delta F/F_m' * FFF * 0.42$
Variáveis relacionadas ao <i>Quenching</i> não fotoquímico	
Coefficiente do <i>u</i> enching não fotoquímico	$q_N = 1 - (F_m' - F_o') / (F_m - F_o)$
<i>Quenching</i> não fotoquímico	$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$
Fração de energia dissipada na forma de calor <i>via</i> mecanismos regulatórios de fotoproteção	$YNPQ = (F / F_m') - (F / F_m)$
Frações de energia dos processos concorrentes da fotoquímica da fotossíntese	
Rendimento quântico total	$Y_{total} = \Delta F/F_m' + YNPQ + YNO = 1$
Fração de energia remanescente de $\Delta F/F_m'$	$Y_{LOSS} = 1 - \Delta F/F_m'$

O método de ordenação multivariada foi utilizado para identificar padrões de variação na atividade fotoquímica entre espécies de mesmo tipo funcional. Foi feita transformação vetorial dos dados dentro de variáveis, optando pela padronização pela amplitude. As variáveis de atividade fotoquímica foram submetidas a análise de coordenadas principais, utilizando a distância de Corda como uma medida de dissimilaridade entre unidades amostrais. O método de auto reamostragem *bootstrap* foi utilizado para testar a estabilidade dos eixos de ordenação ($\alpha = 0.1$) (Pillar 1999). Objetivando detectar padrão de resposta entre espécies de mesmo tipo funcional e para testar a significância das correlações das variáveis fotoquímicas, as unidades amostrais foram submetidas a análise de variância multivariada *via* testes de aleatorização com

10.000 permutações, utilizando a distância de Corda como medida de dissimilaridade ($\alpha = 0.05$). Buscando reunir unidades amostrais similares em um mesmo grupo nítido (Pillar 1999), foi feita uma análise de agrupamentos utilizando o método de soma de quadrados para agrupar as unidades amostrais. O limiar de probabilidade para avaliar a nitidez de grupos formados foi $\alpha = 0.1$. As análises foram feitas com auxílio do aplicativo computacional MULTIV (Pillar 2004).

2.4 Resultados e discussão:

O transiente OJIP das quatro espécies vegetais mostrou um típico crescimento polifásico (Stirbet e Govindjee 2011) iniciando de um ponto basal O (mínima fluorescência) até um ponto máximo P (máxima fluorescência) (Fig. 4ABCD). Espécies do tipo funcional de captura de recursos apresentaram maior área acima da curva de fluorescência (area) e maior resposta para emissão de fluorescência mínima (Fig. 4AB). Enquanto isso, *S. angustifolium* mostrou incremento em area durante o horário de maior intensidade luminosa [$1988.257 \pm 7.65 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$] às 15 h (Fig. 4D).

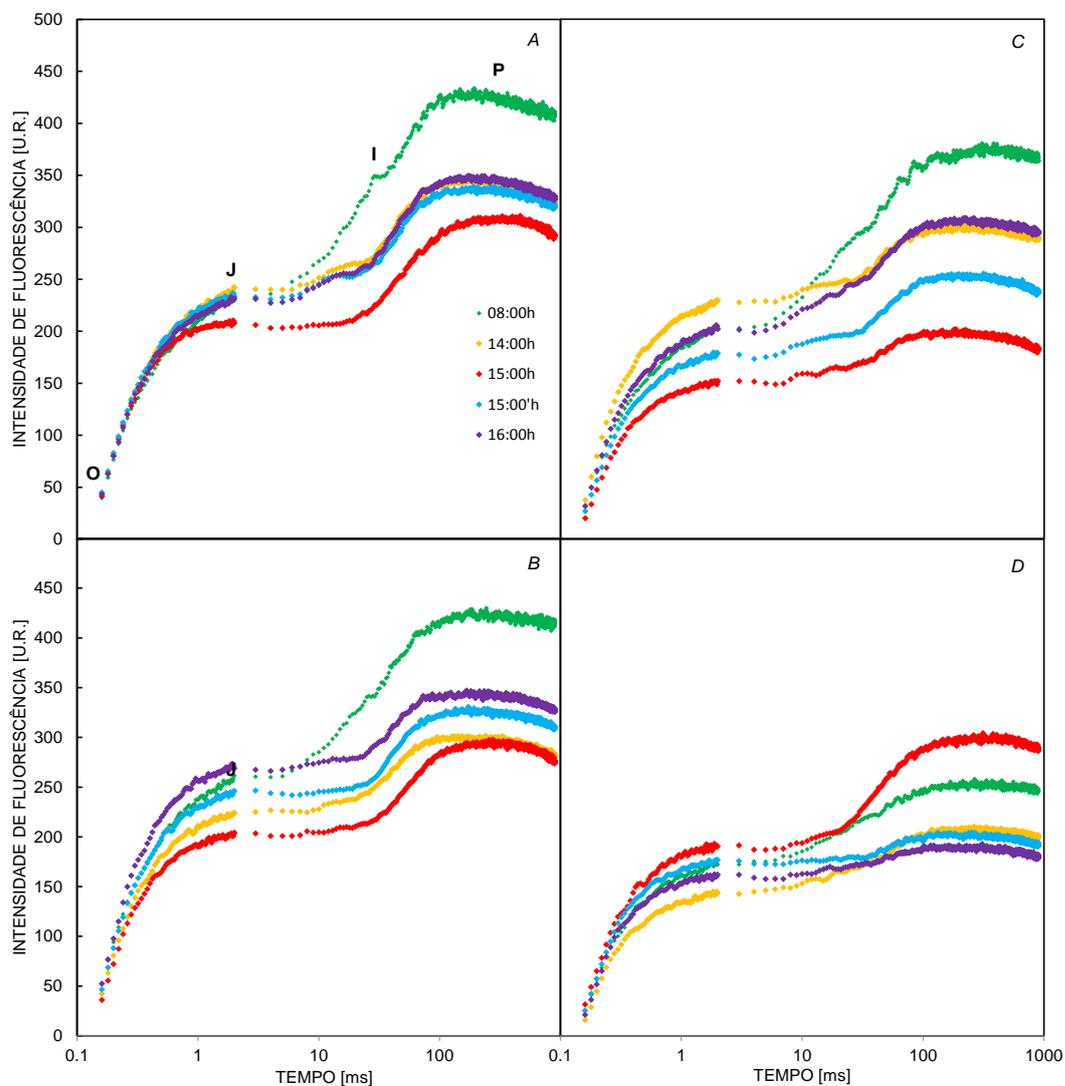


Fig 4: Mudanças na emissão dos transientes da fluorescência da clorofila *a* (cinética OJIP). *A* - *Axonopus affinis* Chase, *B* - *Paspalum pumilum* Ness, *C* - *Axonopus*

argentinus Parodi, *D – Saccharum angustifolium* (Ness) Trin.. A presença de nuvens é assinalada como 15:00'h.

A área acima da curva de fluorescência entre O e P (area) representa o tamanho do *pool* de transportadores de elétrons do FSII, os quais incluem Q_A e Q_B (Joliot e Joliot 2002). Reduções na area ocorrem quando o transporte de elétrons do centro de reação para o *pool* de quinonas é bloqueado parcial ou totalmente (Mehta *et al* 2010). A mudança na curva OJIP indicou que espécies capturadoras de recursos são beneficiadas pelo sombreamento produzido por nuvens e que *S. angustifolium* apresentou incremento no *pool* de quinonas na ausência deste tipo de sombreamento.

Foram observados comportamentos distintos para as 4 espécies graminóides na atividade fotoquímica considerando a dupla normalização que separa os eventos de captura de energia que iniciam no FSII incluindo a redução do *pool* de plastoquinonas [fase O-I, $W_{OI} < 1$, $W_{OI} = (F_t - F_0) / (F_I - F_0)$] dos eventos de transferência de energia para os aceptores finais no lado acceptor do fotossistema 1 (FSI) partindo de PQH₂ [fase I-P, $W_{OI} > 1$, $W_{OI} = (F_t - F_0) / (F_I - F_0)$] (Fig. 7ABCD).

De forma geral, o desvio positivo da curva $W_{OI} < 1$ representou acúmulo de formas reduzidas do *pool* de quinonas (Krause e Weis 1991, Lazar 1999, Stirbet e Govindjee 2011) e, por tanto, danos ao lado acceptor do FSII (ao longo do dia e de forma mais acentuada as 15 h [$1988.257 \pm 7.65 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$] (Fig. 5ABCD). Entretanto, pode-se observar que *S. angustifolium* parece resistir mais a esta condição (Fig 5D). Os desvios positivos observados na curva $W_{OI} > 1$ representam acúmulo de formas reduzidas de aceptores de elétrons do lado acceptor do FSI e está reportado a inativação de ferridoxina NADP⁺ oxidoreductase (FNR) (Redilas *et al.* 2011). Desta forma, uma maior intensidade luminosa as 14 e 15 h [respectivamente, 2050.271 ± 44.31 e $1988.257 \pm 7.65 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$], potencializou a atividade fotoquímica do FSI em *A. argentinus* e

P. pumilum e produziu efeitos deletérios em *A. affinis* e *S. angustifolium*. A influência do sombreamento [assinalado como $15 \text{ h}' 959.7 \pm 373.82 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$] na atividade de oxi redução produziu uma resposta de mitigação sobre este acúmulo de formas reduzidas de aceptores de elétrons no lado acceptor do FSI em contraste com a ausência deste sombreamento para o mesmo horário em todas as espécies (Fig. 5ABCD).

As unidades fotossintéticas representam o sítio das reações fotoquímicas de separação e recombinação de cargas. Estes eventos são mediados por um *pool* de transportadores de elétrons entre as unidades de FSII e FSI (Strasser *et al.* 2004). Distúrbios no transiente OJIP podem relacionar a atividade redutora do FSII com a atividade de re oxidação do FSI (Krause e Weis 1991, Lazar 1999, Stirbet e Govindjee 2011, Redilas *et al.* 2011). O acúmulo de formas reduzidas de Q_A pode levar à ocorrência de espécies reativas de oxigênio e a danos irreversíveis dos componentes de unidades fotossintéticas do FSII (Chen *et al.* 2012). Neste contexto, o incremento da atividade de FSI pode estar associado a maior eficiência em partição de energia entre FSII e FSI a partir do desempilhamento de tilacóides e contribuindo, por tanto, para manutenção do *pool* de aceptores de elétrons durante a exposição de um evento de estresse luminoso (Strasser *et al.* 1997, Joliot e Joliot 2002, Oukarrom *et al.* 2007, Araújo e Demicinis 2009).

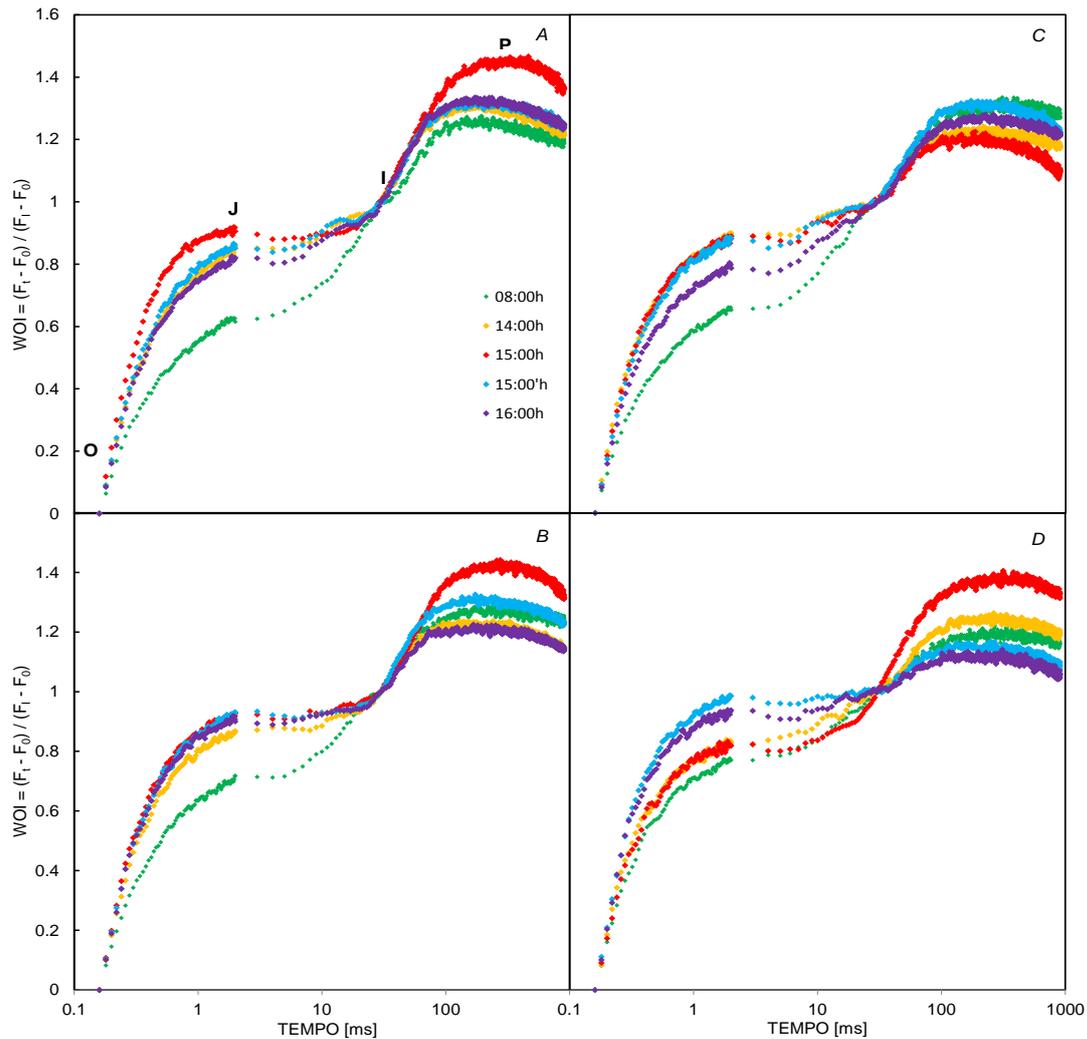


Fig. 5: Mudanças na emissão dos transientes da fluorescência da clorofila *a* duplamente normalizado entre O e I (cinética WOI). *A* - *Axonopus affinis* Chase, *B* - *Paspalum pumilum* Ness, *C* - *Axonopus argentinus* Parodi, *D* - *Saccharum angustifolium* (Ness) Trin.. A presença de nuvens é assinalada como 15:00'h.

Diagramas de mesma ordenação mostram diferentes padrões de atividade fotoquímica entre espécies de tipos funcionais de captura em contraste com as espécies de conservação de recursos ($p = 0.0003$). Considerando a matriz total de dados, o eixo I explica 40.08% e o eixo II 25.26%, o que representa 65.34% da variação total dos dados. O horário controle produziu um comportamento de atividade fotoquímica distinta em contraste com as outras medidas de horários ($p = 0.0001$) e similar entre as quatro espécies

graminóides estudadas ($p > 0.05$). Entretanto, os mecanismos fisiológicos de atividade fotoquímica diferem entre as espécies estudadas ($p < 0.05$).

Estes resultados reforçam a hipótese construída a partir de uma abordagem de diversidade funcional (Pillar e Orłóci 1993, Box 1996, Lavorel *et al.* 1997, Weiher *et al.* 1999, Lavorel e Garnier 2002) de que espécies graminóides respondem as variações bióticas e abióticas *via* plasticidade de atributos (Quadros *et al.* 2009, Nabinger *et al.* 2009), caracterizando um estado transitório entre o tipo funcional de captura de recursos e o de conservação de recursos (Cruz *et al.* 2010). Neste estudo, o campo apresentou típica dupla estrutura contemporânea com a presença de plantas prostradas e cespitosas (Araújo *et al.* 1948, Saint-Hillaire *et al.* 2002, Soares *et al.* 2002, Rambo 2005, Overbeck *et al.*, 2007). As propriedades que emergem deste tipo de comunidade vegetal incluem estratégias de controle e tolerância por meio de mecanismos que reduzem o acesso do tecido foliar ao dano por herbivoria (Sosinski e Pillar 2004). As relações positivas da interação entre plantas em uma comunidade vegetal pode prover facilitação ao criar micro *habitats* com diferentes condições de intensidade luminosa e, assim, reduzir o estresse térmico, a evapotranspiração e danos por incidência de ventos (Stringham *et al.* 2003, Padilla *et al.* 2008). O efeito do sombreamento, determina também, a sinalização de genes promotores de captura ou conservação de recursos do ambiente (Ballaré 2009, Cruz *et al.* 2010). Entretanto, o conhecimento incipiente dos mecanismos da plasticidade vegetal em um ambiente natural desafiam nosso entendimento sobre os processos ecológicos (Semchenko *et al.* 2012).

Os mecanismos fisiológicos de maior relevância para *A. affinis* foram evidenciados a partir de uma análise de coordenadas principais que explicou 68,63% da variação total dos dados. Grupos nítidos de unidades amostrais ($p > 0.1$) corroboraram que o acúmulo de formas reduzidas de Q_A observado no transiente OJIP (Fig. 4A)

direcionou o comportamento fotoquímico para atividade de dissipação de energia na forma de calor (DI_0/RC) durante os horários de maior intensidade luminosa (Fig. 6A). Correlações significativas entre DI_0/RC e V_J em contraste com PI ABS, ϕ_{E0} e $\psi_{E0}/(1-\psi_{E0})$ ($p = 0.0001$) sustentam esta hipótese.

Considerando um terceiro eixo de ordenação multivariada (gráfico não apresentado), pode ser constatado uma correlação significativa entre TR_0/RC e YNPQ ($p = 0.03$). Este terceiro eixo reduziu o poder de síntese e explicação da variação total dos dados para 50,678%, entretanto, trouxe um resultado valioso diretamente relacionado com atividade fotoquímica de captura de elétrons por centros de reação não redutores de Q_A (Strasser *et al.* 2004).

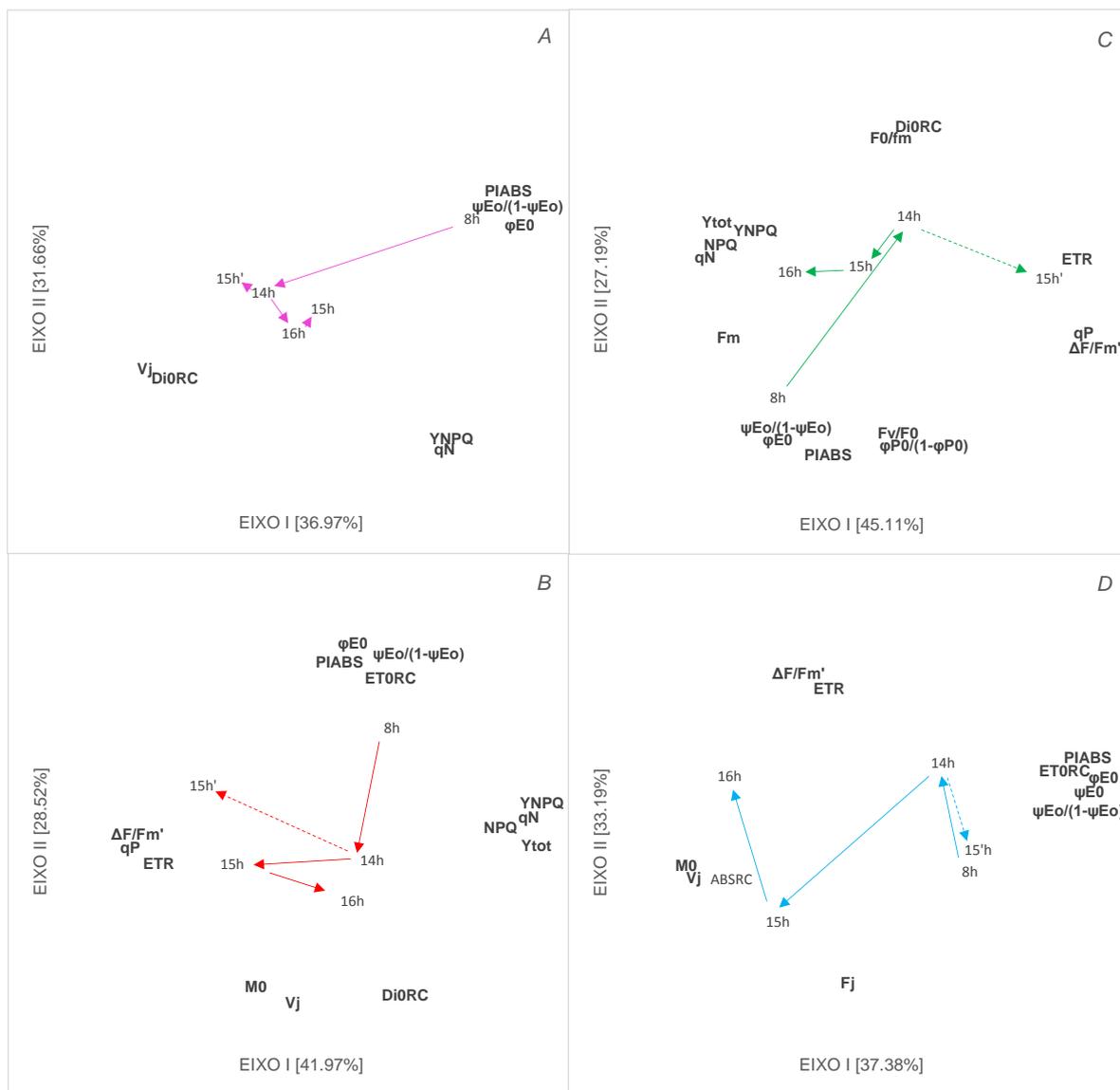


Fig. 6: Diagramas de mesma ordenação de 188 unidades amostrais, descritas pela atividade fotoquímica de: A - *Axonopus affinis* Chase, B – *Paspalum pumilum* Ness, C – *Axonopus argentinus* Parodi, D – *Saccharum angustifolium* (Ness) Trin.. Os caracteres numéricos representam a hora da coleta dos dados (8 = 08:00h, 14 = 14:00h, 15 = 15:00h, 15' = 15:00'h, 16 = 16:00h). Variáveis da atividade fotoquímica estão listadas em Tabela 1 e 2 no item metodologia. Posição original dos descritores somente é mostrada quando a correlação com pelo menos um dos eixos foi maior do que 0.80. Os eixos apresentados foram estáveis com 10.000 iterações.

A prevenção de danos ao aparato fotossintético e suas subunidades ativas pode ser feita a partir da dissipação de energia excedente por meio de centros não redutores de

quinonas, assim, a energia capturada é rapidamente perdida na forma de calor (Strasser *et al.* 2004). Mudanças em NPQ refletem a atividade do ciclo das xantofilas, o qual protege o aparato fotossintético de danos causados por luz excessiva (Demming-Adams *et al.* 1999; Ralph *et al.* 2002, Krause e Jahns 2004).

A análise de coordenadas principais para *P. pumilum* explicou 70,49% da variação total dos dados e 4 grupos nítidos ($p > 0.1$) foram obtidos a partir de uma análise de agrupamento (dados não mostrados). O comportamento do transiente OJIP (Fig. 4B) e a trajetória (resposta ecofisiológica das unidades amostrais no tempo, Fig. 6B) sugeriram que um mecanismo de *quenching* fotoquímico esteve associado a variáveis de dissipação de calor como resposta à exposição a luz natural. Entretanto, considerando a matriz total de dados para *P. pumilum*, esta hipótese não se sustenta pois correlações significativas entre ETR e ψ_{E0} ($p = 0.014$), DI_0/RC e ψ_{E0} ($p = 0.0001$), M_0 em contraste com ψ_{E0} , q_N , NPQ e YPNQ ($p < 0.05$) revelam uma fotoinibição dinâmica e conservação de energia associado a um eficiente mecanismo de *quenching* não fotoquímico. Mecanismos do *quenching* fotoquímico foram mais evidentes durante as 15 horas com e sem a presença de sombreamento, compreendendo um mesmo grupo nítido (análise de agrupamentos $p > 0.1$).

A fotoinibição é um efeito reversível quando em estágios iniciais de exposição a maior intensidade luminosa, no entanto a inibição prolongada pode resultar na completa oxidação do FSII, o qual pode ser reparado (Dias e Marengo 2006, Gonçalves *et al.* 2010). Sob moderado excesso de luz pode ser observado fotoinibição dinâmica, no qual o rendimento quântico e a conservação de energia estão correlacionados e respondem retornando ao estado base quando as condições de estresse do ambiente de luz cessam (Force *et al.* 2003, Jiang *et al.* 2008).

Foi observado uma maior amplitude de respostas fotoquímicas em *A. argentinus* com 70.49% de explicação total da variação dos dados (Fig. 6C) considerando as distâncias entre unidades amostrais no diagrama de ordenação. Houve resposta similar ($p > 0.05$) durante os horários de maior intensidade luminosa (14 e 15h) evidenciado por processos de dissipação de calor e ao *quenching* relativo a eventos de fotoinibição (Fig. 6C). A mudança na atividade de *quenching* com a presença de sombreamento por nuvens as 15'h em contraste com a intensidade luminosa das 16h ($p = 0.0005$, Fig. 6C). A máxima eficiência de processos fotoquímicos no FSII mostrou-se dependente de processos relativos ao *quenching* de fotoinibição e da dissipação de calor ($p = 0.0001$). Entretanto, correlações significativas entre q_p , $\Delta F/F_m'$ e ETR em contraste com ψ_{E0} confirmam fotoinibição dinâmica *via* conservação de energia e a ação de mecanismos de *quenching* fotoquímico ($p < 0.04$).

O *quenching* fotoquímico estima o percentual de centros de reação abertos e a proporção de energia dos fótons capturadas por estes centros (Magnusson 1997, Juneal *et al.* 2005, Ralph e Gademann 2005). Assim, quando todos os centros de reação estão abertos, $q_p = 1$ e quando todos os centros estão fechados, $q_p = 0$ (Schreiber *et al.* 1986), refletindo o grau de fechamento de centros de reação e de oxidação e redução de Q_A . A conservação de energia consiste na probabilidade de um elétron capturado mover-se para além de Q_A reduzida e, portanto, não está associado a dissipação na forma de calor.

S. angustifolium apresentou unidades amostrais mais próximas às variáveis de vitalidade e do componente para desempenho fotoquímico da fase termal durante 60% do tempo de monitoramento (Fig. 6D). Os 4 grupos nítidos obtidos e a trajetória das unidades amostrais (Fig. 6D) sustentam que incrementos no tamanho funcional do complexo antena esteve associado com mecanismos responsáveis pela conservação de energia fotoquímica e a vitalidade devido as correlações significativas para ABS/RC e M_0 em

contraste com PI ABS e ψ_{E0} ($p = 0.0001$). O efeito da ausência de sombreamento no comportamento da atividade fotoquímica de *S. angustifolium* (Fig. 6D) alterou os mecanismos de resposta para um acúmulo de Q_A reduzida as 15h, entretanto, não há evidência para estresse em função da ação correlacionada de mecanismos de ABS/RC e PI ABS ($p = 0.0001$) no comportamento do transiente OJIP (Fig. 5D).

O tamanho efetivo da antena, ABS/RC, é função do número total de fótons absorvidos por molécula de clorofila de todos os centros de reação dividido pelo número total de centros de reação ativos (Mehta *et al.* 2010). Neste contexto, valores de ABS/RC podem ser influenciados pela razão de centros de reação ativos e inativos. Assim, a variável ABS/RC pode representar (1) centros de reação inativos transformados em Q_A não redutores de FSII, quando o comportamento de ABS/RC está em associação com a captura de elétrons; ou (2) o tamanho funcional da antena quando existe um comportamento correlacionando o rendimento quântico fotoquímico e ABS/RC (Yusuf *et al.* 2010). Neste cenário, um maior contingente de pigmentos (clorofilas e carotenóides) pode ter sido recrutado, aumentando, assim, o tamanho funcional da antena (Strasser *et al.* 2004, Yusuf *et al.* 2010).

2.5 Considerações finais:

Espécies graminóides de mesmo tipo funcional apresentaram atividades fotoquímicas similares dentro dos tipos funcionais, porém divergiram nas estratégias de conservação e partição de energia entre fotossistemas. O tipo funcional de captura de recursos mostrou maior perturbação na emissão de fluorescência basal e maior *pool* de transportadores de elétrons fotossintetizantes, dependência de mecanismos do *quenching* não fotoquímico como via de relaxamento das unidades fotossintéticas e fotoinibição dinâmica. Entretanto, o tipo funcional de conservação de recursos mostrou maior estabilidade em emissão de fluorescência basal e menor *pool* de transportadores de elétrons associado a mecanismos de *quenching* fotoquímico e tamanho efetivo da antena do complexo coletor de luz.

Os resultados encontrados corroboraram a abordagem de tipologia funcional construída a partir de teor de matéria seca e área foliar específica. Por tanto, as diferentes estratégias de conservação de energia entre fotossistemas e os mecanismos de *quenching* sugerem um estado funcional transitório dentro das classificações de captura ou conservação de recursos.

2.6 Referências bibliográficas

Andrade B.O., Koch C., Boldrini I.L., Martin-Vélez E., Hasenack H., Hermann J-M., Kollmann J., Pillar V.D., Overbeck G.E.: Grassland degradation and restoration: a conceptual framework of stages and thresholds illustrated by southern Brazilian grasslands. – *Nat. Conserve.* **13** (2): 95-104, 2015.

Araújo A.Á.: O Gramado: Disclimax da vegetação campestre. Porto Alegre, RS. 1948.

Araújo S.A.C., Demicinis, B.B. Foinibição da Fotossíntese. – *R. Bras. Bio.* **7**: 463-472, 2009.

Baker N.R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. – *Annual Review Plant Biol.* **59**: 89-113, 2008.

Ballaré C.L.: Illuminated behavior: phytochrome as a key regulator of light foraging and plant anti-herbivore defence. – *Plant Cell Environ.* **32**: 713-715, 2009.

Boldrini I.L., Eggers L.: Vegetação campestre do sul do Brasil: resposta e dinâmica de espécies à exclusão. – *Acta Bot. Bras.* **10**: 37-50, 1996.

Box E.O.: Plant functional types and climate at the global scale. – *J. Veg. Sci.* **7**: 309-320, 1996.

Cruz P., Quadros F.L.F., Theau J.P. *et al.*: Leaf Traits as Functional Descriptors of the Intensity of Continuous Grazing in Native Grasslands in the South of Brazil. – *Rangeland Ecol. Manag.* **63**: 350-338, 2010.

Demmig-Adams B., Adams III.W., Ebbert V., Logan B.A.: Ecophysiology of the xanthophyll cycle. – In: Frank H.A., Young A.J., Britton G., Cogdell R.J. (ed.): *The Photochemistry of Carotenoids*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, Pp. 245–269, 1999.

Dias D.P., Marengo R.A.: Photoinhibition of photosynthesis in *Mimosa guianensis* and *Swietenia macrophylla* inferred by monitoring the initial fluorescence. – *Photosynthetica* **44**: 235-240, 2006.

Focht T., Pillar V.D.: Spatial patterns and relations with site factors in a campos grassland under grazing. – *Braz. J. Biol.* **63**: 423-436, 2003.

Force L., Critchley C., van Rensen J.J.S.: New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. – *Photosynth. Res.* **78**: 17-33, 2003.

Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. The relationship between the quantum yield of the photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. – *Biochim. Biophys. Acta.* **990**: 87-92, 1989.

Gonçalves J.F.C., Silva C.E., Guimarães D.G., Bernardes, R.J. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila *a* de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. *Acta Bot. Bras.* **40**: 89-98, 2010.

Jiang H.X., Chen L.S., Zheng J.G. *et al.*: Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in *Citrus* leaves assessed by the chlorophyll *a* fluorescence transient. – *Tree Physiol.* **28**: 1863-1871, 2008.

Joliot P., Joliot A.: Cyclic electron transfer in plant leaf. – *Plant Biol.* **99**: 10209-10214, 2002.

Juneau P., Green B.R., Harrison P.J.: Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. – *Photosynthetica* **43**: 75–83, 2005.

Klughammer C., Schreiber U.: Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. – *PAM Application Notes* **1**: 27-35, 2008.

Krause G.H., Jahns P.: Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. – In: Papageorgiou G, Govindjee (ed.): *Chlorophyll a* fluorescence: a signature of photosynthesis. Springer, Dordrecht, Pp. 463-495, 2004.

Krause G.H., Weis E.: Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. – *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* **42**, 313-349, 1991.

Lavorel S., Garnier E.: Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. – *Func. Ecol.* **16**: 545-556, 2002.

Lavorel S., McIntyre S., Landsberg J., Forbes T.D.: Plant functional classifications: from general groups to specific groups based on response to disturbance. – *Trends Ecol. Evol.* **12**: 474-478, 1997.

Lazár D. Chlorophyll *a* fluorescence induction. – *Biochim. Biophys. Acta* **1412**: 1-28, 1999.

Magnusson G.: Diurnal measurements of Fv/Fm used to improve productivity estimates in microalgae. – *Mar Biol.* **130**: 203–208. 1997.

Mccintyre S., Heard K.M., Martin T.G.: The relative importance of cattle grazing in subtropical grasslands: does it reduce or enhance plant biodiversity? – *J. Appl. Ecol.* **40**: 445-457, 2003.

Mehta P., Jajoo A., Mathur S., Bharti S.: Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. – *Plant Physiol. Bioch.* **48**:16-20, 2010.

Moreno J.A.: Clima do Rio Grande do Sul. – Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Pp.38, 1961.

Mueller-Dombois D., Ellenberg H.: Aims and methods of vegetation ecology. – New York: Wiley, Pp. 547, 1974.

Murchie E. H., Lawson T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. J Exp. Bot. 2013.

Nabinger C., Ferreira E.T., Freitas P.C.F.C., Sant'anna, D.M. Produção animal com base no campo nativo: aplicações de resultados de pesquisa. In: Pillar V.P., Müller S.C., Castilhos Z.M.S., Jacques A.V.A. Editores. Campos sulinos: Conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília: MMA, 175-198, 2009.

Nobel P.S. Physicochemical and Environmental Plant Physiology. New York: Academic Press. 1991.

Oukarroum A., Madidi S.E.L., Schansker G., Strasser R.J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. – Env. Exp. Bot. **60**: 438-446, 2007.

Overbeck G.O., Müller S.C., Fidelis A., Pfadenhauer J., Pillar V.D., Blanco C.C., Boldrini I.L., Both R., Forneck E.D.: Brazil's neglected biome: The South Brazilian *Campos*. – Perspec. Plant Ecol. Syst. **9**: 101-116, 2007.

Oxborough K., Baker N.R.: Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components - calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo'. – *Photosynth. Res.* **54**: 135-142, 1997.

Padilla F.M., Pugnaire F.I.: The role of nurse plants in the restoration of degraded environments. – *Front. Ecol. Environ.* **4** (4): 196-202, 2006.

Pillar V.D., Orloci, L.: Character-based community analysis: The Theory and an application program. – Haia, Holanda: SPB Academic Publishing. 1993.

Pillar V.D., Quadros F.L.F.: Grasslands-forest boundaries in southern Brazil. – *Coenoses* **12**: 119-126, 1997.

Pillar V.D.: How sharp are classifications? – *Ecology* **80**: 2508-2516, 1999.

Pillar V.D.: MULTIV: Multivariate exploratory analysis, randomization testing and bootstrap resampling. – Departamento de Ecologia, UFRGS. Porto Alegre, 2004.

Quadros F.L.F., Trindade J.P.P., Borba M.F. S.: A abordagem funcional da ecologia campestre como instrumento de pesquisa e apropriação do conhecimento pelos produtores rurais. – In: Pillar V.P., Müller S.C., Castilhos Z.M.S., Jacques A.V.A. (ed.): *Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Pp. 206-213, 2009.

Ralph P.J., Gademann R.: Rapid light curves: a powerful tool for the assessment of photosynthetic activity. – *Aquat Bot.* **82**: 222–237, 2005.

Ralph P.J., Polk S., Moore K.A., Orth R.J., Smith W.A.: Operation of the xanthophyll cycle in the seagrass *Zostera marina* in response to variable light. – *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **271**: 189-207, 2002.

Rambo B. A Serra do Sudeste: A vegetação da Serra do Sudeste. In: Rambo, B. A Fisionomia do Rio Grande do Sul. – Unissinos. Ed. Porto Alegre. 2005.

Redillas M.C.F.R., Strasser R.J., Jeong J.S., Kim Y.S., Kim J.K.: The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing OsNAC10. – *Plant Biotech Report*: **5**:169-175. 2011.

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

Saint-Hillaire A.F.C.: O Brasil visto por estrangeiros: Viagem ao Rio Grande do Sul. – Senado Federal. Brasília: Pp 321, 2002.

Schreiber U, Bilger W, Schliwa U. Continuous recording of photochemical and non-photochemical quenching with a new type of modulation fluorometer. – *Photosynth Res.* **10**: 51-62, 1986.

Semchenko M., Lepik M., Götzenberger L., Zobel K.: Positive effect of shade on plant growth: amelioration of stress or active regulation of growth rate? – *J. Ecol.* **100**: 459-466, 2012.

Soares A.B.: Efeito da alteração da oferta de matéria seca de uma pastagem natural sobre a produção animal e a dinâmica da vegetação. 2002. 189 f. Tese (Doutorado) – Curso de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

Sosisnki E.E., Pillar V.D.: Respostas de tipos funcionais de plantas à intensidade de pastejo em vegetação campestre. – *Pesq. Agropec. Bras.* **39** (1): 1-9, 2004.

Stibert A., Govindjee: On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. – *J. Photoch. Photobio. B* **104**: 236-257, 2011.

Stibert, A., Govindjee: Chlorophyll *a* fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. – *Photosynth. Res.* **113**: 15-61, 2012.

Strasser B.J., Strasser, R.J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. – In: Mathis, P. (ed.): *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, p. 977-980, 1995.

Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M.: Analysis of fluorescence transient. – In: Papageogiou G., Govindjee (ed.): *Chlorophyll Fluorescence: a Signature of*

Photosynthesis, *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Pp. 321-362. Springer, Dordrecht, 2004.

Strasser R.J.: Donor side capacity of photosystem II probed by Polifasic chlorophyll *a* fluorescence transients. – *Photosynth. Res.* **52**: 147-155, 1997.

Stringham T.K., Krueger W.C., Shaver P.L.: State and transition modeling: An ecological process approach. – *J. Range Manage.* **56**: 106-113, 2003.

Suttie J.M., Reynolds S.G., Batello C.: *Grasslands of the world*. Rome: FAO – Food and Agriculture of the United Nations. Pp. 514, 2005.

Tsimilli-Michael M., Strasser, R.J. In vivo assessment of plants' vitality: applications in detecting and evaluating the impact of Mycorrhization on host plants, In: A. Varma (ed.), *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*, 3rd edition, Springer, Dordrecht, 679-703, 2008.

Weiher E., Werf A., Thompson K., *et al.*: Challenging Theophrastus: A common core list of plant traits for functional ecology. – *J. Veg. Sci.* **10**: 609-620, 1999.

Welker C.A.D., Longhi-Wagner H.M. A família Poaceae no Morro Santana, Rio Grande do Sul, Brasil. – *R. Bras. Biociências.* **5**: 53-92, 2007.

Yusuf M.A., Kumar D., Rajwanshi R., *et al.*: Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. – *Biochim. Biophys. Acta* **1797**: 1428-1438, 2010.

Capítulo 2

3.1 *Quenching* da fluorescência da clorofila *a* revela plasticidade de atividade fotoquímica em *Axonopus affinis* Chase (Poaceae)

3.2 Introdução:

A vegetação campestre constitui um dos maiores biomas do mundo e pode ser definida com uma cobertura vegetal na qual há predominância de vegetação herbácea com ou sem cobertura arbustiva arbórea (Suttie *et al.* 2005). Nos campos da região sul do Brasil, o pastejo é um dos fatores responsáveis pela persistência de mosaicos de vegetação campestre e florestal, de forma muito pronunciada na Serra do Sudeste (Pillar e Quadros 1997, Focht e Pillar 2003, Overbeck *et al.* 2007).

A complexidade da vegetação campestre nestes ecossistemas pode ser explicada a partir de uma abordagem de tipologia funcional, juntando espécies diferentes em grupos relacionados a estratégias de captura ou conservação de recursos (Quadros *et al.* 2009, Cruz *et al.* 2010). Nesta abordagem, espécies de plantas podem ser unidas em grupos que têm como características fisiológicas principais a rápida ciclagem de nutrientes e alocação de carbono na parte aérea. Assim, os grupos formados podem relacionar os aspectos adaptativos das plantas aos processos dominantes no ecossistema (Pillar e Orlóci 1993, Box 1996, Lavorel *et al.* 1997, Weiher *et al.* 1999, Lavorel e Garnier 2002).

Axonopus affinis Chase, grama tapete, é uma espécie de gramínea estolonífera e prostrada de pré foliação conduplicada que ocorre em campos úmidos (Welker e Longhi-Wagner 2007). A grama tapete é classificada como planta de captura de recursos, apresentando facilidade de alastramento, alta tolerância a desfolha e ao pisoteio, e resiliência ao fogo (Overbeck *et al.* 2007, Quadros *et al.* 2009, Machado *et al.* 2013). Por tanto, dominante em campos do sul do Brasil manejados com baixa oferta de forragem e sujeito a remoção natural de biomassa (Sosinski e Pillar 2004, Andrade *et al.* 2015).

O fator luz é um recurso natural essencial para as plantas (Murchie *et al.* 2005). Em seu ambiente natural, as plantas são expostas a diferentes regimes de intensidades de luz que variam consideravelmente ao longo de um dia, o qual exigem um alto grau de plasticidade das plantas (Dias e Marengo 2006). A fluorescência da clorofila *a* pode ser uma medida da eficiência fotoquímica e prover informações estruturais e funcionais dos centros de reação do fotossistema II (FSII) em resposta as interações com o meio abiótico (Strasser *et al.* 2004).

O objetivo deste estudo foi identificar os mecanismos da atividade fotoquímica de *Axonopus affinis* (Poaceae) que sustentam a hipótese de que a rápida ciclagem de nutrientes intrínseca de plantas de captura de recursos é precedida por plasticidade fisiológica no uso da energia luminosa.

3.3 Materiais e métodos:

O estudo foi conduzido em vegetação campestre de uma área experimental da Embrapa Pecuária Sul, Bagé/RS (primavera 2014). Amostras foram coletadas em distintos momentos do dia com intensidades de luz denominados de: 1 - alta densidade de fluxo de fótons fotossintetizantes (*high photosynthetic photon flux density* - HI); e 2 - baixa intensidade de fluxo de fótons fotossintetizantes (*low photosynthetic photon flux density* - LI). O clima da área experimental é classificado como *Marine – Mild Winter* [Cfb (Köppen)] (Moreno 1961). As temperaturas apresentam variação sazonal com média de temperatura máxima de 20–24°C, média de temperatura mínima de 12–16°C e média de precipitação mensal de 118.7mm.

A amostragem preferencial (Mueller-Dombois and Ellenberg 1974) foi precedida por reconhecimento visual da composição e estrutura da vegetação. Desta forma, áreas homogêneas com 90% de dominância de *Axonopus affinis* Chase foram escolhidas. Neste estudo foram utilizadas 60 unidades amostrais (folhas jovens, não danificadas e totalmente expandidas).

Para acessar mudanças nos transientes da emissão de fluorescência de clorofila *a* (cinética OJIP) as unidades amostrais foram acondicionadas ao escuro por 30 minutos (Fluorômetro *OS-30p* (*Opti-Sciences* Hudson, NH, USA)). As medidas foram feitas durante o início da manhã (controle) até as 16:00 h, respeitando o intervalo de duas horas entre cada nova medida. Os dados foram plotados em escala logarítmica partindo de um ponto basal de emissão de fluorescência (O) até um nível máximo desta emissão (P), destacando inflexões intermediárias destes pontos (pontos J e I da curva OJIP). Após esta plotagem, os dados da curva OJIP foram duplamente normalizados entre O-J e J-P e, apresentados como cinética

relativa variável de fluorescência no tempo t conforme segue: $V_t = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$ representado por $W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$ e $W_{JP} = (F_t - F_J)/(F_m - F_J)$ plotado como diferença da cinética relativa variável ($V_{t_{OJIP\ HI}} - V_{t_{OJIP\ LI}}$) (Strasser 2004, Strasser *et al.* 2007, Smith *et al.* 2009).

Para monitorar as variáveis F_0 , F_m , F_0/F_m , F_v/F_0 e F_v/F_m (Roháček 2002) foram utilizadas unidades amostrais acondicionadas ao escuro por 30 minutos. Para determinar F_0' , F_m' e F_v'/F_m' foram utilizadas unidades amostrais acondicionadas a luz ambiente. A variável F_0' como $F_0' = F_0 / [(F_v/F_m) + F_0/F_m']$ foi calculada de acordo com Oxborough e Baker (1997). Em seguida, foram calculados valores para as variáveis $\Delta F/F_m'$, q_p , q_n , YNO, YNPQ, NPQ e ETR (Schreiber *et al.* 1986, Genty *et al.* 1989, Klughammer e Schreiber 2008). A densidade de fluxo de fótons fotossintetizantes sob condições ambientais (*photosynthetic photon flux density* - PPF) foi determinada a partir de um sensor quântico de luz LI-190R (*Li-COR*, Lincoln, NE, USA).

O método de ordenação multivariada foi utilizado para identificar padrões de variação na atividade fotoquímica entre HI e LI para *Axonopus affinis* Chase. Foi feita transformação vetorial dos dados dentro de variáveis, optando pela padronização pela amplitude. As variáveis de atividade fotoquímica foram submetidas a análise de coordenadas principais, utilizando a distância Euclidiana como uma medida de dissimilaridade entre unidades amostrais. O método de auto amostragem *bootstrap* foi utilizado para testar a estabilidade dos eixos de ordenação ($\alpha = 0.1$) (Pillar 1999). Objetivando detectar padrões de resposta aos ambientes de luz e para testar a significância das correlações das variáveis fotoquímicas, as unidades amostrais foram submetidas a análise de variância multivariada *via* testes de aleatorização com 10.000 permutações, utilizando a distância Euclidiana como medida de

dissimilaridade ($\alpha = 0.05$). As análises foram feitas com auxílio do aplicativo computacional MULTIV (Pillar 2004).

3.4 Resultados e discussão:

O transiente OJIP de *A. affinis* mostra um típico crescimento polifásico, descrito inicialmente como o efeito Kautsky (Stirbet e Govindjee 2011). Iniciando de um ponto basal O (mínima fluorescência) até um ponto máximo P (máxima fluorescência) (Fig. 7AB). O ambiente HI mostrou um decréscimo no ponto P e uma redução na área acima da curva de fluorescência de forma mais pronunciada do que as curvas do ambiente LI (Fig. 7A). A diferença da cinética relativa variável no tempo t não mostrou desvios hiperbólicos positivos nas bandas I e K (Fig. 7C).

A forma dos transientes OJIP mostram que as unidades amostrais estavam fotossinteticamente ativas (Yusuf *et al* 2010). A área acima da curva de fluorescência entre O e P (area) representa o tamanho do *pool* de transportadores de elétrons do FSII, os quais incluem Q_A e Q_B (Joliot e Joliot 2002). Reduções na area ocorrem quando o transporte de elétrons do centro de reação para o *pool* de quinonas é bloqueado parcial ou totalmente (Mehta *et al.* 2010). Assim, foi considerado que os transientes OJIP representam diferentes comportamentos das unidades amostrais devido as respostas de aclimação a ambos ambientes de luz (HI e LI).

É esperado que em graminóides com maior área foliar específica (*specific leaf area* - SLA) que permitem a rápida ciclagem de nutrientes e de componentes foliares estruturais em resposta ao pastejo (Quadros *et al.* 2009, Cruz *et al.* 2010, Gong *et al.* 2014) mostrem, também, capacidade de aclimação em comunidade vegetal em HI (Gloser e Gloser 1996). Esta hipótese é parcialmente confirmada pela estabilidade da diferença da cinética relativa variável (Fig. 7C).

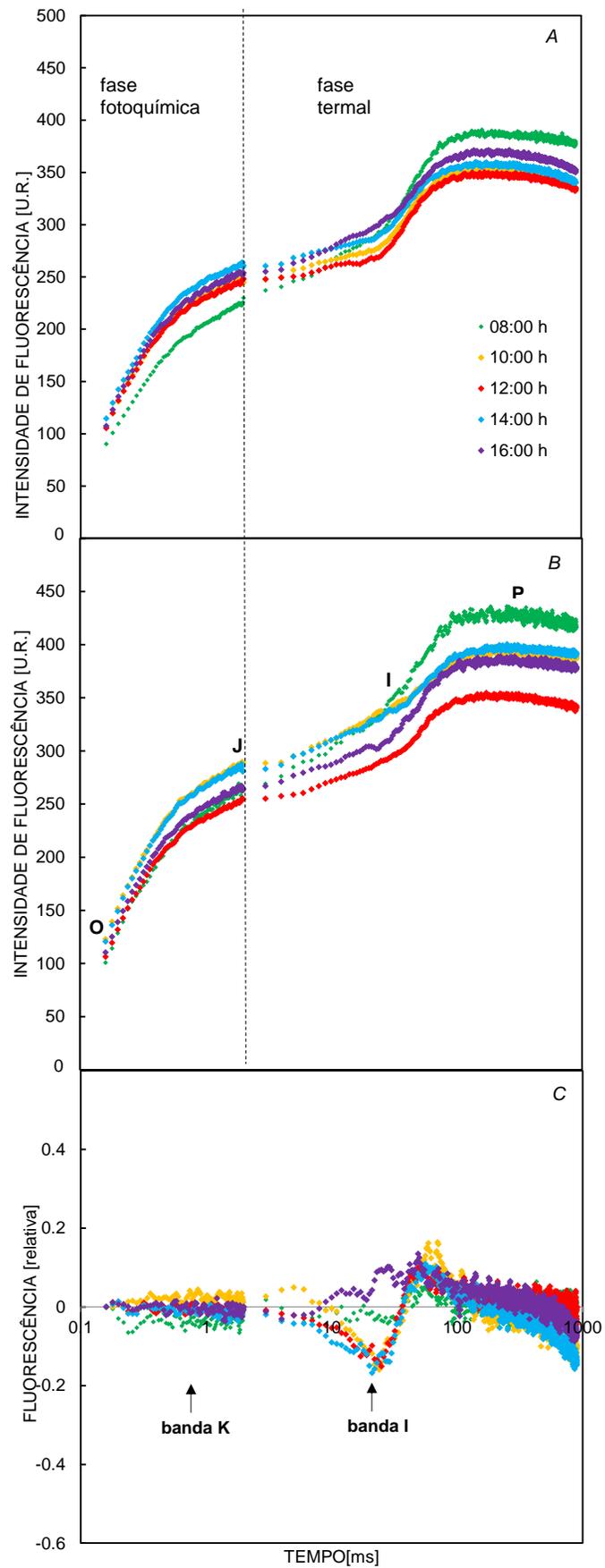


Fig. 7: Mudanças na emissão dos transientes da fluorescência da clorofila *a* (cinética OJIP) em *Axonopus affinis* (Chase) Poaceae de campo natural. Fig. 1A: HI – momento de alta densidade de fluxo de fótons fotossintetizantes (*high photosynthetic photon flux density*). Fig. 1B: LI – momento de baixa densidade de fluxo de fótons fotossintetizantes (*low photosynthetic photon flux density*). Fig. 1C: Fluorescência relativa variável no tempo t : $V_t = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$ representado por $W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$ e $W_{JP} = (F_t - F_J)/(F_m - F_J)$ plotado como diferença cinética ($V_{t_{OJIP\ HI}} - V_{t_{OJIP\ LI}}$).

Neste estudo, foi observado que em HI, decréscimos na habilidade do FSII para reduzir Q_A como uma proporção do total de centros de reação que poderiam ser fechados foi acompanhado por um incremento no ponto J (fase fotoquímica, O–J) da curva OJIP (Force *et al.* 2003). Entretanto, nenhuma evidência para a perda da capacidade de reoxidação de Q_A em *A. affinis* em HI foi observada a partir das análises da diferença da cinética relativa variável (banda J, dados desta curva não foram mostrados). A amplitude hiperbólica em ΔJ é utilizada como indicativo de inibição bioquímica do estado redox de Q_A devido a uma alta atividade de centros Q_A não redutores (Christen *et al.* 2007, Mehta *et al.* 2010). Na mesma análise, a partir da diferença da cinética relativa variável foi possível identificar ausência de desequilíbrio entre o lado doador e receptor de elétrons do FSII (Strasser 1997) em torno de 300 μs (banda K) (Fig. 7C).

Entretanto, incrementos no montante de centros Q_B redutores foram observados pelo desvio negativo da banda I (Fig. 7C). É fato que centros Q_B redutores representam uma subpopulação de FSII localizados na região não empilhada da membrana dos tilacóides (Kraus e Weis 1991). Assim, HI desencadeia um estado de transição do FSII partindo da região empilhada para a não empilhada *via* fosforilação do complexo coletor de luz (*light harvesting complex* – LCH). Portanto, o desvio negativo na banda I é um indicativo de que os centros Q_B não redutores estão atuando como dissipadores de calor na fase termal da curva OJIP (JIP rise) (Setilik *et al.* 1990, Stirbet e Govindjee 2012). Centros não redutores são eficientes

armadilhas de éxitons, dissipando toda energia de excitação na forma de calor, prevenindo danos as subunidades do FSII e protegendo outros centros de reação vizinhos (Strasser *et al.* 2004). É criada, então, uma reserva de *pool* de quinonas para o *turnover* e reparo de proteínas D1 de centros de reação danificados pelo excedente de energia recebido (Kraus e Weis 1991).

Diagramas de mesma ordenação mostram diferentes padrões de atividade fotoquímica de *A. affinis* entre os ambientes HI e LI (Fig. 8) ($p = 0.0001$). O eixo I explica 58.48% e o eixo II 23.48%, o que representa 81.96% da variação total dos dados.

No início da manhã em HI 8:00 h [$251.833 \pm 1.12 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$] (Fig. 5A) e em LI [$224.8 \pm 11.25 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$] (Fig. 8B) foi encontrado um comportamento similar para variáveis ligadas aos processos de *quenching* fotoquímico. Durante as 10:00h em HI [$550 \pm 0.84 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$] (Fig. 8A) e LI [$266.85 \pm 1.34 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$] (Fig. 8B), mudanças na emissão de fluorescência mínima (F_0 e F_0') foram indicativos de ajustamento da maquinaria fotoquímica em *A. affinis* para processos não fotoquímicos não regulados que implicam em perda de energia pelo FSII (YNO e F_0/F_m – variáveis de estresse fisiológico).

Variáveis associadas a processos de *quenching* não fotoquímico melhor definem a resposta fisiológica de *A. affinis* entre 12:00 h [$706.6 \pm 4.75 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$] e 14:00 h [$774.4 \pm 2.57 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$] em HI (Fig. 8A). Houve um comportamento diferente de unidades amostrais as 16:00 h em HI [$420.12 \pm 15.55 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$], em contraste com o grupo de unidades amostrais formado por 12:00 h e 14:00 h ($p < 0.05$), sugerindo uma tendência para um retorno para as condições iniciais de monitoramento. Em contraste com HI (Fig. 8A), em LI (Fig. 8B) o padrão de atividade fotoquímica após o ajustamento do

maquinário fotoquímica as 10:00 h, foi mais eficiente em converter a energia luminosa em processos do *quenching* fotoquímico.

Neste estudo, correlações significativas ($p = 0.0001$) mostraram que variáveis de rendimento foram mais dependentes de mudanças em F_0 do que em F_m , com a conservação da energia incidente no FSII que foi convertida em energia química em ambos os ambientes. Variáveis de rendimento são consideradas indicadores de dano fotoinibitório do complexo FSII, alterando o formato do transiente OJIP, causado tanto por decréscimos em F_m ou por incrementos em F_0 (Krause e Weis 1991, Strasser *et al.* 2004). Entretanto, fotoinibição é melhor definida a partir do incremento na dissipação de energia na forma de calor e decréscimo na conservação de energia incidente no FSII que poderia ser convertida em energia química (Force *et al.* 2003, Jiang *et al.* 2008). A fração de energia remanescente (YLOOS) foi dividida em dois distintos componentes: YNO e YNPQ, provendo importante informação sobre a performance de *A. affinis* em condições de HI (Fig. 8A) e o respectivo decremento em F_m da curva OJIP (Fig. 7A). A correlação significativa entre máxima eficiência de processos fotoquímicos no FSII (F_v/F_0), a variável de rendimento mais sensível, e YNO ($p < 0.05$) as 10:00 h mostram que a fração de energia dissipada representa perdas constitutivas, as quais refletem inabilidade da espécie vegetal em proteger-se frente aos danos de excesso de luz devido ao fechamento de centros de reação do FSII. Porém, a correlação significativa, entre as variáveis de rendimento e YNPQ ($p < 0.001$) durante 12:00 h e 14:00 h foi indicativo de alta capacidade de proteção a partir de mecanismos regulatórios, que eventualmente podem prevenir fotodano (Klughammer e Schreiber 2008). Assim, ficou determinado que a fotoinibição dinâmica apresentada em *A. affinis* foi revertida através de mecanismos fotoprotetores, sugerindo compensação em YNPQ por decréscimos em YNO.

Fig. 8: Diagramas de mesma ordenação de 290 unidades amostrais, descritas pela atividade fotoquímica de *Axonopus affinis* Chase (Poaceae) em um momento de alta densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (*high photosynthetic photon flux density* - HI) e em momento de baixa densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (*low photosynthetic photon flux density* - LI). Os caracteres numéricos representam a hora da coleta dos dados (1 = 08:00h, 2 = 10:00h, 3 = 12:00h, 4 = 14:00h, 5 = 16:00h). F_0/F_m – *quenching* de fotoinibição; F_v/F_0 – máxima eficiência de processos fotoquímicos no FSII; q_N – coeficiente de *quenching* não fotoquímico; q_P – *quenching* fotoquímico; $Y(NO)$ – fração de energia passivamente dissipada na forma de calor, principalmente devido ao fechamento de centros de reação do FSII; $Y(NPQ)$ – fração de energia dissipada na forma de calor *via* mecanismos regulatórios de fotoproteção; $\Delta F/F_m'$ – eficiência fotoquímica do FSII. Posição original dos descritores somente é mostrada quando a correlação com pelo menos um dos eixos foi maior do que 0.65. Os eixos apresentados foram estáveis com 10.000 interações.

Correlações significativas entre variáveis de rendimento (similares ao comportamento observado para a taxa de transporte de elétrons) e NPQ ($p = 0.0001$) associadas a manutenção da eficiência quântica fotoquímica do FSII em HI (Fig. 8A), sugerem que a energia incidente no aparato fotossintético esteve acima do necessário para saturar o sistema de transportadores de elétrons, e portanto, esta energia excedente foi dissipada. Mudanças em NPQ refletem a atividade do ciclo das xantofilas, o qual protege o aparato fotossintético de danos causados por luz excessiva (Krause e Jahns 2004, Demming-Adams *et al.* 1999; Ralph *et al.* 2002).

LI (Fig. 8B) induziu mudanças no padrão de atividade fotoquímica em unidades amostrais após o ajustamento das 10:00 h, o qual foi ordenado mais próximo da eficiência fotoquímica do FSII, indicando maior rendimento quântico fotoquímico em LI. Incrementos em eficiência fotoquímica podem indicar ativação de enzimas envolvidas no metabolismo de carbono e na abertura estomática. Entretanto, rendimento quântico do FSII como uma medida de fotossíntese nunca deve ser utilizada para fazer comparações entre diferentes folhas em um estudo de campo (Maxwell e Johnson 2000).

3.5 Considerações finais:

A ausência de desvios negativos nas bandas K e I e o decremento no ponto P do transiente OJIP durante HI mostrou-se dependente de mecanismos de *quenching* não fotoquímico. Assim, a plasticidade da atividade fotoquímica ficou estabelecida em função da fotoinibição dinâmica revertida por ganhos compensatórios de YNPQ em detrimento de YNO.

3.6 Referências bibliográficas:

Andrade B.O., Koch C., Boldrini I.L., Martin-Vélez E., Hasenack H., Hermann J-M., Kollmann J., Pillar V.D., Overbeck G.E.: Grassland degradation and restoration: a conceptual framework of stages and thresholds illustrated by southern Brazilian grasslands. – Nat. Conserve. **13** (2): 95-104, 2015.

Box E.O.: Plant functional types and climate at the global scale. – J. Veg. Sci. **7**: 309-320, 1996.

Christen D., Schönmann S., Jermini M., Strasser R. J., Défago G. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. – Environ. Exp. Bot. **60**: 504-514, 2007.

Cruz P., Quadros F.L.F., Theau J.P. *et al.*: Leaf Traits as Functional Descriptors of the Intensity of Continuous Grazing in Native Grasslands in the South of Brazil. – Rangeland Ecol. Manag. **63**: 350-338, 2010.

Demmig-Adams B., Adams III.W., Ebbert V., Logan B.A.: Ecophysiology of the xanthophyll cycle. – In: Frank H.A., Young A.J., Britton G., Cogdell R.J. (ed.): The Photochemistry of Carotenoids. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, Pp. 245–269, 1999.

Dias D.P., Marengo R.A.: Photoinhibition of photosynthesis in *Minquartia guianensis* and *Swietenia macrophylla* inferred by monitoring the initial fluorescence. – *Photosynthetica* **44**: 235-240, 2006.

Focht T., Pillar V.D.: Spatial patterns and relations with site factors in a campos grassland under grazing. – *Braz. J. Biol.* **63**: 423-436, 2003.

Force L., Critchley C., van Rensen J.J.S.: New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. – *Photosynth. Res.* **78**: 17-33, 2003.

Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. The relationship between the quantum yield of the photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. – *Biochim. Biophys. Acta.* **990**: 87-92, 1989.

Glosser V., Glosser J.: Acclimation capability of *Calamagrostis epigejos* an *C. arundinaceae* to changes in radiation environments. – *Photosynthetica* **32**: 203-212, 1996.

Gong X.Y., Berone G.D., Agnusdei M.G. *et al.*: The allocation of assimilated carbon to shoot growth: in situ assessment in natural grasslands reveals nitrogen effects and interspecific differences. – *Oecologia* **174**: 1085-1095, 2014.

Jiang H.X., Chen L.S., Zheng J.G. *et al.*: Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in *Citrus* leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. – *Tree Physiol.* **28**: 1863-1871, 2008.

Joliot P., Joliot A.: Cyclic electron transfer in plant leaf. – *Plant Biol.* **99**: 10209-10214, 2002.

Klughammer C., Schreiber U.: Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. – *PAM Application Notes* **1**: 27-35, 2008.

Krause G.H., Jahns P.: Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. – In: Papageorgiou G, Govindjee (ed.): *Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer, Dordrecht, Pp. 463-495, 2004.

Krause G.H., Weis E.: Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. – *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* **42**, 313-349, 1991.

Lavorel S., Garnier E.: Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. – *Func. Ecol.* **16**: 545-556, 2002.

Lavorel S., McIntyre S., Landsberg J., Forbes T.D.: Plant functional classifications: from general groups to specific groups based on response to disturbance. – *Trends Ecol. Evol.* **12**: 474-478, 1997.

Machado J.M., Rocha M.G., Quadros, F.L.F., Confortin A.C.C., Santos A.B., Sichonany M.J.O, Ribeiro L.A., Rosa A.T.N.: Morphogenesis of native grasses of Pampa Biome under nitrogen fertilization. – R. Bras. Zootec. **42** (1): 22-29, 2013.

Maxwell K., Johson G.N.: Chlorophyll fluorescence – a practical guide. – J. Exp. Bot. **51**: 659-668, 2000.

Mehta P., Jajoo A., Mathur S., Bharti S.: Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of hight salt stress on Photosystem II in wheat leaves. – Plant Physiol. Bioch. **48**:16-20, 2010.

Moreno J.A.: Clima do Rio Grande do Sul. – Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Pp.38, 1961.

Mueller-Dombois D., Ellenberg H.: Aims and methods of vegetation ecology. – New York: Wiley, Pp. 547, 1974.

Murchie E. H., Lawson T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. J Exp. Bot. 2013.

Murchie E.H., Hubbart S., Peng S., Horton P.: Acclimation of photosynthesis to high irradiance in rice: gene expression and interactions with leaf development. – J. Exp. Bot. **56**: 449-460, 2005.

Overbeck G.O., Müller S.C., Fidelis A., Pfadenhauer J., Pillar V.D., Blanco C.C., Boldrini I.L., Both R., Forneck E.D.: Brazil's neglected biome: The South Brazilian *Campos*. – *Perspec. Plant Ecol. Syst.* **9**: 101-116, 2007.

Oxborough K., Baker N.R.: Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components -calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo'. – *Photosynth. Res.* **54**: 135-142, 1997.

Pillar V.D., Orloci, L.: Character-based community analysis: The Theory and an application program. – Haia, Holanda: SPB Academic Publishing. 1993.

Pillar V.D., Quadros F.L.F.: Grasslands-forest boundaries in southern Brazil. – *Coenoses* **12**: 119-126, 1997.

Pillar V.D.: How sharp are classifications? – *Ecology* **80**: 2508-2516, 1999.

Pillar V.D.: MULTIV: Multivariate exploratory analysis, randomization testing and bootstrap resampling. – Departamento de Ecologia, UFRGS. Porto Alegre, 2004.

Quadros F.L.F., Trindade J.P.P., Borba M.F. S.: A abordagem funcional da ecologia campestre como instrumento de pesquisa e apropriação do conhecimento pelos produtores rurais. – In: Pillar V.P., Müller S.C., Castilhos Z.M.S., Jacques A.V.A. (ed.): *Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Pp. 206-213, 2009.

Ralph P.J., Polk S., Moore K.A., Orth R.J., Smith W.A.: Operation of the xanthophyll cycle in the seagrass *Zostera marina* in response to variable light. – J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **271**: 189-207, 2002.

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

Schreiber U, Bilger W, Schliwa U. Continuous recording of photochemical and non-photochemical quenching with a new type of modulation fluorometer. – *Photosynth Res*. **10**: 51- 62, 1986.

Setlik I., Allakhveridiev S.L., Nedbal L., *et al.*: Three types of photosystem II photoinactivation: I. damaging process on the acceptor side. – *Photosynth. Res*. **64**: 552-563, 1990.

Smith M.F., Van Heerden P.D.R., Pienaar J.J. Weissflog L. Strasser R.J., Krüger G.H.J.: Effect of Trifluoroacetate, a Persistent Degradation Product of Fluorinated Hydrocarbons, on C3 and C4 Crop Plants. – *Plant Physiol. Bioch*. **47**: 2623-634, 2009.

Stibert A., Govindjee: On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. – *J. Photoch. Photobio. B* **104**: 236-257, 2011.

Stibert, A., Govindjee: Chlorophyll *a* fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. – *Photosynth. Res.* **113**: 15-61, 2012.

Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M.: Analysis of fluorescence transient. – In: Papageogiou G., Govindjee (ed.): *Chlorophyll Fluorescence: a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration*. Pp. 321-362. Springer, Dordrecht, 2004.

Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Dangre D., Rai M.: Biophysical phenomics reveals functional building blocks of plants systems biology: a case study for the evaluation of the impact of Mycorrhization with *Piriformospora indica*. In: Varma A., Oelmüller R.: (ed.): *Advanced Techniques in Soil Microbiology, Soil Biology*. Heidelberg, Berlin, Pp. 319-341, 2007.

Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Qiang S., Goltsev V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. – *Biochim. Biophys. Acta* **1797**: 1313–1326, 2010.

Strasser R.J.: Donor side capacity of photosystem II probed by Polifasic chlorophyll *a* fluorescence transients. – *Photosynth. Res.* **52**: 147-155, 1997.

Suttie J.M., Reynolds S.G., Batello C.: *Grasslands of the world*. Rome: FAO – Food and Agriculture of the United Nations. Pp. 514, 2005.

Weiher E., Werf A., Thompson K., *et al.*: Challenging Theophrastus: A common core list of plant traits for functional ecology. – J. Veg. Sci. **10**: 609-620, 1999.

Welker C.A.D., Longhi-Wagner H.M. A família Poaceae no Morro Santana, Rio Grande do Sul, Brasil. – R. Bras. Biociências. **5**: 53-92, 2007.

Yusuf M.A., Kumar D., Rajwanshi R., *et al.*: Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. – Biochim. Biophys. Acta **1797**: 1428-1438, 2010.

4. Conclusão Geral

Os resultados encontrados corroboraram a abordagem de tipológica funcional construída a partir do teor de matéria seca e área foliar específica em estudos de ecossistemas campestres de contemporânea dupla estrutura.

A similaridade para respostas na atividade fotoquímica de espécies graminóides de mesmo tipo funcional encontrada mostrou que emissões de fluorescência basal e maior *pool* de transportadores de elétrons fotossintetizantes, dependência de mecanismos do *quenching* não fotoquímico e fotoinibição dinâmica foram características do tipo funcional de captura de recursos. Entretanto, o tipo funcional de conservação de recursos mostrou maior estabilidade em emissão de fluorescência basal e menor *pool* de transportadores de elétrons associado a mecanismos de *quenching* fotoquímico e tamanho efetivo da antena do complexo coletor de luz.

O padrão estável de atividade fotoquímica observado em *A. affinis* foi direcionado por mecanismos de *quenching* da emissão de fluorescência de clorofila *a* e pelo comportamento do transiente OJIP, os quais revelaram plasticidade fisiológica a partir de mudanças reversíveis na estrutura e função de cloroplastos.