Ivan Salles Santos

Coordenação temporal da relação fonte dreno
em plântulas de jatobá (*Hymenaea courbaril*
L.)

Temporal coordination of the source sink
relationship in jatobá seedlings (*Hymenaea*
courbaril L.)

São Paulo

2011

Ivan Salles Santos

Coordenação temporal da relação fonte dreno
em plântulas de jatobá (*Hymenaea courbaril*
L.)

Temporal coordination of the source sink
relationship in jatobá seedlings (*Hymenaea*
courbaril L.)

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Botânica, na Área de
Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Marcos Silveira
Buckeridge

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Santos, Ivan

Coordenação temporal da relação
fonte dreno em plântulas de jatobá
(*Hymenaea courbaril* L.)

114 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Botânica.

1. Cronobiologia 2. fotossíntese 3.
Mobilização de reservas

I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Tradução: biomedicinapadrao.com

Bill Watterson

Agradecimentos

Antes de todos, gostaria de agradecer meus pais, com toda certeza foram as pessoas mais importantes neste projeto, sempre me ajudando e estimulando a continuar. Gostaria de agradecer meu orientador por aceitar o desafio de trabalhar em uma nova área da fisiologia. Um agradecimento especial para o Dr. Mauro Marabesi, sem sua ajuda, ensinamentos e discussões, este projeto não teria saído do papel. A grande amizade que desenvolvemos nestes anos ajudou a superar as fases mais difíceis, e foi fundamental para manter a auto-estima e o bom humor.

Quero agradecer também Leonardo Hamachi, que esteve presente durante todo o processo, ajudando nas coletas, discussões e idéias, companheiro de incontáveis cafés e risadas. Não poderia me esquecer do grande apoio dado por Mari Ionashiro, tanto pessoal como profissional.

Um abraço especial para Dr. Adriana Yepes, que sempre me estimulou e ajudou com longas discussões. Gostaria ainda de lembrar de Thalita Carrara, que me ajudou muito com protocolos, dicas e por vezes lado a lado na bancada.

Nunca me esquecerei de Eveline Tavares, que me ajudou em um momento muito delicado deste projeto, sem esperar nada em troca, parou por meses seu próprio doutorado para me ajudar a terminar os experimentos. Uma pessoa verdadeira e uma amiga inesperada.

Muitas pessoas realmente especiais passaram por diversos desafios comigo, dentre elas devo ainda ressaltar Patricia Tachinardi, que me ajudou com muitas discussões sobre cronobiologia e é uma amiga que estará no meu coração pelo resto da vida. A Danilo Flôres e Barbara Tomotani agradeço a paciência e as discussões. Agradeço a Aline

Matsumura pelas diversas vezes que me manteve acordado e mais importante de tudo, alimentado!

Agradeço a Fernada de Almeida Santos simplesmente por existir e me aturar to esse tempo. Mais que uma grande amiga, minha irmã mais nova e companheira de mil problemas, você não vai se ver livre de mim tão cedo.

Agradeço ainda o Instituto Florestal do Estado de São Paulo por fornecer as sementes e a FAPESP pela bolsa concedida.

Índice

I - Introdução	9
1. Jatobá e as reservas	9
2. Enzimas hidrolíticas	10
3. Mobilização de Reservas de Parede Celular no Jatobá	13
4. Fotossíntese: Uma rápida visão histórica	16
5. Fotossíntese: Cloroplasto e sua conformação	18
6. Fase fotoquímica	18
7. Fase das reações de carboxilação	23
8. Fluorescência	24
9. A formação da cronobiologia: uma visão histórica	27
10. Circarritmos	29
11. Osciladores e acoplamento	31
12. Relação entre osciladores	32
13. Vendo o mundo em vermelho e azul: sinais ambientais	35
14. Eferências: fisiologia controlada pelo relógio	37
15. Múltiplos osciladores: vantagens adaptativas da marcação temporal	38
16. Integrando a mobilização de reservas ao relógio de planta	39
II - Objetivos	40
III - Materiais e Métodos	41
1. Material Vegetal	41
2. Fotossíntese, Fluorescência e Condutância Estomática	41
3. Concentração de Clorofila	46
4. Determinação de Açúcares Solúveis	47
5. Avaliação da Atividade Enzimática	48
IV – Resultados	50
1. Cadeia de transporte de elétrons e assimilação de carbono	50
2. Concentração de clorofila (SPAD)	76
3. Açúcares solúveis e atividade enzimática	87

Índice

V – Discussão.....	96
1. Trocas gasosas e fluorescência	97
2. Concentração de clorofila.....	101
3. Concentração de açúcares solúveis e atividade enzimática	102
4. Considerações finais	104
VI – Conclusões	105
VII – Resumo	106
VII – Abstract.....	107
VIII – Referências Bibliográficas	108

Introdução

Jatobá e as Reservas

O gênero *Hymenaea* provavelmente teve sua origem na África e posteriormente se espalhou para a região Neotropical da América do Sul, subseqüentemente, se diversificando em várias espécies (Lee e Langenheim, 1975). Dentre estas, a *Hymenaea courbaril*, popularmente chamada de jatobá, é considerada uma das mais bem sucedidas espécies deste gênero. Isso por causa de sua grande resistência a seca e a ambientes com baixa luminosidade (Gerhardt, 1993; Souza e Valio, 1999; Santos e Buckeridge, 2004). O jatobá é uma espécie arbórea, secundária tardia, a qual ocupa primordialmente ambientes florestais tropicais (Strauss-Debenedeti e Bazzaz 1996).

Esta espécie apresenta cerca de 45% da massa seca do cotilédone na forma de xiloglucano (Buckeridge e Dietrich, 1990), o qual funciona como reserva de carbono, que permite o crescimento inicial da plântula, até o estabelecimento da fotossíntese.

Os primeiros trabalhos a apontarem este polissacarídeo como moléculas de reserva datam de 1888 e 1889, nos trabalhos de Heinricher e Reid e Bewley respectivamente (Buckeridge *et al.*, 2000).

Atualmente o conhecimento sobre este polímero encontra-se em estágio avançado. Sabe-se que o xiloglucano é um polímero de açúcares, da classe das hemiceluloses, formado por uma cadeia central de glucanos ligados na posição β -D-(1 $\rightarrow$ 4), podendo apresentar cadeias laterais de α -D-Xylp ligados ao O-6, dependendo do tipo de xiloglucano as cadeias laterais podem ser β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Xylp, α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -Xylp, ou até mesmo grupos mais complexos (Buckeridge *et al.*, 2000).

Este polímero é um importante constituinte da parede celular das plantas superiores, influenciando suas propriedades estruturais e regulando o crescimento e desenvolvimento da planta (Buckeridge et al. 2008), além de poder funcionar como açúcar de reserva em sementes (Santos e Buckeridge, 2004)

Existe, porém, uma diferença entre os xiloglucanos de reserva e os constituintes de parede, os xiloglucanos presentes na parede celular, com função estrutural, apresentam terminais fucosil ligados α -L-(1 $\rightarrow$ 2) nos grupos β -D-galactosídeos, o que não ocorre nas moléculas de reserva (Buckeridge *et al.* 1992).

Esta diferença estrutural possibilita que durante a mobilização de reservas a planta não destrua as paredes celulares. Isso ocorre devido a duas formas distintas de enzimas, diferenciadas apenas pela atividade ou inatividade na presença de xiloglucanos fucosilados (Tin *et al.*, 2000).

Enzimas Hidrolticas

O xiloglucano o principal polissacardeo de reserva dos cotildones do jatob, no entanto, esta uma molcula complexa, muitas vezes com um alto grau de ramificao, portanto a maquinaria celular necessria para hidrolis-la e transform-la em sacarose igualmente complexa. O sistema tem um grupo de enzimas que atua ordenadamente, hidrolizando este polissacardeo em molculas gradualmente menores (Tin *et al.* 2000).

Assim as primeiras enzimas a atuarem so duas exo-hidrolases, XTH e β -galactosidase, estas so responsveis pela exposio dos stios ativos das β -glucosidases e α -xilosidases. Estas ltimas atuam de forma complementar, em um ciclo, no qual a atuao de uma expe o stio ativo da outra (Buckeridge *et al.*, 2000, Santos *et al.* 2004).

No caso do xiloglucano da *Hymenaea courbaril* L., após um ciclo entre β -glucosidases e α -xilosidases, uma molécula de galactosidase impedirá que o ciclo continue, assim uma nova atuação da β -galactosidase se torna necessária (Buckeridge *et. al.*, 2000, Tiné *et al.* 2000).

Portanto a liberação da xilose, glicose e galactose, depende da existência de três enzimas na mesma alça de atuação, enquanto a presença da XTH é necessária para iniciar o processo.

Assim a coordenação temporal destas enzimas é fundamental para que estes açúcares possam ser liberados para a via da sacarose (Figura 1), estando disponíveis, no sincronismo correto, para atuação das enzimas desta via. Assim como, a coordenação temporal se mostrará importante quando da interação entre o metabolismo de reservas e a fotossíntese.

Figura 1: O esquema ilustra o mecanismo de atuação das enzimas envolvidas na degradação de moléculas de xiloglucano, evidenciando a existência de uma ordem lógica de atuação, na qual as primeiras enzimas a atuarem são as exo-enzimas e posteriormente existe a atuação das endo-enzimas (Buckeridge *et. al.*,2000).

Durante o estabelecimento, plântulas de jatobá fazem a transição entre o estado heterótrofo e o autótrofo com o auxílio da mobilização de grandes quantidades de reservas cotiledonares (Tin *et al.* 2000, Santos *et al.*, 2004). Segundo Santos e Buckeridge (2004) à medida que as reservas são degradadas, sacarose é formada nos cotildones e distribuída prioritariamente para a parte aérea das plntulas (efilos e metafilos em desenvolvimento).

Com a expansão total dos eófilos, e com a transição deste de dreno para fonte, inicia-se uma fase em que a fotossíntese e a mobilização de reservas coexistem na plântula. Desta forma, a planta passa a dispor de duas fontes de carbono durante um período de aproximadamente 20 dias (Santos e Buckeridge, 2004)

Com isso, a produção de carboidratos nas folhas (eófilos principalmente) ocorre durante o dia, devido à fotossíntese, enquanto na fase noturna as reservas de parede celular (xiloglucano) são degradadas (Brandão *et al.*, 2009, Amaral *et al.*, submetido). Assim sendo, açúcares são produzidos e distribuídos para os órgãos dreno ininterruptamente ao longo de 24 horas (Santos *et al.*, 2004), maximizando as chances de estabelecimento da plântula.

Os mecanismos de controle deste processo vêm sendo gradativamente desvendados. Em trabalhos anteriores (Tiné *et al.*, 2000; Santos e Buckeridge, 2004; Santos *et al.*, 2004; Amaral, 2005; Brandão *et al.*, 2008) foi demonstrado que os pontos de controle deste processo incluem a luz, o AIA e a fotossíntese.

Mobilização de Reservas de Parede Celular no Jatobá

Em cotilédones de plântulas de *Hymenaea courbaril* o xiloglucano é degradado, entre o vigésimo e o septuagésimo dia após a embebição, por quatro enzimas. Tiné *et al.* (2000) propuseram que o polímero é primeiramente atacado por uma xiloglucano endotransglicosilase-hidrolase (XTH) que produz oligossacarídeos que são atacados por exoglicosidases (β -galactosidas, β -glucosidase e α -xilosidase) que produzem monossacarídeos que são, imediatamente, metabolizados a sacarose que é transportada para a plântula em desenvolvimento (Figura 1).

Quando do estabelecimento da fotossíntese, que se dá a partir do trigésimo dia, a plântula passa por um período de aproximadamente 20 dias, dispondo de duas fontes de carbono, a de reserva e a autotrófica (Santos e Buckeridge, 2004). Os mecanismos de controle do processo têm sido intensamente investigados nos últimos anos e os resultados obtidos indicam um alto nível de complexidade (Santos *et al.*, 2004; Santos e Buckeridge, 2004). Os cotilédones ficam ligados à plântula em desenvolvimento durante aproximadamente 70 dias e durante este período, os eófilos (primeiras folhas) e o primeiro par de folhas (metáfilos) se expandem.

Santos e Buckeridge (2004) demonstraram que os eófilos se tornam fotossinteticamente ativos e participam da captação de carbono, mesmo antes das reservas dos cotilédones serem exauridas. Durante este processo, as folhas em desenvolvimento produzem auxina, que é transportada para os cotilédones, sinalizando positivamente para liberar a mobilização de reservas (Santos *et al.*, 2004), sendo este um dos possíveis sinais que gerariam a alternância entre a utilização das reservas e a fotossíntese.

Em experimentos com medidas de atividade das enzimas de degradação do xiloglucano (XTHs, β -galactosidase, β -glucosidase e α -xilosidase) foi observado que as atividades aumentam significativamente durante o período noturno, a partir das 18h e atingindo um pico em 0h. A atividade das enzimas baixa até as 6h e começa a aumentar novamente a partir de então (Amaral, 2005).

A partir dos picos diários encontrados, nas atividades enzimáticas, por Amaral (2005), em sua tese de mestrado, e seguindo os estudos de Santos *et al.*, (2004), o qual propôs um controle enzimático por AIA, podemos inferir que exista um controle diário, possivelmente circadiano, da produção de auxina em jatobá.

Recentemente evidências de outros controles deste mesmo mecanismo vêm sendo descobertas pelo grupo. Na tese de Brandão (2008), foram obtidas seqüências parciais de quatro genes relacionados à degradação do xiloglucano de reserva (β -galactosidase e xiloglucano transglicosilase-hidrolase (XTH)) e também do metabolismo de sacarose (invertase alcalina e sacarose sintase), e a partir da análise de expressão desses genes, pudemos notar picos de expressão ao longo de 24 horas, os quais estariam sob influencia da condição luminosa, sugerindo um possível controle circadiano ainda na fase transcricional do processo.

Brandão *et al.* (2008) demonstrou ainda que a expressão desses genes também é controlada pelo transporte polar de auxinas, produzidas nas folhas e enviadas para os cotilédones, o que torna este processo dependente das folhas em desenvolvimento e do estabelecimento da fotossíntese nas mesmas.

Apesar de fortes evidências da presença de um ritmo circadiano controlando o metabolismo de carbono da plântula, nunca foi feito um experimento conclusivo sobre este assunto.

Como resultado de todos estes trabalhos um modelo integrado de controle da mobilização do xiloglucano de reserva de cotilédones de jatobá foi proposto em Brandão *et al.* (2008) (Figura 2). Neste modelo, são salientados prováveis pontos de controle, como a sinalização por luz, que poderia atuar tanto nos processos moleculares, via fotopigmentos, como diretamente na produção hormonal, podendo ter cotilédones e folhas como órgãos de entrada do sinal luminoso.

Figura 2: Esquema do metabolismo de mobilização do xiloglucano de reserva em cotilédones de *Hymenaea courbaril*, os nomes das enzimas nele representadas estão dados em itálico. Hipoteticamente as correlações entre genes e enzimas são: XTH = HcXTH1, hcbetagal = HcBGAL1, invertase = HcAlkN1 e sucrose sintase = HcSUS1 (Brandão *et al.*, 2008).

Fotossíntese: Uma rápida visão histórica

O início do entendimento da fotossíntese data da primeira metade do século XVII. Nesta época, não se conhecia a autotrofia, acreditando-se que as plantas retiravam do solo ou da água a energia necessária para viver. Um exemplo clássico é ilustrado pelo físico van Helmont, que ao crescer uma plântula por cinco anos, verificou que o substrato não era reduzido, concluindo assim, que todo o material necessário para o crescimento era derivado da água (Hall e Rao, 1999).

Apenas em 1727, o botânico Stephen Hales modifica esta visão apontando o ar como nutriente utilizado para o crescimento vegetal. Entre

1771 e 1777 o químico Joseph Priestly (um dos descobridores do oxigênio) demonstra que as plantas são capazes de reverter o processo de respiração presente nos animais, para gerar moléculas mais complexas (Hall e Rao, 1999).

Alguns anos depois o físico Jan Ingenhouse, verificou que o oxigênio só era liberado na presença de luz solar, e que somente as partes verdes da planta eram capazes de realizar este processo.

Em 1782 Senebier, observou que as plantas utilizavam o dióxido de carbono como substrato na formação de moléculas mais complexas. No início do século XIX de Saussure comprovou que a água também seria consumida no processo de fotossíntese (Hall e Rao, 1999).

Em meados do século XIX o fenômeno da fotossíntese passou a ser representado pela equação $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{luz} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Matéria orgânica} + \text{energia química}$ (Hall e Rao, 1999).

Em 1864 o botânico Sachs demonstrou que ocorre a formação de grânulos de amido durante a fotossíntese, sendo que em 1880 Engelmann demonstra uma relação entre o espectro luminoso e a liberação do O_2 .

Apenas em 1905 Blackman sugeriu que a fotossíntese seria dividida em duas etapas. Sendo a primeira dependente de luz (fotoquímica) e a segunda independente (chamada de *dark reaction*) (Hall e Rao, 1999).

van Niel em 1930, trabalhando com fotossíntese de bactérias, descobriu que estas poderiam assimilar CO_2 sem liberar O_2 , propondo assim uma equação geral da fotossíntese: $\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{A} + \text{luz} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O}) + \text{H}_2\text{O} + 2\text{A}$. Sendo que as plantas e algas são um caso especial em que A representa o oxigênio.

Apenas na década de 50, Calvin e colaboradores elucidaram a via fotossintética de redução do carbono (*dark reaction*), com base em estudos de $^{14}\text{CO}_2$. Sendo que na década seguinte Emerson e Rabinowitch

postularam a existência de duas reações luminosas na fase fotoquímica (Hall e Rao, 1999).

Fotossíntese: Cloroplasto e sua conformação

O cloroplasto é a organela celular, em plantas superiores, a qual concentra os fotopigmentos responsáveis pela captação de luz e conversão desta em energia química. A organização interna desta organela ajuda a maximizar a captação e o processamento da energia luminosa.

As principais estruturas dos cloroplastos são os tilacóides (pequenas bolsas de dupla membrana lipídicas que concentram a maior parte dos fotopigmentos), os quais são empilhados formando uma estrutura chamada *granum*. O granum garante que uma maior quantidade de fótons seja absorvida, isso porque, a luz que atravessa um tilacóide ainda pode ser utilizada pelo tilacóide subsequente a este no granum. A luz interior dos tilacóides é chamada de Lume. O lume pode ser utilizado para a geração de gradientes de pH, quando em comparação à matriz envoltória dos grana, o estroma.

Associado aos grana estão as lamelas estromais, canais de membrana que ligam os grana e apresentam uma composição diferente de fotopigmentos. Respectivamente podemos encontrar os fotossistemas II nas membranas dos tilacóides e os fotossistemas I associados às membranas das lamelas estromais (os fotossistemas serão discutidos com maior profundidade no tópico seguinte) (Taiz *et al.*, 2004).

Fase fotoquímica

A fotossíntese como um todo pode ser dividida em duas etapas, a fase de captação de energia luminosa e a fase que compreende as reações de carboxilação, a qual fixa efetivamente o CO₂ na forma de hidrocarbonetos (Buchanan *et al.*, 2000)

A captação de energia luminosa em plantas superiores abrange praticamente todo o espectro visível e parte da radiação ultra-violeta e infra-vermelho, se estendendo de pouco menos de 400nm a aproximadamente 700nm. Esta grande variação no espectro de absorção de luz só é possível devido à interação entre diversos fotopigmentos (Avers,1985).

Os principais fotopigmentos encontrados em plantas superiores são as clorofilas (sendo estas divididas em clorofilas “a” e “b”) e os carotenóides. Estas moléculas são agrupadas em complexos de captação luminosa denominados “atenas”. Este arranjo é importante na maximização da captação luminosa (Green e Durnford, 1996).

A captação da energia luminosa pelas antenas é feita pela excitação de um fotopigmento causada pela incidência de um fóton. A energia contida na luz incidente, e conseqüentemente, a intensidade da estimulação do fotopigmento, depende da frequência da onda luminosa. Uma vez que a velocidade da luz é constante quanto menor o comprimento de onda maior a frequência e maior a energia. Assim sendo, comprimentos de onda próximos ao azul são energeticamente mais carregados que ondas próximas à região do vermelho (van Grondelle *et al.*, 1994; Taiz *et al.*, 2004).

Esta relação se torna importante para entendermos o arranjo estrutural das antenas, isso porque, fotopigmentos que absorvem luz em comprimentos de onda menores (região do azul) estão posicionados mais no exterior do complexo, enquanto pigmentos com maior capacidade de absorção de comprimentos de ondas maiores (região do vermelho) se encontram mais no centro da antena. Esta ordem é mantida por uma proteína conhecida como LHC (*light-harvesting complex*), a qual também está relacionada à regulação da captação de luz por apresentar mudanças

conformacionais que expõem ou escondem os fotopigmentos (Pullerits e Sundstrem, 1996; Taiz *et al.*, 2004).

Toda a energia captada pelos fotopigmentos deve ser transmitida para um dímero de clorofilas modificadas, posicionadas na região mais interna do complexo antena. Este dímero é chamado de centro de reação e é o único capaz de liberar um elétron quando excitado. Existem dois tipos de centro de reações, o primeiro atua com preferência energética no comprimento de onda de 680 nm e o segundo atuam preferencialmente em 700 nm (por isso são chamados de P680 e P700) e compõem dois complexos distintos, chamados fotossistemas II e I respectivamente. Estes fotossistemas apresentam pigmentos distintos na composição de suas antenas e desempenham papéis complementares na transformação de energia luminosa em energia química (Grossman *et al.*, 1995, Taiz *et al.*, 2004)

Assim sendo, a energia captada por um fotopigmento deve ser transferida para o pigmento adjacente por meio de ressonância, até chegar ao centro de reação. Com isso posto, fica intuitivo entender que as moléculas com maior capacidade de captar altas quantidades de energia devem situar-se na parte mais externa do complexo. Isso faz com que seja gerado um fluxo de energia em direção ao centro de reação. Além disso, uma vez que a cada transferência energética para um fotopigmento adjacente parte da energia captada é perdida, o processo tornasse irreversível, ou seja, é impossível a transferência de energia novamente ao fotopigmento doador da excitação (Taiz *et al.*, 2004).

Existem três formas de dissipação da energia captada pelas antenas. Na dissipação por calor, parte ou toda a energia captada é devolvida ao ambiente na forma de calor. Já na fluorescência, quando uma molécula fotorreceptora é excitada por luz vermelha, e não pode transferir sua energia para outra molécula, ela pode reemitir ao ambiente o fóton

recebido, porém com um comprimento de onda pouco maior que o absorvido. Através do acompanhamento destas reemissões, pode-se acompanhar a transferência energética nas antenas e a transferência dessa energia para o centro de reação, que acaba por liberar um elétron. Esta liberação de elétrons é a última forma de liberação de energia, também conhecida como fotoquímica (Lichtenthaler *et al*, 2005; Baker, 2008).

Estes três processos são competitivos entre si, no entanto, não excludentes. Por exemplo, parte da energia de uma molécula excitada por luz azul pode ser perdida em um evento de dissipação por calor, e ainda sim o processo pode culminar na emissão de um fóton.

Figura 3: Representação esquemática da cadeia de transporte de elétrons situada na membrana de um tilacóide. Água é oxidada pelo fotossistema II (PSII) e elétrons são carregados ao fotossistema I (PSI), o qual reduz o $NADP^+$ à $NADPH$. Os prótons liberados pela água e captados pelas quinonas no estroma geram um gradiente eletroquímico que é utilizado para formação de ATP (Taiz *et al.*, 2004).

Uma vez que a energia seja canalizada livremente ao centro de reação e este libere um elétron, o centro fica oxidado e necessita de um doador de elétrons. Esse doador é a água que, após ser oxidada a O_2 e H^+ ,

libera elétrons, suprindo a demanda do centro de reação (Figura 3) (Taiz *et al.*, 2004).

Os elétrons liberados pelo centro de reação entram em uma cadeia transportadora, composta de quinonas. Neste processo, quando uma quinona recebe dois elétrons, ela captura dois prótons do estroma para estabilizar suas cargas. Uma vez que os elétrons das quinomas são transferidos ao complexo Citocromo b_6f os prótons capturados são liberados no lume. Estes prótons, somados aos produzidos na oxidação a água, geram um gradiente de pH entre o lume e o estroma, posteriormente, esta energia osmótica será utilizada na formação de ATPs (Figura 3) (Blankenship, 2002; Taiz *et al.*, 2004).

O complexo Citocromo b_6f redireciona os elétrons para o Fotossistema I via Plastocianina. No Fotossistema I o processo de captação e transferência de energia para o centro de reação é o mesmo que no Fotossistema II, entretanto, o centro de reação P700 do Fotossistema I, gera um agente redutor muito forte, em comparação ao Fotossistema II.

Os elétrons liberados pelo P700 entram novamente em uma cadeia transportadora de elétrons e são sucessivamente transferidos por diversos aceptores até atingirem uma ferredoxina solúvel (Fd). Esta ferredoxina é um ponto chave no sistema, uma vez que deste ponto os elétrons podem ser novamente redirecionados ao Citocromo b_6f , entrando em um processo cíclico que aumenta o bombeamento de prótons, ou serem passados a uma flavoproteína solúvel, a ferredoxina-NADP redutase, a qual reduz o $NADP^+$ a NADPH, o qual é o aceitor final da cadeia de transporte de elétrons e será utilizado na fase de carboxilação da fotossíntese (Blankenship, 2002; Taiz *et al.*, 2004).

No processo de oxidação da água e no bombeamento de prótons para o lúmen pelas plastohidroquinonas (geradas pela partição dos elétrons no Citocromo b_6f), criou-se um potencial entre o lúmen do

tilacóide e o estroma. Este potencial é aproveitado pela planta, convertendo energia osmótica em energia química, isto é possível graças a uma proteína de membrana com uma subunidade hidrofílica conhecida como ATP sintase.

Esta proteína, em sua porção hidrofóbica, gera um canal que permite a passagem de prótons pela membrana do tilacóide. O fluxo de prótons faz com que a ATP sintase rotacione sobre o próprio eixo unindo uma molécula de ADP com uma molécula de fosfato formando o ATP, que é utilizado em diversos processos celulares, e apresenta um importante papel na fase de carboxilação da fotossíntese (Taiz *et al.*, 2004).

Fase das reações de carboxilação

Os produtos da fase fotoquímica (ATP e NADPH) são componentes fundamentais na fixação de carbono pela planta. A fixação de carbono ocorre em uma série de reações químicas auto-regenerativas, ou seja, os compostos encontrados no início do ciclo serão os mesmo encontrados ao final, sendo os compostos gerados na fase fotoquímica e o CO₂ os únicos consumidos, este ciclo é conhecido como ciclo de Calvin, em homenagem ao seu descobridor.

O ciclo de Calvin é dividido em três etapas, a carboxilação, onde H₂O é consumida para fixar moléculas de CO₂, a redução, onde ATP e NADPH são consumidos para reduzir intermediários do processo, e a regeneração, onde os intermediários são novamente convertidos nos compostos iniciais através do gasto de ATP (Buchanan *et al.*, 2000).

A carboxilação depende de uma molécula composta de uma cadeia de 5 carbonos chamada Ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), que é carboxilada e forma duas moléculas de 3-fosfoglicerato. A carboxilação da RuBP depende de uma enzima chave no processo conhecida como

ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), que como sugere o nome, não apenas carboxila como também pode oxigenar a RuBP, em um processo competitivo.

A fase de redução inicia-se por uma fosforilação do 3-fosfoglicerato mediada por ATP, em seguida o composto resultante é reduzido à gliceraldeído-3-fosfato, com o auxílio de uma desidrogenase que catalisa a reação do NADPH (Buchanan *et al.*, 2000).

O gliceraldeído formado é o precursor da sacarose, ou seja, este pode ser desviado do ciclo de Calvin em uma nova via de formação de sacarose. No entanto, a maior parte dos gliceraldeídos (5/6), é redirecionada para a fase de regeneração.

A fase de regeneração da RuBP é a mais complexa e que envolve mais intermediários, mas de forma resumida o gliceraldeído-3-fosfato pode ser direcionado para quatro rotas metabólicas diferentes, sendo que todas culminam na produção de ribulose-5-fosfato. Estas são fosfatadas via gasto de ATP a ribulose-1,5-bisfosfato, fechando assim o ciclo e regenerando as cadeias carbônicas iniciais do processo (Buchanan *et al.*, 2000).

Fluorescência

Como discutido anteriormente, a fluorescência é um dos processos que competem pela dissipação da energia de excitação captada pelas antenas. Sendo que esta energia também pode ser dissipada por meio de emissão de calor ou uma transdução desta energia de forma fotoquímica, com a liberação de um elétron. Uma vez que estes processos são competitivos, o monitoramento da fluorescência nos fornecer informações importantes sobre o funcionamento dos fotossistemas como um todo.

O comprimento em que cada fotossistema fluoresce é levemente diferente. Isso ocorre devido à diferença nos espectros de absorção dos

fitossistemas, uma vez que a fluorescência é a reemissão de um fóton ao ambiente com um pequeno aumento em seu comprimento de onda (devido à perda de energia no processo). Assim sendo, o fitossistema II, o qual apresenta o espectro preferencial de absorção a 680 nm, fluorescerá em um comprimento de onda menor que o fitossistema I, que apresenta absorção ótima a 700nm. Esta característica nos permite acompanhar separadamente o comportamento dos fitossistemas, e portanto, acompanhar a cadeia de transporte de elétrons como um todo (Baker, 2008).

Quando uma planta é submetida à luz actínica, ou seja, luz na faixa do espectro de absorção dos fitossistemas, podemos identificar uma fluorescência que é resultado do equilíbrio dinâmico entre os três processos que competem pela energia de excitação (liberação de calor, fluorescência e fotoquímica), a este padrão de fluorescência é dado o nome F' (Lichtenthaler *et al*, 2005; Baker, 2008).

Caso apliquemos um pulso de luz saturante nos fitossistemas todos os centros de reação serão oxidados e fechados. Neste cenário, apenas existiria a possibilidade de dissipação da energia de excitação por meio de calor e fluorescência. Portanto, a partir da aplicação de um pulso saturante de luz podemos encontrar a fluorescência máxima de uma planta adaptada à luz, denominada F_m' .

O mínimo de fluorescência, por outro lado, é encontrado através da aplicação de um pulso de luz vermelho-extremo. Este pulso faz com que o fitossistema I seja estimulado, drenando os elétrons da cadeia de transporte e conseqüentemente oxidando as quinonas (quando as quinonas estão oxidadas e portanto, passíveis de receber um elétron, dizemos que os centros de reação (no caso os P680) estão abertos). Este processo desloca o equilíbrio da reação na direção da dissipação energética pela liberação de elétrons, assim sendo, minimizando a participação da

fluorescência na dissipação da energia. A medida obtida dessa forma é chamada F_0' (Figura 4).

Figura 4: Ilustração apresentando curvas de fluorescência do fotossistema II. Curvas em amarelo adquiridas com um pulso de luz saturante. Curva em azul obtida da exposição da planta à luz actínica. Curva em vermelho baseada em pulsos de vermelho-extremo. As setas em branco na base do gráfico indicam mudanças nas condições luminosas e suas intensidades. F_m , F_0 e F_v são medidas de fluorescência máxima, mínima e o delta entre máxima e mínima, respectivamente, para plantas adaptadas ao escuro. F_m' , F_0' e F_v' são medidas de fluorescência máxima, mínima e o delta entre máxima e mínima, respectivamente, para plantas adaptadas à luz actínica. F' é a medida relativa à fluorescência em equilíbrio dinâmico quando a planta está adaptada à luz actínica (Baker, 2008).

O delta de variação total entre a fluorescência mínima (F_0') e máxima (F_m') definem uma nova variável chamada F_v' . A razão F_v'/F_m' gera uma estimativa relativa da capacidade máxima de transferência de energia das antenas para os fotossistemas adaptados à luz (Baker, 2008).

Outra variável importante é o qP, este é uma estimativa relativa da proporção de centros de reação abertos, isso é conseguido pela interação

entre F_m' , F_0' e F' , sendo o parâmetro descrito pela fórmula $[(F_m' - F')/(F_m' - F_0')]$.

A razão entre F_v'/F_m' e o qP definem a eficiência quântica do fotosistema II (ϕ_{psII}), que é o resultado da fluorescência máxima adaptada à luz (F_m') menos a fluorescência basal (F') dividida pela fluorescência máxima $[(F_m' - F')/F_m']$. Dando uma estimativa de quanto da energia captada é transformada em eventos fotoquímicos, e portanto, é uma medida da eficiência operacional dos fotossistemas II em uma dada condição luminosa. Assim sendo, nos dá uma idéia da eficiência de transmissão da energia nas antenas.

Estes parâmetros, portanto, nos permitem acompanhar, em tempo real, o comportamento dos fotossistemas e da cadeia de transporte de elétrons como um todo.

A formação da cronobiologia: uma visão histórica

A percepção da existência e da importância dos ciclos naturais permeia a cultura de diversos povos, muitas vezes refletidos em lendas, mitos ou cultos religiosos.

No entanto, a noção de que os organismos vivos poderiam acompanhar e responder a esses ciclos naturais é mais recente. Provavelmente o primeiro relato descritivo de um ciclo biológico foi feito por Andróstenes de Thasos em 325 *a.C.*

Andróstenes era um historiador que acompanhava o exército de Alexandre, o Grande, em suas excursões de batalha. Em um dos acampamentos Thasos passa a observar uma árvore de *Tamarindus indica*, o tamarindeiro, e descreve a forma peculiar como as folhas se fechavam durante a noite e se abriam durante o dia (Bretzl, 1903; Schildknecht, 1983).

A compreensão da existência de ciclos presentes em seres vivos é um elemento importante na história da cronobiologia. Porém, mais de dois séculos se passaram até o surgimento da idéia de tais ciclos não serem uma mera resposta ao ambiente, mas sim o resultado de um mecanismo endógeno.

Esta idéia surgiu em 1729, e foi proposta pelo astrônomo francês Jean Jacques de Mairan. Assim como Andróstenes, Mairan percebeu a existência de ciclos diurnos na movimentação foliar de plantas, provavelmente uma mimosa, e decidiu isolá-la em um compartimento sem luz.

A constatação de que o ritmo nictitante (movimentação foliar) era mantido mesmo em escuro constante chama atenção, mas na época não foi dada a devida importância ao fato, e somente 30 anos depois estes experimentos foram retomados (Moore-Ede *et al.*, 1982, McClung, 2006).

Em 1759, Johann Gottfried Zinn, ao cultivar plantas de *Mimosa virgata* em um porão constantemente escuro, descreve que as plantas não eram afetadas por flutuações na temperatura.

Este fato inesperado faz com que Zinn apresente a idéia de que um mecanismo endógeno apresentasse componentes que não fossem alterados pela temperatura (Cumming and Wagner, 1968).

Somente em 1832, Augustin Pyrame de Candolle, um botânico suíço, conseguiu medir o período da movimentação foliar de uma planta em escuro constante, e constatou que este não era exatamente 24h, o que comprovava a noção de um mecanismo endógeno de marcação do tempo (McClung, 2006).

No mesmo trabalho, de Candolle ainda consegue inverter o ritmo nictitante das folhas ao inverter as fases de claro e escuro a qual as plantas estavam submetidas (Cumming and Wagner, 1968).

Em meados dos anos 1940, Erwin Bünning propõe, ao discutir fotoperiodismo, que o mecanismo de medida da duração do dia era controlado por um oscilador endógeno, com período de aproximadamente 24h (circadiano).

Bünning ainda apresenta a idéia de que este oscilador seria dividido em duas fases de aproximadamente 12h cada uma (sendo uma no claro e outra no escuro) e cada uma das fases apresentaria sensibilidade diferente a estímulos exógenos (Cumming and Wagner, 1968).

Nesta época muitos estudos vinham sendo desenvolvidos tomando por base os ciclos biológicos. Foi então que em 1960, no encontro sobre “Relógios Biológicos” (*Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*), ocorrido nos EUA e organizado por Colin Pittendrigh, institucionalizou-se e sistematizou-se disciplinarmente a cronobiologia (Marques & Menna-Barreto, 2003).

Este evento compilou as principais idéias e conhecimentos adquiridos ao longo dos anos e levantou novas questões a serem entendidas, gerando uma nova era no estudo dos ciclos biológicos, na qual as perguntas básicas seriam voltadas ao entendimento do funcionamento do próprio oscilador.

Circaritmos

O termo “circadiano” foi originalmente cunhado por Franz Halberg para definir ritmos com duração aproximada à 24h (do latim “circa” = “cerca de” e “dies” = “dia”) (McClung, 2006).

Posteriormente outros tipos de ritmos foram descobertos e, como padrão, foi mantida a latinização para denominar estes ritmos.

Assim, ritmos com períodos menores que 24h foram denominados “ultradianos” e ritmos com períodos maiores que 24h foram chamados “infradianos”.

Atualmente, todo ritmo controlado por um ou mais osciladores endógenos, independente de seu período, são chamados de circar ritmos (como circamaré, circalunar etc) (Lumsden e Millar, 1998; Marques & Menna-Barreto, 2003; Dunlap *et al.*, 2004).

Mas, como definir se um ritmo é controlado por um relógio endógeno?

Para um ritmo ser considerado um circar ritmo ele deve apresentar três características básicas.

A) persistir em condições constantes (entrar em livre curso, ou seja, oscilar com período intrínseco ao oscilador, independente de ciclos externos).

B) ser passível de arrastamento (o oscilador deve ser passível de entrar em ressonância com ciclos do ambiente, acompanhando seu período e mantendo uma relação de fase estável com o mesmo).

C) apresentar compensação à temperatura, ou seja, apresentar um Q_{10} próximo a 1 (McClung, 2006; Harmer, 2009) (o Q_{10} representa a velocidade de uma dada reação química ao aumentarmos 10°C na temperatura da mesma, normalmente o Q_{10} das reações químicas é igual a 2, ou seja, ao aumentarmos em 10°C a temperatura, dobramos a velocidade da reação, mas em *P. coccineus*, por exemplo, verificamos um Q_{10} de 1,2 na variação do período da movimentação foliar) (Bünning, 1931).

Seguindo esses padrões podemos imaginar que a maioria dos ritmos observados em plantas não são circar ritmos.

Isso é verdade, acreditasse que cerca de um terço de todos os genes seja controlado endogenamente (Convington *et al.* 2008) e estimasse que pouco mais de 36% de todos os promotores em *Arabidopsis* sejam controlados circadianamente (Michael e McClung, 2003).

A grande questão é que a maioria dos processos controlados circadianamente são componentes fundamentais nas redes metabólicas das plantas, conseqüentemente controlando um nó importante da rede metabólica acabamos por controlar toda a rede metabólica (Harmer *et al.*, 2000).

Osciladores e acoplamento

Atualmente sabemos que os osciladores são compostos por alças de retroalimentação envolvendo transcrição e tradução gênicas. Em plantas particularmente, já foram identificadas três alças principais, sendo uma matutina, uma vespertina e uma central (Harmer *et al.*, 2009).

Esta descoberta é particularmente interessante, principalmente ao pensarmos que todas as células carregariam a maquinaria necessária para gerar um oscilador endógeno, o que geraria uma miríade de osciladores ao longo da planta.

Na verdade, as evidências atuais apontam exatamente para isso. Não encontramos uma região, ou órgão, que concentre a função de relógio endógeno em vegetais, cada célula em si gera seu próprio ritmo, e muitas vezes uma única célula apresenta mais de um oscilador (Lumsden e Millar, 1998; McClung, 2006; Harmer *et al.*, 2009)

Bem sabemos que os osciladores não geram ritmos exatamente iguais à 24h, sendo assim, cada oscilador de uma planta apresentaria um período próximo, mas não exatamente igual aos outros.

Então como a planta como um todo não fica dessincronizada?

Devemos primeiro pensar que os osciladores, quando em condições naturais, não estão em livre curso, ou seja, não estão livremente expressando seu período endógeno, como em condições constantes. Sendo portanto, arrastados pelos ciclos do ambiente.

No entanto, muitos outros sinais, independentes do ambiente, podem gerar a sincronização dos osciladores.

Em pequena escala, sinais de curta distância podem ser transmitidos para as células adjacentes por meio de plasmodesmas (junções citoplasmáticas entre células através de poros na membrana e parede celular), estes sinais poderiam ser químicos ou elétricos (Ding, 1997)

Em maiores distâncias outros mensageiros poderiam ser utilizados. Por exemplo, sinais hidráulicos, hormonais ou até açúcares (James *et al.*, 2008)

Na verdade muitos trabalhos já foram feitos demonstrando a atividade hormonal em plantas como um importante sinal de sincronização endógena fraca.

Giberelina, auxina e etileno são apontados como efetores em alterações nas fases dos osciladores (Viswanathan e Subbaraj, 1983; Foster e Morgan, 1995; Machackova *et al.* 1997; Morgan *et al.*, 1990; Ievinsh e Creicbergs, 1992)

No entanto, todos os agentes sincronizadores conhecidos são efetores fracos. Thain e colaboradores, em seu trabalho de 2000, demonstram que os osciladores de uma planta de tabaco podem ser desacoplados regionalmente.

Neste experimento diferentes órgãos de uma mesma planta foram submetidos, ao mesmo tempo, a tratamentos com ciclos claro/escuro em diferentes relações de fase. Como resultado cada órgão passou a expressar a fase a ele imposta, sendo esta fase mantida em um tratamento posterior onde toda a planta foi transferida para condições constantes.

Relação entre Osciladores

Cada oscilador apresenta um período ligeiramente diferente, o que gera diferenças na expressão final do ritmo entre indivíduos de uma mesma espécie (Pittendrigh e Daan, 1976).

Assim, quando analisamos um ritmo em um mesmo organismo, estamos indiretamente analisando o sistema de osciladores que gera este ritmo. Com isso, se dois processos, de um mesmo organismo, apresentam períodos distintos, podemos concluir que são gerados por sistemas oscilatórios diferentes.

O processo de acoplamento entre osciladores, como vimos, é pouco conhecido. Sabemos, no entanto, que ele é dependente do período dos osciladores envolvidos. Quanto mais distintos esses períodos mais fraco o acoplamento. Isso porque, o acoplamento entre osciladores, assim como o arrastamento de um oscilador pelo ciclo ambiental, é mediado por um processo semelhante à ressonância. Com isso, se os períodos forem muito distintos torna-se impossível o acoplamento dos osciladores (Dunlap *et al.*, 2004).

O que gera o acoplamento não é conhecido, sabemos, porém, que a força do acoplamento é variável, não dependendo apenas do período do oscilador. Assim sendo, um organismo submetido a alterações nos períodos dos osciladores ou estresse pode desacoplar seus osciladores.

Se dois osciladores acoplados estão arrastados, o período gerado por eles será exatamente o período do ciclo ambiental. Quando colocamos um organismo em condições constantes e os osciladores entram em livre curso, os osciladores passam a expressar um período diferente do apresentado pelo ciclo ambiental.

Se os períodos dos osciladores forem muito diferentes entre si, ou se a condição ambiental gerar estresse suficiente para enfraquecer o acoplamento, pode-se presenciar um fenômeno chamado *dessincronização interna espontânea* (Michael *et al.*, 2003).

Este fenômeno não é devido ao desacoplamento entre osciladores, e sim à dessincronização dos mesmos. Na verdade, os osciladores continuam tendo influência um sobre o outro, o que muda é a intensidade com que esses osciladores são capazes de se influenciar (Figura 5).

Figura 5: Círculos representam osciladores, tamanhos diferentes representam características periódicas diferentes. A representa dois osciladores fortemente acoplados gerando um único ritmo. B representa os mesmos dois osciladores espontaneamente dessincronizados devido ao livre curso, sendo que o ritmo inicial agora apresenta duas componentes. C representa os mesmos osciladores desacoplados, cada qual gerando um ritmo independente do outro.

Outro processo importante de salientarmos é o chamado amortecimento. O amortecimento é um fenômeno no qual o ritmo medido perde amplitude gradualmente até a completa extinção, o que não quer dizer que o oscilador parou de funcionar, apenas que a referência medida parou de oscilar.

São apontados dois possíveis motivos para tal fato. O primeiro, e menos aceito em plantas, parte da idéia de que cada oscilador apresenta um período levemente diferente do outro. Ao colocarmos estes osciladores em condições constantes, cada oscilador desempenharia um período próprio (livre curso), e isso gradualmente tiraria o sistema oscilatório de fase, o que faria com que o resultado final fosse a arritmicidade da variável medida.

O segundo modelo, mais aceito para organismos fotossintetizantes, aponta para um desacoplamento entre oscilador e as componentes fisiológicas. Neste cenário, o oscilador continuaria funcionando, mas por motivos de estresse fisiológico gerado por condições constantes, o sinal não mais seria transduzido para os mecanismos fisiológicos (Kondo, 1982b; Cumming, 1967; Simon *et al.*, 1976; Miller *et al.*, 1995b; Zhong *et al.*, 1997) .

Vendo o mundo em vermelho e azul: sinais ambientais

É sabido que diversos ciclos ambientais podem arrastar os relógios biológicos (estes ciclos ambientais são chamados de *zeitgebers*). Dentre os mais importantes estão os ciclos de condições luminosas, de temperatura e de umidade (Lumsden e Millar, 1998).

Porém, os ciclos de condições luminosas em vegetais são *zeitgebers* muito mais robustos quando comparados aos demais ciclos.

A entrada de informação luminosa para os osciladores em plantas é mediada por dois grupos principais de fotopigmentos, os fitocromos e os criptocromos (Devlin e Kay, 2000).

A família dos fitocromos é dividida em cinco componentes, enquanto a família dos criptocromo em apenas dois. Os fitocromos atuam principalmente absorvendo luz na faixa do vermelho, enquanto os criptocromos atuam primordialmente na faixa do azul. Porém,

sobreposições entre os espectros de absorção nas duas famílias são comuns (Ahmad, 1999; Briggs e Olney, 2001).

Todos os membros das duas famílias participam como transdutores de informação luminosa para os osciladores. No entanto, os criptocromos são necessários para o correto funcionamento de alguns dos fitocromos (Devlin e Kay, 2000).

Em plantas é difícil diferenciar o caminho de transdução do sinal luminoso (aferência) do próprio oscilador, isso porque os fotopigmentos mencionados, em associação com outras proteínas, podem induzir ou reprimir a expressão de genes do relógio diretamente no núcleo (Harmer, 2009). Assim como algumas proteínas componentes das alças de retroalimentação do relógio são apontados como fotopigmentos responsivos aos comprimentos de luz azul (Martin-Tryon *et al.*, 2007; Más *et al.*, 2003)

Esta característica peculiar do relógio de plantas faz com que a própria entrada do sinal luminoso seja controlada pelo relógio.

Uma vez que a concentração dos fotopigmentos oscila circadianamente (assim como a concentração das proteínas fotossensíveis componentes das alças de retroalimentação do relógio) o organismo apresenta fases de maior ou menor sensibilidade ao sinal luminoso ambiental (Bognar *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 2001; Toth *et al.*, 2001).

Outro fator que controla a entrada de luz é a produção de uma proteína (ELF3) no final do dia, esta proteína diminui a fotossensibilidade da planta. A importância deste controle da entrada de luz no relógio ainda é mal entendida, mas sabemos que é importante para o correto funcionamento do relógio em condições em que a planta está submetida a longas fotofases (fase de claro) (McWatters *et al.*, 2000; Covington *et al.*, 2001; Millar, 2004).

Eferências: fisiologia controlada pelo relógio

Como vimos anteriormente a comunicação entre os diversos relógios em uma planta pode ser fraca. No entanto, existe um controle altamente regulado dos processos fisiológicos circadianos.

A transdução do sinal do relógio para os eventos fisiológicos pode ser controlada em diferentes níveis.

O primeiro nível seria o da transcrição gênica, ou seja, o relógio pode induzir ou reprimir a expressão de determinados genes ao longo do dia de acordo com o a fase em que este se encontra.

Na verdade, já foram identificadas seqüências específicas de nucleotídeos da região promotora de alguns genes que define a fase na qual esses genes seriam expressos (Harmer *et al.*, 2000; Convington *et al.* 2008).

O segundo nível do controle circadiano se apresenta no momento da tradução, alguns genes podem apresentar um nível constitutivamente constante de transcrição, mas apresentam ritmos claros na concentração de suas proteínas (McClung, 2001).

O terceiro nível conhecido é o controle da atividade de determinadas proteínas. Este controle é dado principalmente pela fosforilação rítmica das mesmas. Esta fosforilação pode ativar, desativar ou marcar as proteínas para degradação (Harmer, 2009).

O último, e menos rígido controle exercido pelo relógio biológico, atua sobre as redes metabólicas como um todo. Este processo consiste do controle circadiano rígido de um ou mais componentes de uma rede metabólica, o que gera o controle de toda a rede.

Este processo muitas vezes é chamado de controle em “Gate” (do inglês, portão), uma vez que o evento fisiológico é limitado pelo relógio, mas não totalmente controlado por ele (Lumsden e Millar, 1998).

Múltiplos osciladores: vantagens adaptativas da marcação temporal

A existência de um mecanismo de marcação temporal endógeno possibilita ao organismo adiantar-se às alterações ambientais e não apenas responder a elas. Isso permite uma preparação fisiológica à diversas condições ambientais críticas, como preparar os fotossistemas para a chegada da luz no começo do dia ou, no caso de unicelulares, aumentar a proteção contra radiação UV nas horas mais sensíveis do dia (Lumsden e Millar, 1998, McClung, 2001; Enright, 1970).

Experimentos em cianobactérias (mutantes quanto aos períodos de seus relógios) demonstram que quanto mais próximo os períodos endógenos do período do ciclo ambiental maior a chance de sobrevivência quando em competição com organismos possuidores de relógios com períodos discrepantes (Ouyang *et al.*, 1998).

A existência de múltiplos osciladores por si só pode constituir uma vantagem adaptativa, isso porque dois eventos controlados por dois osciladores diferentes podem estabelecer qualquer relação de fase entre eles, o que ajuda a coordenar eventos metabólicos distintos ou mutuamente excludentes, como por exemplo, a atividade do metabolismo CAM, o qual apresenta duas fases distintas entre a fixação de carbono e a captação da energia luminosa (Lumsden e Millar, 1998; Duarte *et al.*, 2005).

As vantagens adaptativas de um conjunto de osciladores fracamente acoplados ainda são pouco conhecidas, mas a termo de especulação, podemos sugerir que tal fato seja relevante ao pensarmos na composição da copa. Cada ramo de uma planta pode estar submetido a uma condição luminosa diferente do resto do organismo ao longo do dia.

Assim a capacidade de coordenar independentemente cada ramo, ou até cada folha, maximizaria a eficiência energética da planta como um todo.

Integrando a mobilização de reservas ao relógio da planta

Como mencionado no item que descreve a mobilização de reservas em plântulas de jatobá, as descobertas feitas nos últimos 25 anos aproximadamente, levaram à compreensão de que enquanto as reservas cotiledonares de xiloglucano são degradadas, a fotossíntese nas primeiras folhas se estabelecem, havendo um período em que os dois processos se sobrepõem. Esta sobreposição gera uma situação em que a plântula em crescimento utiliza tanto os produtos de degradação de reserva provenientes dos cotilédones, como da própria fotossíntese. Este mecanismo foi descrito por Santos e Buckeridge (2004) e os mecanismos bioquímicos de degradação do xiloglucano foram desvendados por Tiné et al. (2000) e Santos et al., (2004). A descrição dos fenômenos ao nível de transcrição gênica, feita por Brandão et al., (2009), produziu evidências que sugeriram fortemente que tanto a mobilização de reservas quanto o desenvolvimento foliar pareciam estar sincronizados, sendo portanto plausível pensar que ambos os sistemas estariam, de alguma forma, sendo controlados circadianamente.

Com base nestas observações, o presente trabalho visou analisar alguns dos eventos relacionados à fotossíntese e ao metabolismo de carboidratos associados à mobilização de reservas. Com isso, verificar a hipótese de que, no caso do jatobá, o controle dos processos ligados à relação fonte-dreno durante o estabelecimento da plântula apresentaria uma componente de controle temporal endógeno.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi identificar a natureza do controle temporal envolvido no balanço fonte dreno durante a fase de estabelecimento de uma plântula de jatobá.

Inserido neste contexto, pretendeu-se identificar a existência de controle circadiano em processos chave, como fotossíntese e degradação de reservas.

Com isso, pretendeu-se identificar a rede de comunicação entre os diferentes sinais, para posteriormente, desenhar um mapa geral do controle temporal que atua durante o estabelecimento da plântula.

Materiais e Métodos

Material Vegetal

As sementes foram escarificadas em esmeril, e colocadas para embeber em bandejas com vermiculita, a condição luminosa dos indivíduos foi de 12 horas de claro ($50 \mu\text{mols de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e 12 horas de escuro.

Após o surgimento da radícula, as plântulas foram transplantadas para vasos de um litro, contendo areia e vermiculita na proporção de 1:1. A cada 15 dias foram acrescentados 50mL de Solução de Hogland, com 8mM de nitrogênio na forma de nitrato de amônio NH_4NO_3 . A condição luminosa se manteve a mesma da descrita anteriormente.

Uma pré-seleção das plantas era feita antes de cada experimento, tomando como base o estágio de desenvolvimento das mesmas. Foi estabelecido que os experimentos seriam iniciados apenas com plantas com o primeiro par de folhas (eófilos) totalmente expandidos e sem deposição aparente de antocianina, assim como, com a segunda folha (metáfilo) ainda em expansão. Isto garantiria homogeneidade nas coletas.

Todos os indivíduos seguiam um processo de rodízio, no qual eram constantemente mudados de posição dentro das câmaras de cultivo (a cada dois dias) até o início dos experimentos, para garantir que eventuais diferenças dentro da própria câmara não afetassem o desenvolvimento de nenhuma muda.

Fotossíntese, Fluorescência e Condutância Estomática

Para os experimentos de fotossíntese e fluorescência as medidas foram feitas com base no LI6400, um aparelho equipado com um

fluorômetro eu um analisador de gases a infravermelho (IRGA), sendo utilizados 600 μmols de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e uma concentração constante de CO_2 de 380 mmol/mol .

Também foi adotado, antes de cada medida de fluorescência, a administração de um pulso de 0,1ms de luz vermelho extremo, para forçar a abertura do centro de reação do fotossistema I e consequentemente permitir a abertura do fotossistema II.

O primeiro experimento tinha como objetivo estabelecer padrões para os demais experimentos, assim como, apresentar o comportamento das plantas em uma condição arrastada pelo ambiente e seu comportamento após sua transferência para condições constantes.

Portanto, um grupo de 20 plantas foi submetido a 3 dias de medidas de assimilação de carbono, condutância estomática e parâmetros relacionados ao fotossistema II (medidas a cada três horas sempre em uma mesma posição de um dos eófilos), em condição de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (C/E), e subsequente, 10 plantas foram transferidas para a condição de claro constante (C/C) e 10 plantas para a condição de escuro constante (E/E), sendo novamente tomados três dias de medidas a cada 3 horas.

O segundo experimento foi baseado nos resultados do primeiro, e visava elucidar quantos osciladores e qual a natureza da interação entre eles, pretendendo com isso, entender o mecanismo de controle temporal que coordenaria a fotossíntese.

Para isso um grupo de 10 plantas foi acompanhado durante nove dias em claro constante (C/C). As tomadas de dados foram feitas a cada três horas e o mesmo grupo de variáveis do primeiro experimento foi

acompanhado (Assimilação de carbono (A), número de centros de reação abertos (qP), rendimento quântica do fotossistema II (Φ psII), eficiência máxima da captação de elétrons do fotossistema II adaptado à luz (F_v'/F_m') e condutância estomática (Cond)).

O terceiro experimento pretendia identificar se a assimilação de carbono e a condutância estomática responderiam diferentemente a ciclos de temperatura e luminosidade. Para isso, um ciclo de temperatura (12 horas quente/12 horas frio) com uma variação total de 10 °C (sendo a temperatura máxima de 30°C e a mínima de 20°C) foi aplicado a plantas submetidas à claro constante.

Para verificarmos se o ciclo de temperatura seria um agente arrastador dos osciladores envolvidos, inverteu-se gradativamente o ciclo de temperatura com relação ao ciclo claro/escuro ambiental. Assim sendo, ao final do tratamento, o ciclo de temperatura estava diametralmente oposto ao ciclo claro/escuro ambiental (temperaturas altas durante a noite subjetiva e baixas durante o dia subjetivo).

Após essa total inversão, foram tomadas medidas de condutância estomática e assimilação de carbono a cada 3 horas durante 72 horas. Ao final desse intervalo as plantas foram colocadas em condições constantes, na qual a temperatura foi mantida a 25°C e a luz continuou constante. Nestas condições um novo grupo de coleta de dados teve início, seguindo o mesmo padrão de coletas a cada três horas ao longo de 72 horas (Figura 6).

Figura 6: Inlustração do desenho experimental. Linhas vermelhas representam o ciclo de temperatura, sendo cada linha equivalente a um dia. C representa a condição luminosa de claro constante.

Com base nas descobertas do terceiro experimento, foi proposto um quarto experimento, visando utilizar as diferenças de respostas de condutância estomática e assimilação de carbono aos ciclos ambientais e forçar uma dessincronização de eventuais osciladores.

Assim, um experimento foi lançado utilizando dois ciclos ambientais ao mesmo tempo, ciclo de luz e temperatura. Neste experimento, um ciclo enfraquecido de luz é confrontado por um ciclo forte de temperatura. O objetivo deste experimento é fazer com que os dois osciladores hipotéticos se separem, sendo cada um arrastado por um ciclo ambiental.

O ciclo de luz foi enfraquecido por meio de um processo conhecido como fotoperíodo esqueleto, no qual apenas uma hora de luz é administrada tanto no início como no final do dia. Junto ao fotoperíodo

esqueleto foi acrescentado um ciclo de temperatura, com uma variação total de 10 °C, igual ao aplicado no experimento anteriormente descrito.

O ciclo de temperatura foi gradualmente deslocado até sua total inversão de fase com relação ao fotoperíodo esqueleto (anti-fase ao ciclo claro/escuro). Esta transição foi mais lenta que a apresentada no experimento anterior para garantir que o arrastamento não fosse perturbado por mudanças drásticas nas relações de fase entre osciladores e ciclos ambientais. Mudanças drásticas poderiam acarretar em um arrastamento unidirecional, por um único ciclo ambiental.

Depois de atingidas fases diametralmente opostas, iniciou-se a coleta de dados, sendo esta realizada com intervalos de 3 horas ao longo de 72 horas. Cumprida esta etapa as plantas foram colocadas em condições constantes, claro constante e temperatura mantida a 25°C. Com isso mais 72 horas de medidas foram executadas (aferindo-se a assimilação de carbono e a condutância estomática) (Figura 7).

Figura 7: Ilustração do desenho experimental. Linhas vermelhas representam o ciclo de temperatura, sendo cada linha equivalente a um dia. C representa a condição luminosa de claro e E representa a condição luminosa de escuro.

Concentração de Clorofila

As medidas de concentração de clorofila foram executadas a partir do uso do equipamento SPAD. Isso possibilitou coletas não destrutivas, uma vez que o equipamento utiliza feixes de luz vermelha e vermelha extrema para fazer as medidas.

Em todos os experimentos de concentração de clorofila eram tirados cinco pontos de cada planta em cada horário de coleta. As medidas foram tiradas sempre da mesma região do eófilo. Para isso, desenvolvemos um sistema de orientação, definido por três pontos de tinta acrílica preta desenhados na folha (Figura 8). Este sistema possibilitou a orientação da cabeça de medida do SPAD e evitou medidas aleatórias ao longo de toda a folha.

Figura 8: Ilustração de como foram feitas as marcações nas folhas e como o leitor do SPAD foi posicionado.

O primeiro experimento de concentração de clorofila foi proposto com o objetivo de comparar condições constantes (tanto claro como escuro constante) com a condição arrastada de C/E.

Para isso 15 plantas foram crescidas em 12 horas de claro e 12 horas de escuro, 5 delas foram mantidas nestas condições, 5 transferidas para claro constante e 5 para escuro constante. Três dias após a transferência iniciamos 3 dias de coleta de dados a cada 3 horas em todos os grupos experimentais. Esta espera de três dias tinha como objetivo minimizar a influência do pós-efeito nas plantas mantidas em condições constantes.

O segundo experimento foi inteiro realizado em claro constante, eliminamos o pré-tratamento de três dias antes da tomada dos dados e estendemos as coletas para 6 dias. Este novo desenho experimental visou uma melhor qualidade dos dados e a posterior comparação com os dados relativos à fotossíntese (5 plantas foram utilizadas nesse experimento).

Determinação de Açúcares Solúveis

Para os experimentos com dosagem de açúcares solúveis utilizamos uma população inicial de 500 sementes. Destas, as 250 plantas mais homogêneas foram selecionadas após a germinação. Todas as plantas foram crescidas em 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Após a expansão total dos eófilos, uma nova seleção das plantas foi realizada,

nesta, 90 plantas foram escolhidas dentre as mais semelhantes e posteriormente transferidas para condição de claro constante. Após três dias em condições constantes iniciamos a coleta do material vegetal.

A coleta consistiu da retirada, pesagem e congelamento em nitrogênio líquido (com posterior transferência para ultra-freezer) dos cotilédones, eófilos e metafilos de três indivíduos a cada ponto em um total de 24 pontos ao longo de 3 dias (coletas a cada 3 horas).

Posteriormente as amostras de cotilédones e eófilos foram secas em liofilizador e trituradas em moinho de bola. Os metafilos, devido à pequena quantidade de material vegetal, foram triturados em nitrogênio líquido, evitando perdas no moinho de bola. Com o material triturado, 10 mg de cada amostra foram pesados e transferidos para micro-tubos.

Os açúcares solúveis foram extraídos através do acréscimo de 1,5 ml de etanol 80% para cada 10mg de amostra, posteriormente transferidas para 20 minutos de banho a 80°C, seguido de 20 minutos de centrifugação a 14000 rpm, o sobrenadante foi coletado e o processo repetido por três vezes no resíduo sólido, para garantir a completa extração dos açúcares das amostras.

Os sobrenadantes coletados foram secos em SpeedVac, para total retirada do álcool, e ressuspensos em 1ml de água Milli-Q. Em seguida executamos uma partição com 500µl de clorofórmio. O que garantiu que somente açúcares solúveis restassem na porção aquosa.

A dosagem dos açúcares foi executada a partir do acréscimo de 0,5ml de fenol e 2,5 ml de ácido sulfúrico em 50µl de amostra diluída em 450µl de água Milli-Q. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 490 nm.

Avaliação da Atividade Enzimática

O procedimento de cultivo e coleta do material vegetal deste experimento foi o mesmo executado para os açúcares solúveis.

As amostras vegetais foram pesadas, trituradas em nitrogênio líquido e posteriormente homogeneizadas em tampão Tris-HCl (pH 7,8) por 30 minutos a 4°C, visando a extração das enzimas. Seguiu-se a isso uma filtragem em dupla camada de nylon e centrifugação por 15 minutos a 4000 rpm, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -26°C. A atividade enzimática da β -galactosidase, foi determinada a partir da metodologia adaptada de Tiné *et al.*, 2000.

A determinação da atividade da β -galactosidase foi executada pela adição de 10 μ L de extrato, 10 μ L de p-nitrofenil- β -galactopiranosídeo (p-NP- β -Gal) e 10 μ L de tampão McIlvaine e incubação a 40°C por 10 minutos. A reação foi parada pela adição de 2 mL de Na₂CO₃ 0,1N, e a absorbância lida a 405nm. A dosagem da concentração protéica em cada extrato foi feita a partir do método de Bradford, 1976, e utilizado para determinar a atividade específica de cada extrato.

Resultados

Cadeia de transporte de elétrons e assimilação de carbono

A análise dos parâmetros relacionados à fotossíntese foi fundamental para compreender o sistema de coordenação temporal em jatobá. Isso porque, a aquisição destes dados, diferentemente dos demais parâmetros analisados neste trabalho, pode ser tomada de forma não destrutiva. Esta característica é de fundamental importância para estudos cronobiológicos, uma vez que, coletas destrutivas exigem trabalhos com populações de plantas e todas as variações interindividuais envolvidas.

Com isso, o objetivo destes experimentos foi a caracterização destes processos em livre curso, visando definir se as variações entre indivíduos impossibilitaria trabalhar com populações. No entanto, o objetivo final do estudo dos parâmetros relacionados à fotossíntese é mais complexo, estando diretamente ligado à produção de açúcares e seu delicado equilíbrio na relação fonte-dreno de uma plântula em desenvolvimento.

Assim, para entendermos melhor a relação temporal envolvida na produção de açúcares pela fotossíntese e posteriormente a interação fonte-dreno presente no jogo entre exportação dos açúcares provenientes das reservas armazenadas nos cotilédones, e a produção e exportação de derivados da fotossíntese, tínhamos inicialmente que identificar os mecanismos temporais que controlam estes processos.

A própria produção autotrófica de açúcares pode ser subdividida em dois processos principais, a captação de energia luminosa e sua posterior transferência para formação de açúcares. Estes dois processos são parcialmente independentes, podendo ocorrer captação de energia independente de sua fixação na forma de açúcares.

Baseado neste mecanismo de funcionamento, no qual a cadeia de transporte de elétrons pode funcionar independente do ciclo de Calvin, propusemos como hipótese que estes dois processos seriam controlados por dois osciladores diferentes que estariam acoplados.

Seguindo essa linha de raciocínio, o primeiro experimento foi desenhado para analisarmos as variações entre indivíduos e ao mesmo tempo definir qual condição luminosa seria mais adequada (escuro ou claro constante), apresentando dados sobre a cadeia de transporte de elétrons e o ciclo de Calvin.

Pra tal, foi analisado um grupo de 10 plantas, para cada condição luminosa, por 6 dias. Nos 3 primeiros dias essas plantas foram submetidas à condição luminosa de 12 horas em claro e 12 horas em escuro (C/E), e posteriormente transferidas para claro constante (C/C) ou escuro constante (E/E) por mais 3 dias.

Este experimento permitiu verificar a estabilidade do ritmo em diferentes condições de iluminação e também a capacidade de manutenção do ritmo após 3 dias em condições constantes, ou seja, verificar se o ritmo não amortece, se os indivíduos não se dessincronizam e qual condição luminosa seria a mais adequada para os experimentos posteriores.

Neste experimento foi verificado qual seria a idade ideal para trabalharmos com as plantas. Isto porque, todos os experimentos deveriam ser realizados dentro de um intervalo restrito, no qual as plântulas ainda possuíam cotilédones funcionais e já faziam fotossíntese.

Portanto, duas idades foram padronizadas e testadas, a primeira sendo definida como imediatamente após a expansão do primeiro par de folhas (eófilos), e a segunda sendo dez dias após a expansão dos eófilos. Cada teste foi executado com uma subpopulação de 5 indivíduos.

Os dados apresentados são derivados apenas das plantas aferidas logo após a expansão dos eófilos. Isto porque as plantas medidas em um estágio de desenvolvimento mais avançado acabam por perder os cotilédones antes do início da condição constante.

As figuras 9 e 10 mostram o comportamento das trocas gasosas de eófilos logo após a expansão foliar, apenas as plantas as quais não perderam os cotilédones (devido à idade ou manuseio) foram aferidas. A interrupção nos gráficos encontrada no segundo dia de análise se deve a uma falha no equipamento (LI6400) que impossibilitou a tomada deste ponto.

Figura 9: Acompanhamento de seis dias das trocas gasosas em eófilos recém expandidos de *Hymenaea courbaril*. Três primeiros dias em fotoperíodo 12C/12E e três últimos dias em claro constante.

Figura 10: Acompanhamento de seis dias das trocas gasosas em eófilos recém expandidos de *Hymenaea courbaril*. Três primeiros dias em fotoperíodo 12C/12E e três últimos dias em escuro constante.

Observou-se que a assimilação de carbono nos eófilos apresentou ritmo mesmo em condições constantes, o que é uma indicação da existência de controle circadiano envolvido neste processo.

Nota-se ainda, que as plantas mantidas em claro constante apresentaram atividade elevada de assimilação de gás carbônico, o que não ocorre nas plantas mantidas em escuro constante. Isso provavelmente é resultado da hiperativação do sistema pela ação direta da luz, a qual atua principalmente sobre os complexos antena, mais especificamente nos LHCs, impedindo sua completa inativação. O processo inverso ocorreria na condição de escuro constante, na qual a ação tônica da luz está ausente.

Apesar dos ciclos de assimilação serem mantidos tanto em escuro como em claro constante, é notável o fato de que a fotossíntese em C/C tem seus vales de atividade se aproximando das taxas máximas diárias. Isso demonstra um papel muito importante da sinalização direta da luz na fotossíntese.

Foi observado também, que a transição da fase arrastada (12C/12E) para o livre curso (condição constante) gera uma pequena perda de

sincronismo entre indivíduos. Isto é esperado, uma vez que cada indivíduo apresenta osciladores com períodos ligeiramente diferentes dos demais indivíduos, o que pode se tornar um problema nas análises populacionais.

No entanto, muito mais preocupante é a disparidade encontrada entre amplitudes nos ritmos dos indivíduos, caso a variação interindividual seja maior que a variação gerada pelo ciclo endógeno, podemos não encontrar ritmo algum, mesmo considerando-se que este processo seja controlado circadianamente.

Somando-se à variação da amplitude e períodos entre indivíduos, ainda temos como preocupação o amortecimento advindo de organismos mantidos em condições constantes. O amortecimento faz com que a amplitude do ritmo diminua gradualmente, o que pode dificultar ainda mais a identificação de um ritmo. Este processo é particularmente pronunciado nas plantas submetidas ao escuro constante.

Os padrões analisados em condições constantes permitiram definir a condição de escuro constante como menos permissiva, sendo assim pouco recomendável para um trabalho populacional. Isso fica mais claro ao se analisar os dados de condutância estomática (Figuras 11 e 12), todos os dados foram coletados com base no mesmo equipamento (LI 6400).

Figura 11: Acompanhamento de seis dias da condutância estomática em eófilos recém expandidos de *Hymenaea courbaril*. Três primeiros dias em fotoperíodo 12C/12E e três últimos dias em claro constante.

Figura 12: Acompanhamento de seis dias da condutância estomática em eófilos recém expandidos de *Hymenaea courbaril*. Três primeiros dias em fotoperíodo 12C/12E e três últimos dias em escuro constante.

As Figuras 11 e 12 apresentam dados de condutância estomática, revelando que este processo também cicla em condições constantes. A condutância estomática e a assimilação tem padrões muito similares, sendo que a assimilação e a condutância em claro constante nunca chegam ao zero. Isso poderia estar relacionado diretamente à necessidade de captação CO_2 gerada pela ativação constante do ciclo de Calvin.

Pode-se ainda destacar a intrincada relação entre assimilação de gás carbono e condutância estomática, ao analisarmos em paralelo o comportamento dos dois processos em uma mesma planta (Figura 13).

Verificamos nesta figura uma relação de fase constante entre ambos os processos, a qual se mantém mesmo em livre curso, o que indica que tais processos devem ser controlados pelo mesmo sistema oscilatório (a planta 7 foi pega como exemplo, uma vez que tal fenômeno se repete para todas as plantas analisadas com igual clareza).

Figura 13: Acompanhamento de seis dias da condutância estomática e fotossíntese (assimilação de CO₂) da planta 7, três primeiros dias em 12C/12E e três últimos dias em C/C.

No entanto, o trabalho de Hennessey e Field de 1992 demonstra uma independência entre os ritmos em livre curso da condutância e assimilação, além de apontar a possibilidade de estes processos serem controlados por dois osciladores diferentes. Se assim for, os osciladores que controlam ambos os processos devem ser fortemente acoplados, mantendo uma relação de fase estável em livre curso.

Experimentos com uma maior duração em condições constantes podem ser capazes de separar osciladores acoplados. Entretanto, se os osciladores mantiverem um acoplamento muito forte, condições

constantes podem não ser suficientes para enfraquecer a relação presente entre os osciladores.

Assim, seria interessante verificar como se comportariam dois osciladores mais fracamente acoplados que se dessincronizassem. Partindo da hipótese de que o ciclo de Calvin e a cadeia de transporte de elétrons poderiam ser controlados por dois osciladores diferentes, resolvemos analisar como esses dois parâmetros se comportam e condições constantes.

Muitas variáveis podem marcar a atividade da cadeia de transporte de elétrons, a maioria delas estando associada ao fotossistema II (sendo este o mais usado para análises na cadeia como um todo). Inicialmente pensamos em trabalhar com um parâmetro puro, ou seja, que fosse medido diretamente, independente de cálculos posteriores. No entanto, plantas com amplitude do sinal de fluorescência baixa, como no caso gerado pelo amortecimento, perdem muito rapidamente sua expressão rítmica.

Este evento deve estar relacionado à capacidade de leitura do equipamento, o qual passa a trabalhar muito próximo ao limiar de precisão, misturando medidas reais com ruído. Assim sendo, a utilização de uma razão entre componentes aferidas simultaneamente pode eliminar ou minimizar o ruído, uma vez que padrões repetidos em ambas as variáveis serão desconsiderados após uma divisão simples, revelando medidas mais acuradas.

Este fato pode ser ilustrado pela Figura 14, na qual uma planta em processo de amortecimento é analisada com base em medidas derivadas da fluorescência do fotossistema II (planta 17, esta planta foi escolhida por apresentar um pronunciado processo de amortecimento). As medidas de F_m' e F_v' sozinhos, acabam por perder rapidamente a expressão do ritmo, no entanto, a razão entre elas apresenta ritmo reconhecível. Isso

possibilita que analisemos a cadeia de transporte de elétrons por mais tempo. O que se torna importante em experimentos mais longos ou em condições de maior estresse para a planta.

Figura 14: Comparação dos ritmos de fv'/fm' , fv' e fm' de uma mesma planta (planta 17), três primeiros dias em C/E e três últimos dias em E/E.

Os dados de fluorescência, portanto, foram baseados na relação Fv'/Fm' , para todas as plantas analisadas neste primeiro experimento. Como esperado, a capacidade máxima de captação de luz também manteve um ciclo marcado em condições constantes. Os padrões encontrados são muito semelhantes ao comportamento dos ritmos anteriormente analisados (Figura 15 e 16), levantando dúvidas sobre a possibilidade de um controle temporal independente do controle da assimilação de carbono.

Figura 15: Acompanhamento de seis dias da fluorescência (F_v'/F_m') do fotossistema II em eófilos recém expandidos de *Hymenaea courbaril*. Três primeiros dias em fotoperíodo 12C/12E e três últimos dias em claro constante.

Figura 16: Acompanhamento de seis dias da fluorescência (F_v'/F_m') do fotossistema II em eófilos recém expandidos de *Hymenaea courbaril*. Três primeiros dias em fotoperíodo 12C/12E e três últimos dias em escuro constante.

Caso a cadeia de transporte de elétrons fosse controlada independentemente do ciclo de Calvin, seria esperado que o padrão cíclico da capacidade máxima de captação de elétrons (F_v'/F_m') se dessincronizasse com relação ao ritmo na assimilação de carbono, ou seja, que estes não mantivessem uma relação de fase estável entre eles.

A comparação entre os dois ritmos, no entanto, não nos apresenta evidências claras deste processo de dessincronização. A figura 17

apresenta ambas as curvas em um mesmo gráfico. O que se pode notar é que apesar de um pequeno deslocamento do pico de fixação de carbono com relação ao pico da eficiência máxima na captação de elétrons, não podemos definir uma clara alteração no período de ambos (a planta 7 foi escolhida por ilustrar claramente as características discutidas, apesar de todas as plantas apresentarem o mesmo padrão).

Figura 17: Acompanhamento de seis dias da fluorescência (F_v'/F_m') do fotossistema II e fotossíntese (assimilação de CO_2) de uma mesma planta (planta 7), três primeiros dias em C/E e três últimos dias em C/C.

Este deslocamento de picos pode ser apenas um indicativo do surgimento de uma nova relação de fases entre os dois ritmos quando em condições constantes, uma vez que não vemos uma alteração marcada no período dos ritmos, indicando que estes podem ser controlados por um mesmo sistema oscilatório. Por outro lado, esta alteração poderia marcar o início de uma separação lenta entre dois osciladores. Se estes osciladores apresentarem períodos muito próximos entre si, seriam necessários vários dias para identificarmos esta alteração.

Os resultados anteriores nos permitiram identificar diversos padrões importantes para darmos continuidade a este trabalho. Notou-se que seria necessária uma análise baseada em um experimento com maior número de

dias em condições constantes. Este novo experimento apontaria com mais clareza se a cadeia de transporte de elétrons seria ou não controlada independentemente do ciclo de Calvin, assim como gerar dados que corroborassem ou não a hipótese anteriormente levantada por Hennessey e Field.

O experimento seguinte, portanto, foi realizado ao longo de nove dias em luz constante, de acordo com as condições mais permissivas verificadas no primeiro experimento.

No entanto, a medida aferida para monitorar a cadeia de transporte de elétrons foi modificada. A utilização do rendimento quântico da cadeia de transporte de elétrons (ϕ_{psII}) apresenta as mesmas vantagens as quais são atribuídas à medida da eficiência máxima de captação de elétrons, ao que diz respeito aos ruídos, e é uma medida mais representativa do comportamento da cadeia como um todo, ficando menos restrita ao máximo da eficiência de captação de elétrons fotossistema II, e abrangendo também o número de centros de reação abertos.

O comportamento desta nova componente fisiológica apresentou padrão muito similar ao encontrado em todas as plantas analisadas, em claro constante, no experimento anterior. Além disso, em alguns casos, apresentou ritmo mais bem definido que o próprio F_v'/F_m' , como exemplificado pela planta 8 na figura 18.

Figura 18: Acompanhamento de seis dias da eficiência máxima de captação de elétrons do fotossistema II (F_v'/F_m') e rendimento quântico do fotossistema II (Φ_{psII}) de uma mesma planta (planta 8), três primeiros dias em C/E e três últimos dias em C/C.

Este novo experimento foi baseado em uma população de dez plantas, e inicialmente a população foi analisada como um todo, tomando como base a média ponto a ponto entre todas as plantas. Este método foi possível devido à normalização dos dados de todas as plantas para valores entre 0 e 1, eliminando assim o problema de diferentes amplitudes. O motivo de inicialmente analisarmos as plantas como uma população era a possibilidade de uma posterior comparação com os dados dos experimentos que envolvessem coletas destrutivas.

A análise populacional produziu dados que refutaram claramente nossa hipótese inicial de que há dois sistemas temporalmente independentes. A rígida relação de fase presente entre o rendimento quântico e a assimilação de carbono apontou a existência de um mesmo sistema oscilatório que controlaria todos os processos envolvidos na fotossíntese (Figura 19).

Figura 19: Acompanhamento ao longo de nove dias da assimilação de gás carbônico (A) e rendimento quântico do fotossistema II (ϕ psII). Dados, normalizados para um intervalo entre 0 e 1, relativos à média de uma população de 10 indivíduos.

Isso fez com que novamente nos voltássemos para a análise do F_v'/F_m' , uma vez que este processo apontava para uma possível dessincronização no primeiro experimento. Assim como, não era descartada a hipótese de apenas a eficiência de captação de elétrons ser controlada por um sistema oscilatório independente.

Novamente obtivemos uma relação de fase estável. A assimilação e eficiência máxima de captação de elétrons apresentam o mesmo período e o deslocamento dos picos das atividades apontados no primeiro experimento se mostrou apenas como uma nova relação de fase estável (Figura 20).

Figura 20: Acompanhamento ao longo de nove dias das assimilação de carbono (A) e eficiência máxima da captação de elétrons do fotossistema II (Fv'/Fm'). Dados, normalizados para um intervalo entre 0 e 1, relativos à média dos dados de uma população de 10 indivíduos.

Apesar de estes dados não corroborarem a hipótese inicial, ainda não foi possível abandoná-la, isso porque, o trabalho foi realizado com uma população de plantas. Sabe-se que, a sincronização de osciladores depende do período e da força de acoplamento entre os mesmo. Estas características são variáveis entre indivíduos, assim sendo, devemos antes analisar os indivíduos separadamente. A dessincronização pode ser um processo com baixa incidência em uma dada população, caso os osciladores sejam fortemente acoplados. Ao fazermos a média ponto a ponto desta população podemos perder informações com menor ocorrência.

Uma predição da hipótese da dessincronização interna espontânea é que, uma vez que dois osciladores inicialmente acoplados têm este acoplamento enfraquecido, o período de um dado ritmo deve ser diferente do período do mesmo ritmo em um organismo que ainda apresente acoplamento entre osciladores. Isso se deve ao fato de o acoplamento entre osciladores ter como resultado um período único, refletido nas componentes fisiológicas aferidas, sendo este período o resultado da interação entre os períodos dos osciladores individuais.

Assim, para verificar se em alguma planta existiria um evento de dessincronização interna espontânea, comparamos os valores normalizados da assimilação de carbono de todas as plantas individualmente com a curva dos valores normalizados da média de todas as plantas, buscando diferenças nos períodos analisados. Encontramos, com isso, quatro das dez plantas analisadas com pequenas variações nos períodos, quando comparados ao período da curva gerada com base na média de todos os indivíduos. A figura 21 apresenta a planta com a maior discrepância encontrada.

Entretanto, isso não seria suficiente para afirmar que realmente existiria mais de um oscilador em processo de dessincronização interna. A própria variabilidade entre indivíduos poderia gerar o mesmo padrão apresentado na figura 21. Porém, esta análise nos apontou na população, quais seriam os indivíduos mais prováveis de apresentarem uma dessincronização, possibilitando uma busca direcionada.

Figura 21: Dados relativos à média de assimilação de carbono de uma população sincronizada (azul) e uma única planta dessincronizada (preto). Dados normalizados para um intervalo entre 0 e 1.

Com isso, analisamos a assimilação de carbono em comparação ao F_v'/F_m' destas quatro plantas. No entanto, observou-se o mesmo padrão anteriormente encontrado. Não foram encontradas diferenças entre os períodos destas componentes, indicando que tanto a assimilação quando a

eficiência máxima de captação de elétrons são controladas por um único sistema oscilatório, ou seja, todas as plantas apresentam o mesmo comportamento do apresentado na figura 22.

Figura 22: Dados de eficiência máxima da captação de elétrons do fotossistema II adaptado à luz (F_v'/F_m') e assimilação de carbono (A). Dados de uma única planta normalizados para um intervalo entre 0 e 1.

Contudo, a comparação entre o rendimento quântico e a assimilação de carbono, mostra um padrão um pouco diferente nessas quatro plantas. Não foram encontradas, relações de fase estáveis entre estes dois ritmos. Indicando a possibilidade de um sistema de controle temporal composto por mais de um oscilador, como ilustrado pela figura 23.

Figura 23: Acompanhamento ao longo de nove dias das assimilação de carbono (A) e rendimento quântico do fotossistema II (ϕ_{psII}). Dados de uma única planta normalizados para um intervalo entre 0 e 1.

Tanto a eficiência quântica quanto a eficiência máxima de captação de elétrons são processos associados ao fotossistema II e refletiriam o comportamento da cadeia de transporte de elétrons. Apesar disso, a comparação entre estes ritmos apresentou clara diferença (Figura 24), revelando para uma relação de fase instável. Isso sugeriu a evidência de um novo oscilador controlando este sistema. Devemos notar, no entanto, que a eficiência quântica tem como componente, em seu cálculo, a eficiência máxima de captação de elétrons e o número total de centros de reação abertos (qP). Assim sendo, foram subtraídos dos valores normalizados de ϕ_{psII} os valores normalizados de qP e em seguida estes foram comparados aos valores normalizados de F_v'/F_m' (Figura 25).

Figura 24: Acompanhamento ao longo de nove dias do rendimento quântico do fotossistema II (ϕ_{psII}) e eficiência máxima da captação de elétrons do fotossistema II adaptado à luz (F_v'/F_m'). Dados de uma única planta normalizados para um intervalo entre 0 e 1.

Novamente é clara a relação de fase entre os ritmos, demonstrando que o sistema de marcação temporal que controla o número de centros de reações abertos também seria componente do controle da eficiência quântica.

Tomando por base as figuras 25 e 26, conclui-se que, se assumirmos que qP e Fv'/Fm' sejam, cada um, controlados por um único oscilador, o ritmo da eficiência quântica seria controlado por apenas dois osciladores. No entanto, tal afirmação não é possível sem um amplo estudo destas componentes, o que sugere que $\phi psII$ é controlado por pelo menos dois osciladores distintos.

Com isso, podemos apresentar em um mesmo gráfico as componentes Fv'/Fm' e qP , como mostrado na figura 27, revelando claramente dois processo cíclicos os quais não apresentam relação de fase estáveis entre eles. Sendo assim, podemos concluir que a própria cadeia de transporte de elétrons está sob o controle de pelo menos dois osciladores distintos.

Figura 27: Acompanhamento de nove dias do número de centros de reações abertos (qP) e eficiência máxima da captação de elétrons do fotossistema II adaptado à luz (Fv'/Fm'). Dados de uma única planta normalizados para um intervalo entre 0 e 1.

A comparação entre o ritmo do número de centros de reação abertos com a eficiência quântica nos revela uma relação de fase estável

(Figura 28). Assim, apesar de ϕ_{psII} ser uma componente tanto de F_v'/F_m' quanto de qP , é fortemente influenciado por qP , ao passo que apenas perturbações tênues podem ser atribuídas ao F_v'/F_m' . Sendo assim podemos inferir que o oscilador que controla qP controla mais fortemente o ritmo da eficiência quântica quando comparado ao oscilador que controla a eficiência máxima de captação de elétrons.

Figura 28: Acompanhamento de nove dias do rendimento quântico do fotossistema II (ϕ_{psII}) e número de centro de reações abertos (qP). Dados de uma única planta normalizados para um intervalo entre 0 e 1.

Isto posto, reanalisamos os dados colhidos no primeiro experimento, desenhando a partir dele as curvas geradas pela variação do número de centros de reação abertos em comparação ao padrão encontrado para F_v'/F_m' . Notavelmente, mesmo em um intervalo curto de tempo em condições constantes (três dias), foi possível vislumbrar a separação entre os dois ritmos em duas das quatro plantas em claro constante. A figura 29 apresenta uma dessas plantas, é notória a velocidade da alteração do comportamento de qP . Sendo necessário apenas um ciclo em condições constantes para este se dessincronizar em relação ao F_v'/F_m' .

Figura 29: Dados de eficiência máxima da captação de elétrons do fotossistema II adaptado à luz (F_v'/F_m') e número de centros de reações abertos (qP). Dados de uma única planta normalizados para um intervalo entre 0 e 1.

Os dados anteriormente mostrados nos permitem construir uma imagem parcial do sistema que controlaria temporalmente a fotossíntese. Entretanto, não fomos capazes de encontrar nenhuma evidência que apontasse para a existência de dois osciladores distintos controlando a assimilação e as trocas gasosas respectivamente. No entanto, isso não significa que tais osciladores não existam, podendo ser apenas uma indicação de que o acoplamento entre eles seja forte o suficiente para impedir um processo de dessincronização interna.

Assim sendo, poderíamos forçar a separação entre ambos osciladores, caso esses existam. Para isso, precisaríamos de um segundo ciclo ambiental capaz de arrastar os osciladores em questão, ou ao menos um deles. Portanto, desenhamos um novo experimento visando testar o ciclo de temperatura como um agente arrastador.

Este experimento consiste de uma inversão gradual, mas completa da fase do ciclo de temperatura com relação ao ciclo inicial de claro/escuro. Após isso, foram tomados três dias de medidas de condutância estomática e assimilação de carbono. Para verificarmos se o resultado encontrado não seriam devido a um processo de mascaramento

as plantas foram transferidas para condições constantes e mais três dias de medida foram tomados (Figura 6, desenho experimental, e 30, resultados).

Figura 30: Dados de assimilação de carbono (preto) e condutância estomática (azul) ao longo de seis dias, três primeiros dias ciclo de temperatura e luz constante, três últimos dias temperatura e luz constantes. Média entre todos os indivíduos (5 plantas), dados normalizados entre 0 e 1, de uma população.

Estes dados mostram que o ciclo de temperatura pode, também, ser um agente arrastador para os ciclos testados. No entanto, vemos uma clara diferença entre os ciclos de condutância e assimilação. O ciclo de assimilação amortece rapidamente, tanto em comparação ao ciclo de assimilação como em comparação aos resultados dos experimentos anteriores, podendo indicar um arrastamento mais fraco.

Com base nessas diferenças encontradas, e assumindo que o ciclo de temperatura seja um arrastador mais fraco que o ciclo claro/escuro, para condutância estomática, poderíamos desenhar um experimento no qual confrontássemos ambos os ciclos, forçando assim uma separação de possíveis osciladores.

Sabendo que a assimilação e a condutância respondem diferentemente à temperatura, desenhamos um experimento no qual diminuísimos a força do ciclo de luz e aumentamos a força do ciclo de temperatura. Assim, esperávamos encontrar um balanço em que o ciclo de luz fosse forte o suficiente para arrastar o oscilador que controlaria a

condutância e fraco o suficiente para permitir que o ciclo de temperatura arrastasse o oscilador que controlaria a assimilação.

Para isso, o ciclo de luz foi reduzido a dois pulsos de uma hora de luz no início e final do dia e o ciclo de temperatura foi o mesmo utilizado no experimento anterior. O ciclo de temperatura foi gradualmente deslocado, com relação ao ciclo de claro escuro, até ficarem diametralmente opostos. Três dias de medidas foram então executados, em seguida as plantas foram transferidas para condições constantes e novamente foram coletados dados ao longo de três dias (Figura 7, desenho experimental, 31, resultados).

Para garantir que mudanças bruscas na relação de fase entre ciclo ambiental e endógeno não fosse um problema, as mudanças nas fases do ciclo ambiental foram mais lentas. Escolhemos deslocar a fase do ciclo de temperatura, uma vez que o ciclo de claro/escuro estava enfraquecido e mudanças nas relações de fase poderiam fazer com que o oscilador endógeno se desacoplasse deste ciclo e respondesse a um marcador mais forte, no caso o ciclo de temperatura.

Figura 31: Dados de assimilação de carbono (preto) e condutância estomática (azul) ao longo de seis dias. Áreas cinzas representam escuro (E) áreas brancas representam claro (C), linha vermelha representa variações na temperatura. Média entre todos os indivíduos (5 plantas) normalizados de uma população.

Podemos notar que as plantas ficaram arrítmicas, apenas uma das plantas apresentou ritmo (na assimilação de carbono) (Figura 32). O aumento na assimilação de carbono que vemos no meio do gráfico deve estar relacionado à transferência das plantas para claro constante.

Os dados deste experimento são pouco informativos, e não permitem quaisquer conclusões sobre o sistema oscilatório envolvido no processo. Muito provavelmente o ocorrido se deve ao conflito entre dois ciclos ambientais com mesma força de arrastamento. Sem um referencial de qual ciclo seguir, as plantas tentam responder a ambos os ciclos, gerando um padrão arrítmico.

Figura 32: Dados de assimilação de carbono (preto) e condutância estomática (azul) ao longo de seis dias. Áreas cinzas representam escuro (E) áreas brancas representam claro (C), linha vermelha representa variações na temperatura. Dados de uma única planta normalizados entre 0 e 1.

A planta da figura 32, no entanto, mostra uma condutância estomática arrítmica e uma fotossíntese rítmica (porém fracamente marcada). A assimilação seguiu o ritmo da temperatura, mas devido à falta de ritmo da condutância não podemos afirmar que são dois processos controlados por osciladores distintos, apesar de ainda existir esta possibilidade.

Figura 34: Dados de eficiência máxima da captação de elétrons do fotossistema II adaptado à luz (F_v'/F_m'), assimilação de carbono (A), rendimento quântico do fotossistema II (ϕ_{psII}), Condutância estomática (Cond) e número de centros de reações abertos (qP). Dados de uma única planta normalizados para um intervalo entre 0 e 1.

Concentração de clorofila (SPAD)

Para avaliação da concentração de clorofila no eófilo, utilizamos um medidor manual de clorofila (SPAD), no entanto, este equipamento nos fornece uma medida relativa de clorofila. Para correlacionarmos os valores obtidos pelo SPAD com a concentração real de clorofila, fizemos extrações de clorofila utilizando o método de Porra *et al.*, 1989, utilizando discos foliares previamente medidos com SPAD e correlacionando com a concentração de clorofila obtida por espectrofotometria, apresentado na Figura 35.

Figura 35: Dados relativos à medidas com SPAD e extração de clorofilas totais de um mesmo disco foliar.

Com esta relação estabelecida, um experimento inicial constituído de medidas ao longo de 72 horas (sendo cada uma das medidas tomadas sempre em uma mesma região da folha) foi executado. Todos os dados foram tomados em claro constante, escuro constante ou 12 horas claro / 12 horas escuro.

No caso das plantas em condições constantes, as medidas só foram tomadas após um pré-tratamento de 3 dias nas condições propostas pelos experimentos (claro ou escuro constantes). Este pré-tratamento eliminaria medidas em uma fase de pós efeito muito marcado.

Como as plantas apresentam grande variação interindividual nas concentrações de clorofila, os graficos unindo todas as plantas da população analisada não é de fácil leitura. Para facilitarmos a compreensão destes todos os valores foram normalizados.

Figura 36: Acompanhamento de dez plantas ao longo de 72 horas da concentração de clorofila em Claro/Escuro, dados normalizados entre 0 e 1.

Em condições de arrastamento fica evidente o ciclo da concentração de clorofila nas plantas, com o pico de sua concentração ocorrendo no meio da fase de claro (Figura 36). Esta mesma condição pode ser vista com maior clareza na figura 37, onde os dados de todas as plantas foram compilados em uma única curva a partir das médias ponto a ponto.

Figura 37: Acompanhamento ao longo de 72 horas da concentração de clorofila em Claro/Escuro, média entre todas as plantas, dados normalizados entre 0 e 1.

No caso das plantas mantidas em condições constantes, tornasse difícil identificar um padrão claro de ritmicidade quando todas as plantas analisadas são plotadas em um mesmo gráfico (Figuras 38 e 39). Provavelmente, devido à uma perda na amplitude do ritmo, gerada por uma longa exposição às condições constantes.

Figura 38: Acompanhamento de dez plantas ao longo de 72 horas da concentração de clorofila em escuro constante, dados normalizados entre 0 e 1.

Figura 39: Acompanhamento de dez plantas ao longo de 72 horas da concentração de clorofila em claro constante, dados normalizados entre 0 e 1.

Assim sendo, estes dados ficam mais fáceis de serem analisados com base em curvas geradas a partir da média dos dados de todas as plantas (Figuras 40 e 41).

Figura 40: Acompanhamento ao longo de 72 horas da concentração de clorofila em escuro constante, média entre todas as plantas, dados normalizados entre 0 e 1.

Figura 41: Acompanhamento ao longo de 72 horas da concentração de clorofila em claro constante, média entre todas as plantas, dados normalizados entre 0 e 1.

Estes gráficos apresentam evidências de uma periodicidade pouco marcada. Ao analisarmos as três condições concomitantemente, evidenciamos uma inversão de fases entre plantas arrastadas e em livre curso (Figura 42). Esta inversão pode ser decorrente da mudança nos períodos dos ritmos quando em livre curso, o que, ao longo do tempo, acarreta um deslocamento contínuo das fases quando comparados a um ritmo arrastado.

Figura 42: Acompanhamento ao longo de 72 horas da concentração de clorofila em Claro/Escuro (C/E), claro constante (C/C) e escuro constante (E/E), média entre todas as plantas, dados normalizados entre 0 e 1.

Com isso, um novo experimento foi proposto, eliminando o pré-tratamento e acompanhando as plantas por seis dias, a partir do dia o qual estas foram transferidas para condições constantes. Este novo experimento foi executado apenas em claro constante, o que possibilitaria a tomada de medidas ao longo de um maior intervalo de tempo, além de facilitar uma posterior comparação com os dados adquiridos no experimento 9 dias (o qual acompanhou os parâmetros relacionados diretamente com o transporte de elétrons e assimilação de carbono).

Os dados de seis dias de coleta, executadas a cada três horas, (condição de luz e temperatura constantes) em uma população de cinco plantas, foram normalizados e o valor médio da população foi plotado no gráfico da figura 43.

Figura 43: Média dos dados normalizados de concentração de clorofila (SPADs) de uma população de 5 plantas, referentes a seis dias de coleta em claro constante, intervalo de coleta de três horas.

Observamos a existência de um ciclo que persiste ao longo dos seis dias de experimento. No entanto, nota-se que este ritmo não amortece como normalmente ocorre com os outros ritmos, mas ao contrário, se torna cada vez mais marcado

Para entendermos o padrão encontrado basta analisar a linha de tendência em nosso gráfico (Figura 43). A linha revela que do início ao final do experimento as plantas ainda não atingiram um patamar estável de concentração de clorofila. Ou seja, apesar de as plantas já estarem com os eófilos totalmente expandidos, pode ser que ainda não apresentem sua concentração final de clorofila.

Para tentarmos entender as diferenças encontradas ao compararmos as plantas em condições constantes às plantas submetidas à um ciclo claro/escuro, plotamos em um mesmo gráfico, os seis primeiros dias do experimento de nove dias e os dados do experimento de seis dias da concentração de clorofila (Figura 44).

Figura 44: Média dos dados de assimilação de carbono (A) dos primeiros seis dias do experimento nove dias e média dos dados de concentração de clorofila (SPAD), médias de duas populações distintas. Dados normalizados para um intervalo entre 0 e 1.

Podemos notar que, mesmo nos primeiros dias de experimento já existe uma inversão de fase entre os dados de assimilação e concentração de clorofila. Isso indica que a hipótese de que esta inversão se daria devido à diferença entre períodos gerada pelo livre curso do oscilador é pouco provável.

Assim sendo, a maior concentração de clorofila durante o dia em uma planta submetida a um ciclo claro/escuro se deve a uma sinalização direta do ambiente. Sendo que o controle circadiano neste caso apresenta uma tendência diferente.

Essa tendência pode ser explicada por uma necessidade evolutiva, quando em um ambiente com alta luminosidade, o início e o final do dia são os dois momentos em que a planta estaria submetida às menores concentrações de luz e, portanto, as fases de maior necessidade de altas concentrações de clorofila. Assim como o meio do dia é o momento de maior intensidade de luz, e sendo a clorofila passível de fotodegradação, seria um momento crítico em termos de gasto de energia para manter uma

Figura 46: Esquema do controle por um conjunto de osciladores sendo arrastados pelo ambiente, osciladores representados pelos círculos coloridos, cores diferentes representando osciladores diferentes. Linhas pontilhadas representam dúvidas no sistema. Espessura da linha representa a força da interação.

Figura 47: Esquema do controle por um conjunto de osciladores (círculos coloridos representam osciladores, cores diferentes osciladores diferentes) em livre curso e com acoplamento enfraquecido em um evento de dessincronização interna espontânea. Linhas pontilhadas representam dúvidas no sistema. Espessura da linha representa a força da interação.

Sabemos que, quando acoplados por um arrastador, a resposta do controle endógeno é gerada por uma interação entre todos os osciladores envolvidos no sistema. Não sabemos, no entanto, se este sistema de controle é composto por dois ou três osciladores. Porém, fica clara a existência de no mínimo dois mecanismos de marcação temporal independentes, os quais, em condições constantes, podem dessincronizar (apesar de esse evento não ser obrigatório), revelando diferentes níveis de influência sobre os diversos padrões envolvidos na fotossíntese.

Os dados relativos ao SPAD não nos permite definir o que ocorreria com a clorofila no caso de uma dessincronização interna, uma vez que nenhuma planta apresentou tal processo, mas ao mesmo tempo foi a componente que apresentou a maior resposta direta ao ambiente, indicando uma diferença ainda pouco entendida com relação às outras componentes.

Açúcares solúveis e atividade enzimática

Para este experimento foi necessária uma coleta destrutiva, sendo que cada ponto da curva é a resultante de uma composição de dados relativos a três plantas distintas. As plantas foram crescidas em condição luminosa de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, antes do início da coleta foram submetidas a um pré-tratamento de três dias de claro constante. Toda a coleta foi realizada em claro constante em intervalos regulares de três horas, sendo coletados cotilédones, eófilos e metáfilos.

A figura 48 apresenta os dados relativos à concentração de açúcares solúveis nos eófilos.

Figura 48: Variação da concentração de açúcares solúveis nos eófilos ao longo de três dias em claro constante, dados normalizados e baseados em coleta destrutiva, cada ponto sendo resultante da média entre três plants.

Podemos notar um ciclo de aproximadamente 24 horas na concentração de açúcares solúveis dos eófilos. Este ciclo era esperado, uma vez que todos os parâmetros relacionados à fotossíntese são cíclicos em condições constantes, conseqüentemente a produção de açúcares deveria ser cíclica.

Figura 49: Variação da concentração de açúcares solúveis nos eófilos e assimilação de carbono ao longo de três dias em claro constante, dados baseados em duas coletas distintas, sendo a coleta relativa aos açúcares destruída (cada ponto resultada média entre três plants). Os dados relativos à assimilação são relativos aos dias 4, 5 e 6 da coleta 9 dias. Dados normalizados para um intervalo entre 0 e 1.

A figura 49 nos mostra a relação entre a assimilação de carbono de uma população (dados do experimento 9 dias) e a concentração de açúcares solúveis nos eófilos. A comparação direta destes dois conjuntos de dados deve ser feita com cautela, uma vez que são populações e formas de coletas distintas. No entanto, fica evidente que para ambos as curvas o pico de atividade é o mesmo, assim como os períodos são muito similares. Não podemos, contudo, afirmar se estes processos são controlados pelo mesmo oscilador. Na verdade, não podemos nem ao menos definir se a

concentração de açúcares é apenas uma resposta aos ciclos relativos à fotossíntese ou se este seria diretamente controlado por um oscilador.

A curva relativa à concentração de açúcares solúveis nos cotilédones apresenta um ciclo menos evidente e com aparente período maior que 24 horas (Figura 50). A curta duração do experimento, no entanto, não nos permite afirmar com clareza o período deste ciclo.

Figura 50: Variação da concentração de açúcares solúveis nos cotilédones ao longo de três dias em claro constante, dados normalizados e baseados em coleta destrutiva, cada ponto sendo resultante da média entre três plants.

Os dados relativos à concentração dos açúcares solúveis nos metáfilos, no entanto, são mais intrigantes (Figura 51). Fica clara a existência de um ciclo ultradiano (ciclos com períodos menores que 24 horas), com período aproximadamente de 12 horas. Este evento não é completamente inesperado e pode ser explicado com base na composição de dois ritmos circadianos.

Figura 51: Variação da concentração de açúcares solúveis nos metáfils ao longo de três dias em claro constante, dados normalizados e baseados em coleta destrutiva, cada ponto sendo resultante da média entre três plants.

Como os metáfils ainda estão em expansão, estes constituem drenos do açúcar proveniente dos cotilédones e da fotossíntese. Portanto a concentração de açúcares no metáfilo é dependente dos ciclos das fontes. Com isto, caso as fontes apresentem uma relação de fase na qual os picos de liberação de açúcar sejam deslocados no tempo, podemos compor um modelo no qual os vales de concentração de açúcar de um órgão fonte seriam encobertos pelos picos na produção de açúcar do outro órgão fonte, gerando assim, um ritmo resultante de exportação de açúcar com período menor que 24 horas (Figura 52). Conseqüentemente, o ritmo de concentração de açúcar no órgão dreno também seria menor que 24 horas.

Figura 52: Esquema apresentando a composição de um ritmo ultradiano baseado em dois ritmos circadianos. Curva em vermelho representa o ritmo de concentração de açúcares solúveis no cotilédone. Curva em verde representa a concentração de açúcares solúveis nos eófilos. Banda preta representa as depressões na produção de açúcar, as quais são parcialmente perdidas quando analisamos o açúcar exportado (isso porque estas são mescladas aos picos de produção do outro órgão fonte). Curva roxa representa ritmo de exportação de açúcares, composto pela produção tanto do eófilo quanto dos cotilédones.

Caso o modelo anteriormente proposto seja verdadeiro, ao somarmos os valores normalizados das concentrações de açúcar solúveis dos cotilédones com os dos eófilos, deveremos obter picos ligeiramente deslocados no tempo (pequeno adiantamento) quando comparados os picos das concentrações de açúcares solúveis nos metáfilos (Figura 53).

Figura 53: Curva roxa representa a soma dos valores normalizados da concentração de açúcar nos cotilédones e eófilos. Curva amarela representa os valores normalizados da concentração de açúcar no metáfilo. Dados baseados em coleta destrutiva, cada ponto sendo resultante da média entre três plants.

Como podemos ver na figura 53, as curvas parecem seguir o padrão previsto pelo modelo. Em alguns momentos, no entanto, existem sobreposições exatas dos picos de concentração de açúcares das fontes e do dreno. Isto pode ser devido ao intervalo longo entre coletas, ou mesmo ao fato de estes dados serem adquiridos de uma população sujeita a variações entre indivíduos. Sendo provável que ambos os problemas ocorram concomitantemente.

Assim, a composição do padrão dos açúcares solúveis nos metáfilos é definida pela sobreposição de dois ritmos circadianos. O ritmo de concentração de açúcares nos eófilos está diretamente relacionado à assimilação de carbono. No entanto, nos cotilédones não podemos traçar a mesma relação, uma vez que os períodos apresentados são diferentes.

Portanto, resolvemos investigar a atividade da β -galactosidase, enzima chave no processo de mobilização de reservas em jatobá e diretamente relacionada com a produção de monossacarídeos (Figura 54).

Figura 54: Atividade enzimática de β -galactosidase ao longo de três dias em claro constantes, cada ponto é resultante da média de três plants. Dados normalizados para valores entre 0 e 1.

Podemos ver, por esta figura, que existe um aparente ciclo de atividade enzimática com período maior que 24 horas. Novamente, o desenho experimental da coleta e o pequeno número de dias de experimento tornam difícil uma conclusão mais precisa.

No entanto, a figura 55 nos sugere a existência de uma relação direta entre atividade enzimática e concentração de açúcares no cotilédono.

Figura 55: Curva rosa, dados normalizados de atividade enzimática de β -galactosidase ao longo de três dias. Curva vermelha, dados normalizados de concentração de açúcar solúvel nos cotilédones ao longo de três dias. Cada ponto do gráfico é resultante da média entre três plants.

Isto porque parece haver uma relação de anti-fase presente entre a atividade enzimática e a concentração de açúcares solúveis. Esse deslocamento de picos é esperado, uma vez que para a concentração de açúcares aumentar devemos antes ter um aumento na atividade enzimática, uma vez que a degradação de reservas é a responsável pela produção de açúcares livres nos cotilédones.

Portanto, com os dados apresentados não podemos afirmar se a concentração de açúcares solúveis está sendo diretamente controlada por um oscilador ou se um oscilador controlaria a degradação de reservas, por meio do controle da atividade enzimática, e este processo seria refletido em um ciclo de produção de açúcares.

A figura 56 apresenta um quadro geral das interações encontradas neste trabalho.

Figura 56: Esquema do controle por um conjunto de osciladores sendo arrastados pelo ambiente, osciladores representados pelos círculos coloridos. Linhas pontilhadas representam dúvidas no sistema. Setas pretas representam controle circadiano. Linhas roxas representam controle não circadiano. Espessura da linha representa a força da interação. Osciladores azul e verde, associados ao eventual controle independente de assimilação de carbono e condutância estomática. A interação entre estes dois osciladores controlaria F_v'/F_m' . Oscilador laranja controlando primordialmente o número de centros de reações abertos. Oscilador vermelho representa o possível oscilador que controlaria diretamente a atividade enzimática. Quando acoplados todos os osciladores agiriam em conjunto, sincronizando e mantendo a relação de fases entre todos os eventos fisiológicos.

Discussão

A natureza da composição e organização dos osciladores em plantas é assunto recorrente na cronobiologia vegetal. O modelo clássico de um sistema circadiano se baseia em uma estrutura de três partes. A primeira seria uma via de aferência, responsável pela percepção do meio ambiente, e pela transmissão das informações à segunda estrutura deste sistema, o oscilador. O oscilador seria o responsável por gerar a ritmicidade e marcar fases de ocorrência de processos fisiológicos. A informação do oscilador seria transmitida para o organismo através da terceira e última estrutura de um sistema circadiano, as vias de eferências (Harmer *et al.*, 2001).

Este modelo, no entanto, é pouco ilustrativo para plantas, pois, eferências e aferências se misturam com a própria maquinaria molecular que compõe o oscilador (McWatters *et al.*, 2000; Bognar *et al.*, 1999; Emery *et al.*, 1998).

Um modelo mais adequado da organização do sistema circadiano em plantas foi proposto por Roenneberg e Merrow, 1998, no qual este sistema é retratado como a sobreposição de múltiplas alças de retroalimentação, sendo que cada alça apresenta mais de uma função, sendo muitas vezes redundantes entre si.

No entanto, a divisão do sistema circadiano em três partes distintas e estanques apresenta vantagens didáticas e será utilizado para facilitar a discussão, com a ressalva de não estarmos trabalhando com um sistema altamente hierarquizado, ou seja, não foi encontrado um oscilador central com maior importância que os demais.

Na verdade, um alto índice de independência é visto em plantas. Em 2000, Thain e colaboradores, verificaram que órgãos diferentes de um

mesmo indivíduo poderiam ser dessincronizados. No entanto, trabalhos mais recentes apontam para certa interação entre estruturas mais amplas em plantas. O grupo do professor Nimmo verificou uma influência forte da parte aérea da planta sobre os osciladores presentes na porção radicular. Neste mesmo trabalho ainda foi levantada a possibilidade de a transdução da informação ser feita via sinais de açúcares (James *et al.*, 2008).

Trocas gasosas e fluorescência

Apesar de há muito sabermos que as plantas apresentavam múltiplos osciladores, aparentemente existe pouco acoplamento entre tecidos diferentes. Apenas em 1995 Kolar e colaboradores apresentaram evidências de interações entre mais de um oscilador atuando em um mesmo processo fisiológico. Naquele trabalho, foi identificada a existência de dois osciladores atuando na regulação gênica de CAB (chlorophyll a/b binding protein), sendo esta interação dependente do desenvolvimento do indivíduo (Kolar *et al.*, 1995). Posteriormente, em 2003, Michael *et al.*, fazendo uso de diferentes temperaturas, conseguiram identificar dois osciladores controlando a expressão gênica do CAB2 (chlorophyll a/b binding protein 2) e CAT3 (catalase 3) em plantas adultas.

Estes trabalhos foram o ponto de partida de nossa idéia de que a cadeia de transporte de elétrons e o ciclo de Calvin estariam sendo controlados por osciladores independentes.

A dissociação da cadeia de transporte de elétrons do ciclo de Calvin faria com que a cadeia entrasse em um evento cíclico de geração de ATPs. Estes dois processos se temporalmente independentes poderiam representar uma vantagem em termos de ganho de energia para uma planta limitada pelo ciclo de Calvin, mas com grande disponibilidade de luz.

Com base no fato de que CAB (também conhecida como LHC) é controlada circadianamente, assim como a enzima chave do ciclo de Calvin (Rubisco) também o é (McClung, 2000), foi proposta a hipótese de que estes processos seriam controlados por osciladores diferentes.

No entanto, (como apresentado pelas figuras 17, 20 e 22) nossa hipótese foi rejeitada. Não existe diferença entre o controle temporal da assimilação de carbono (aqui nos dando uma medida indireta do ciclo de Calvin) e da capacidade máxima de transporte de elétrons. Assim sendo, não foi encontrado um controle temporal independente para ambos os processos.

O que nos surpreendeu, no entanto, foi a constatação de que a própria cadeia de transporte de elétrons é controlada por mais de um oscilador (Figuras 24, 27 e 29). Este fato pode apresentar importante significado biológico, uma vez que a independência entre capacidade máxima de captação de elétrons e número de centros de reação abertos não são controlados por um mesmo oscilador, de forma que estes processos podem ser regulados independentemente.

Esta maior plasticidade dos fotossistemas é revertida em uma vantagem adaptativa quando consideramos o ciclo de vida útil das proteínas e pigmentos associados à captação de luz. Caso a captação de elétrons seja muito elevada, todas as estruturas associadas a esta função serão rapidamente danificadas. Assim, em um ambiente com luz abundante seria mais vantajoso manter uma capacidade de captação mais reduzida.

No entanto, reduzir a capacidade de captação de elétrons representa uma perda de energia importante. Uma resposta simples para contornar este problema é aumentar o número de estruturas associadas à captação luminosa.

Em um ambiente com pouca luz, por outro lado, a estratégia deve ser bem diferente. A planta deve lançar mão de todos os recursos disponíveis para maximizar a captação energética. Isso significa que todas as antenas disponíveis devem estar expostas e trabalhando com eficiência máxima.

Para que este comportamento modulável seja possível, é importante que exista um controle plástico destes eventos. Ou seja, caso qP e F_v'/F_m' fossem controlados por um único oscilador a geração de uma nova relação de fase entre estes eventos seria impossível, fazendo com que a planta fosse incapaz de ajustar antecipadamente sua maquinaria celular para condições luminosas distintas ao longo do dia ou do ano, o que acarretaria em perdas energéticas e fotodegradação de diversas estruturas.

Neste mesmo sentido seria positiva a independência entre a coordenação temporal da condutância estomática e a assimilação de carbono. Esta questão foi levantada no trabalho de Hennessey e Field de 1992, no qual estes autores demonstram a independência entre estes dois ritmos, ou seja, a existência de um não define a existência do seguinte. No entanto, apesar de não gerarem dados suficientes para afirmar que estes dois processos são controlados por osciladores independentes, apresentam essa possibilidade.

Na tentativa de elucidar o mecanismo de controle temporal envolvido no controle circadiano da condutância estomática e assimilação de carbono, desenhamos os experimentos ilustrados nas figuras 6 e 7. A utilização de ciclos de temperatura para identificação de diferentes osciladores já foi utilizada em outros trabalhos (Hennessey e Field, 1992; Michel et al., 2003), no entanto, não encontramos trabalhos em plantas que se utilizem de um fotoperíodo esqueleto com este propósito.

Elucidar o mecanismo de controle temporal da condutância e assimilação se mostrou particularmente importante na definição de quantos osciladores estariam realmente envolvidos no controle temporal da fotossíntese. Isso porque, não tendo os eventuais osciladores que controlariam condutância e assimilação se dissociado em nenhuma planta, mesmo nas internamente dessincronizadas, poderíamos estar trabalhando com um sistema de mais de dois osciladores com acoplamentos distintos.

Apesar de aparentemente sermos capazes de sincronizar diferentemente os ritmos de condutância e assimilação com um termoperíodo (Figura 30), não fomos bem sucedidos em confrontar o termoperíodo com o fotoperíodo esqueleto (Figura 31).

A falta de sucesso neste experimento pode ser associada à ocorrência de um evento de biestabilidade dos ritmos em questão. Este evento descreve a incapacidade do oscilador em definir a fase de atividade quando submetido a um fotoperíodo esqueleto que demarque fases de atividade e repouso muito similares (descrito por Pittendrigh, nunca publicado em forma de artigo) (Aschoff, 1981).

Assim sendo, em nosso caso, como a fase marcada como “claro” apresentava exatamente o mesmo número de horas da fase de “escuro”, tendo como referência apenas dois pulsos de luz (figura 7), muito provavelmente provocamos uma instabilidade em nosso sistema.

Este problema pode ter sido maximizado pelo baixo grau de acoplamento entre os osciladores em plantas, isso porque, cada célula da folha, teoricamente, poderia definir uma fase distinta de estabilidade, somando-se a isso o ciclo de temperatura imposto, acabamos gerando uma resultante arrítmica.

Na única planta que apresentou alguma ritmicidade (Figura 32), podemos notar uma tendência geral de dois picos distintos de atividade em um mesmo dia, uma durante o “claro” e outro durante o “escuro”. Isso

pode ser devido à partição dos osciladores em fases de atividade distintas, o que revelaria dois picos de atividades em oposição de fase.

No entanto, esta planta parece não ter respondido ao ciclo de temperatura, uma vez que o ritmo mais marcado foi o de assimilação de carbono, o qual se esperava que respondesse melhor à temperatura.

Com estes resultados não podemos concluir a natureza deste controle temporal. Novos experimentos, levando em consideração a possibilidade de biestabilidade, são necessários. Entretanto, a falta de resposta ao ciclo de temperatura, quando confrontado a um ciclo de luz, mesmo que fraco, levanta a dúvida se existiria mais de um oscilador envolvido no processo.

Mesmo que realmente existam mais osciladores, estes só poderão ser distinguidos se uma nova condição experimental for proposta, tomando por base tanto o ciclo de temperatura (que se mostrou pouco eficiente) como o ciclo de luz, para garantir dados mais conclusivos.

Concentração de clorofila

As medidas de concentração relativa de clorofila formam um grupo de dados complementares ao estudo da fotossíntese como um todo, principalmente quando abordado o sistema de captura de luz dos fotossistemas. Inicialmente esperava-se apenas encontrar uma correlação entre o ritmo de concentração de clorofila e os dados de fluorescência.

No entanto, já no primeiro experimentos encontra-se um padrão inusitado no comportamento da clorofila quando submetida a um ciclo de claro/escuro e condições constantes (Figura 42). Dependendo da condição luminosa a concentração de clorofila pode modificar seu pico de concentração. Apesar de apresentar um componente de controle temporal endógeno (o qual parece ser o mesmo sistema oscilatório que controla a

assimilação em plantas não dessincronizadas (Figura 44)) este pode ser suplantado por uma componente ambiental.

Assim, a concentração de clorofila parece permitir ajustes extremos através de mascaramento, um contraste claro entre a coordenação temporal distinta da cadeia de transporte de elétrons. Isso levanta a dúvida de porque dois processos tão contrastantes (coordenação temporal por dois osciladores distintos e mudança na fase devido ao mascaramento) seriam selecionados para coordenar eventos associados?

A figura 43 pode conter a resposta. Quando esta figura foi apresentada, foi proposto que o conteúdo total de clorofila ainda não atingira seu máximo, isso realmente pode ser verdade. No entanto, o SPAD não apresenta uma medida direta da concentração da clorofila, como este equipamento se utiliza de feixes de luz para aferir a concentração da clorofila, acaba gerando uma medida da clorofila exposta à luz, não da concentração absoluta da folha.

Assim sendo, ao que parece, a produção de clorofila acompanha a curva apresentada pela figura 43, porém, a exposição da clorofila é controlada primordialmente por sinais ambientais, o que mascara a expressão circadiana do ritmo. Este processo intrincado de controle garante que a planta possa se adiantar às mudanças do meio e ao mesmo tempo apresentar respostas rápidas e agudas a estímulos diretos.

Concentração de açúcares solúveis e atividade enzimática

Os açúcares solúveis são particularmente importantes na construção de um quadro geral da coordenação temporal da disponibilidade de recursos para os órgãos dreno. Estes podem nos apresentar dados sobre a produção e translocação dos recursos na planta. Para isso, fizemos medidas nos dois órgãos fonte (eófilos e cotilédones) e em um dreno forte para a plântula (metáfilos), cabe lembrar que estes

dados separadamente são pouco informativos e devem sempre ser considerados em comparação direta.

Observamos uma interação ente dois ritmos circadianos gerando um ritmo ultradiano na concentração de açúcares no metáfilo (Figuras 52 e 53). No entanto, não podemos definir se a concentração de açúcares nos cotilédones é realmente um ciclo circadiano ao um ciclo simples (ciclo gerado independentemente do relógio biológico). Isso ocorre devido ao pequeno número de dias analisados e a um período aparentemente maior que 24 horas.

Mesmo assim, podemos apontar como pouco provável a existência de um controle circadiano direto na concentração de açúcares solúveis no cotilédone. Seria mais plausível que o controle circadiano esteja atuando nas enzimas responsáveis pela degradação das reservas, e a liberação de açúcares seja um resultado indireto deste componente circadiano.

Por outro lado, a própria concentração de monossacarídeos nos cotilédones é um sinal para a inativação das enzimas de degradação, mais especificamente a β -galactosidase (Tin *et al.*, 2000; Buckeridge *et al.*, 2000). Assim, impossvel afirmar, com os dados apresentados este trabalho, se a concentrao de acares nos cotildones, ou mesmo a atividade de β -galactosidase, sejam controlados diretamente pelo relgio.

O fato de tanto a atividade enzimtica quanto a concentrao de acares solveis no cotildones apresentarem perodos aparentemente distintos de todos os perodos encontrados nos outro ritmos, pode apontar para a coordenao temporal de um novo oscilador. No entanto, no podemos fazer tal afirmao sem mais estudos.

Os dados de concentrao de acares nos efilos, no entanto, parecem apresentar maior concordncia com os dados dos ritmos associados fotossntese das plantas sincronizadas (Figura 49). Isso indica que estes devem ser controlados pelo mesmo sistema osciltorio.

Considerações finais

Neste trabalho nos deparamos com uma intrincada rede de controle, a qual pode apresentar tanto controles endógenos quanto respostas diretas ao ambiente. O interessante desta rede, no entanto, é a diferença no grau de plasticidade dos diferentes processos. A clorofila apresenta uma alta plasticidade para respostas diretas ao ambiente, já a cadeia de transporte de elétrons apresenta uma plasticidade quanto a dissociação de seus osciladores e a geração de novas relações de fase. As concentrações de açúcares dos cotilédones podem apresentar uma gama de respostas tanto endógenas quanto respostas diretas. O importante é que como resultante temos um aporte quase contínuo de açúcares nos metáfilos em um dos momentos mais delicados para a planta.

A existência de osciladores múltiplos e comunicantes não se restringe a maximizar o ganho energético diário da planta. A marcação temporal anual, apesar de menos intuitiva, pode passar por esses osciladores. A relação entre os ângulos de fase entre dois osciladores associada a um sinal ambiental direto, como, por exemplo, um limiar de temperatura, podem disparar respostas sazonais (Michel et al., 2003). Este modelo de marcação temporal é conhecido como *Coincidência Interna*, e tem como base um deslocamento lento e gradual da relação de fase entre dois osciladores ao longo do ano (Pittendrigh e Bruce, 1959).

Em nosso caso, demonstramos a existência de pelo menos dois osciladores, o que já seria maquinaria suficiente para o funcionamento deste tipo de marcação temporal.

Conclusões

1. As trocas gasosas, a eficiência máxima de captação luminosa do fotossistema II adaptado à luz, a condutância estomática, o rendimento quântico, o número de centros de reação abertos e a concentração de clorofila são processos controlados circadianamente.
2. Podemos separar com certeza dois grupos de controle circadiano distintos, cada qual com maior influência em um conjunto de fatores.
3. Os ritmos de assimilação de gás carbônico e condutância estomática são passíveis de serem arrastados por ciclos de temperatura, apesar de apresentarem comportamentos distintos em relação à força do arrastamento.
4. Pode existir um terceiro sistema oscilatório, o que geraria um controle independente entre condutância e assimilação. Assim como pode existir um controle endógeno distinto coordenando a liberação de açúcares pelo cotilédone.
5. A concentração de clorofila no eófilo apresenta fases diametralmente opostas às fases das demais componentes analisadas, quando o sistema está sincronizado e em livre curso. No entanto, este ciclo pode ser fortemente mascarado pela exposição de clorofila em fases não marcadas circadianamente.
6. Eófilos totalmente expandidos ainda não apresentam conteúdo de clorofila estável, estando ainda em fase de aumento na concentração de clorofila.
7. A concentração de açúcares solúveis nos eófilos parece apresentar padrão de oscilação circadiano.
8. A concentração de açúcares solúveis nos metáfilos apresenta padrão de oscilação ultradiano definido pela sobreposição de dois ritmos circadianos.
9. A atividade de β -galactosidase pode ser a responsável pelo ciclo na concentração de açúcares nos cotilédones. No entanto, não podemos afirmar com clareza a natureza deste controle temporal.

Resumo

As plântulas de jatobá apresentam grandes quantidades de reserva de carbono, na forma de polissacarídeos constituintes de parede, presentes em seus cotilédones. Estas reservas são inicialmente utilizadas para expansão dos eófilos. Após esta fase, as plântulas passam a dispor de duas fontes de carbono, sendo elas, as reservas (que ainda não se esgotaram totalmente) e a autotrófica (compreendida pela fotossíntese) (Santos e Buckeridge, 2004).

O acompanhamento em condições constantes de diversas variáveis nos permitiu concluir que a maioria dos parâmetros envolvidos com a fotossíntese são controlados circadianamente. Este controle apresenta, ao menos, dois sistemas oscilatórios independentes, que atuam, quando sob um ciclo ambiental, em conjunto.

O controle da degradação das reservas é mais incerto, apesar de apresentarmos fortes evidências que apontam para a existência de um controle temporal endógeno.

Conseguimos identificar, em alguns casos, uma influência forte do ambiente agindo diretamente sobre a expressão de algumas variáveis, como a concentração de clorofila.

Por fim, desenhamos um quadro geral do controle temporal envolvido na questão fonte dreno (durante a fase de estabelecimento desta espécie), no qual, pudemos integrar os dados de todas as variáveis aferidas, definindo os principais mecanismos de controle envolvidos.

Abstract

Jatobá seedlings have large amounts of carbon reserves in the form of wall constituent polysaccharides, present in their cotyledons. These reserves are initially used in the expansion of the eophylls. After this stage, the seedlings have two sources of carbon, the reserves (which are not fully degraded yet) and autotrophic (understood as photosynthesis) (Santos and Buckeridge, 2004).

The constant conditions allowed us to conclude that most of the parameters involved in the photosynthesis process are circadian controlled. This control mechanism has at least two independent oscillatory systems, which are coupled when under the influence of an environmental cycle.

The nature of the temporal control of the reserves degradation is yet unclear. Although, evidences are that it's being controlled by an endogenous component.

We were able to identify, in some cases, a strong influence of the environment, acting directly on the expression of some variables (such as chlorophyll concentration).

Finally, we draw a general picture of the temporal control mechanism involved in the source-sink balance (during the establishment phase of this species), in which we were able to integrate all our data and therefore, identify some important control mechanisms involved.

Referências Bibliográficas

- Ahmad, M. (1999) Seeing the world in red and blue: insight into plant vision and photoreceptors. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 230-235.
- Amaral, L.I.V.; Santos, H.P.; Rossatto, D.R. & Buckeridge, M.S. (2011) Diurna changes in storage carbohydrate metabolism in cotyledons of the tropical tree *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). *Plant Physiology and Biochemistry* (submitted)
- Amaral, V.L.I. (2005) Metabolismo de Carboidratos Estruturais e de Reserva em Cotilédones de *Hymenaea courbaril* L.(jatobá). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Ascoff J. Handbook of Behavioral Neurobiology vol.4 Plenum Press (1981).
- Avers, C.J. (1985) *Molecular Cell Biology*. Addison-Wesley, Reading, MA.
- Baker, R.B. (2008) Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 89-113
- Blankenship, R.E. (2002) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford.
- Bognar, L.K.; Hall, A.; Adam, E.; Thain, S.C.; Nagy, F.; Millar, A.J. (1999) The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96, 14652±14657.
- Bolling, I. (1977) Different circadian rhythms regulate photoperiodic flowering responses and leaf movement in *Pharbitis nil* (L.) Choisy. *Planta* 135: 137-142.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Brandão, A.D.; Del Bem, L.E.V.; Vincentz, M. & Buckeridge, M.S. (2009) Expression pattern of four storage xyloglucan mobilisation related genes during seedling development of the rain forest tree *Hymenaea courbaril* L. *Journal of Experimental Botany* 60 (4): 1191-1206
- Bretzl, H. (1903) *Botanische Forschunen des Alexanderzuges*. Leipzig, Germany: B.G. Teubener.
- Briggs, W.R. & Olney, M.A. (2001) Photoreceptors in Plant Photomorphogenesis to Data. Five Phytochromes, Two

- Cryptochromes, One Phototropin and One Superchrome. *Plant Physiology* 125: 85-88.
- Buchanan, B.B.; Gruissem, W. & Jones, R.J. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Buckeridge M.S. & Dietrich S.M.C. (1990) Galactomannans from Brazilian legume seeds. *Revista Brasileira de Botânica* 13 (1): 109-112
- Buckeridge, M.S.; Cavalari, A.A.; Silva, G.B. (2008). Parede Celular. In: *Fisiologia Vegetal*, Gilberto B. Kerbauy (Ed.). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro Cap. 9: 165-181.
- Buckeridge, M.S.; Reid, J.S.G. (1994) Purification and properties of a novel β -galactosidase or exo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -galactanase galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Planta* 192: 502–511
- Buckeridge, M.S.; Rocha, D.C.; Reid, J.S.G. & Dietrich, S.M.C. (1992) Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savanna and forest populations. *Physiologia Plantarum* 86:145-151
- Buckeridge, M.S.; Santos, H.P.; Tiné, M.A.S. (2000) Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38 (1/2): 141–156
- Buckeridge, M.S.; Tiné, M.A.S.; Lima, D.U.; Santos, H.P. (2000) Mobilisation of 796 storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38 (797): 141-156.
- Bünning, E. (1931) Untersuchungen über die autonomen tagesperiodischen Bewegungen der Primärblätter von *Phaseolus multiflorus*. *Jahrb. Wiss. Bot.* 75: 439-480.
- Covington M. F., Panda S, Liu X. L., Strayer C. A., Wagner D. R., & Kay S. A. (2001) ELF3 Modulates Resetting of the Circadian Clock in *Arabidopsis* *The Plant Cell* 13, 1305–1315
- Covington, M.F.; Maloof, J.N.; Straume, M.; Kay, S.A. & Harmer, S.L. (2008) Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biology* 9: R 130.
- Cumming B.G. e Wagner E. (1968) Rhythmic processes in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 19: 381-416.
- Cumming, B.G. (1967) Circadian rhythmic flowering response in *Chenopodium rubrum*: effects of glucose and sucrose. *Canadian Journal of Botany*. 45: 2173-2193
- Devlin, P.F. & Kay, S.A. (2000). Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 12: 2499-2510.

- Ding, B. (1997) Cell-to-cell transport of macromolecules through plasmodesmata: a novel signaling pathway in plants. *Trends Cell Biol.* 7: 5-9.
- Duarte, H. M.; Jakovljevic, I.; Kaiser, F. & Lüttge, U. (2005) Lateral diffusion of CO₂ in leaves of the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana* Hamet et Perrier. *Planta* 220: 809-816.
- Dunlap, J.C.; Loros, J.J.; DeCoursey, P.J. (2004) *Chronobiology: Biological Timekeeping*. Ed. Sinauer Associates, Inc.
- Emery, P.T.; So, W.V.; Kaneko, M.; Hall, J.C. & Rosbash M. (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95: 669-79
- Enright J.T., (1970) Ecological aspects of endogenous rhythmicity. *Annual Review* 1: 221-238
- Foster, K.R. & Morgan P.W. (1995) Genetic regulation of development in *Sorghum bicolor*. IX. The ma3^R allele disrupts diurnal control of giberellin biosynthesis. *Plant Physiology* 108: 337-343.
- Gerhardt, K. (1993) Tree seedling development in tropical dry abandoned pasture and secondary forest in Costa Rica. *Journal of Vegetation Science* 4: 95-102.
- Green, B.R. & Durnford D.G. (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Plant Molecular Biology* 47: 685-714.
- Grossman, A.R.; Bhaya, D.; Apt, K.E.; Kehoe, D.M. (1995) Light-harvesting complex in oxygenic photosynthesis: Diversity, control, and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 29: 231-288
- Hall D.O. e Rao K.K. Photosynthesis. 6ed. Cambridge University Press 22-31, 1999.
- Hall, A.; Kozma-Bognar, L.; Toth, R.; Nagy, F.; Millar, A.J. (2001) Conditional circadian regulation of PHYTOCHROME A gene expression. *Plant Physiology* 127: 1808-1818.
- Harmer S.L. (2009) The Circadian System in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 357-377.
- Harmer, S. L.; Panda, S. & Kay, S. A. (2001) Molecular Bases of Circadian Rhythms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 215-53
- Harmer, S.L.; Hogenesch, J.B.; Straume, M.; Chang, H.S.; Han, B.; Zhu, T.; Wang, X.; Kreps, J.A. & Kay, S.A. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* 290: 2110-2113.
- Hennessey, T.L. & Field, C.B. (1992) Evidence of Multiple Circadian Oscillators in Bean Plants. *Journal of Biological Rhythms* 7(2): 105-113.

- Ievinsh, G. & Kreicbergs, O. (1992) Endogenous rhythmicity of ethylene production in growing intact cereal seedlings. *Plant Physiology* 100: 1389 – 1391.
- James, A. B.; Monreal, J.A.; Nimmo, G.A.; Kelly, C.L.; Herzyk Jenkins, P.G I., Nimmo H G. (2008) The Circadian Clock in Arabidopsis Roots Is a Simplified Slave Version of the Clock in Shoots. *Science* 322: 1832-1835.
- Kolar, C.; Ádám, É.; Schäfer, E. & Nagy, F. (1995) Expression of tobacco genes for light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins of photosystem II is controlled by two circadian oscillators in a developmentally regulated fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 2174-2178
- Kondo, T. (1982) Persistence of potassium uptake rhythm in the presence of exogenous sucrose in *Lemna gibba* G3. *Plant Cell Physiology*. 24: 659-665.
- Lee, Y.T.; Langenheim, J.H. (1975) A systematic revision of the genus *Hymenaea* (Leguminosae; Caesalpinioideae; Detarieae). *University of California Publications in Botany* 69: 1-109.
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C. Knapp M. (2005) How to correctly determine different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence deactivation rate R_{fd} of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43(3): 379-393
- Lumsden, P.J. & Millar, A.J. (1998) Biological Rhythms and Photoperiodism in *Plants*. Ed. BIOS Scientific Publishers Limited, UK.
- Machackova I., Chauvaux N., Dwitte W. E Onkelen H. (1997) Diurnal fluctuations in ethylene formation in *Chenopodium rubrum*. *Plant Physiology* v.113 : 981-985.
- Machackova I.; Chauvaux N.; Dwitte, W.E.; Onkelen, H. (1997) Diurnal fluctuations in ethylene formation in *Chenopodium rubrum*. *Plant Physiology* 113 : 981-985.
- Marques, N. & Menna-Barreto (2003) Cronobiologia: *Princípios e Aplicações*. 3 ed. Edusp: São Paulo, pág. 31-55
- Martin-Tryon EL, Kreps JA & Harmer SL. 2007. GIGANTEA acts in blue light signaling and has biochemically separable roles in circadian clock and flowering time regulation. *Plant Physiol.* 143:473–486
- Mas P, Alabadi D, Yanovsky MJ, Oyama T & Kay SA. (2003). Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:223–236
- McClung R.C. (2000) Circadian Rhythms in Plants: a Millennial view. *Physiologia Plantarum* 109: 359-371.

- McClung, R.C (2001) Circadian Rhythms in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 139-162.
- McClung, R.C (2006) Plant Circadian Rhythms. *The Plant Cell* 18: 792-803.
- McWatters, H.G.; Bastow, R.M.; Hall, A. & Millar, A.J. (2000) The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature* 408: 716–20
- Michael, T. P.; Salome, P. A. & McClung R. C. (2003) Two Arabidopsis circadian oscillators can be distinguished by differential temperature sensitivity . *PNAS* 100 (11): 6878-6883
- Michael, T.P. & McClung, C.R. (2003) Enhancer trapping reveals widespread circadian clock transcriptional control in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* 132: 629–639.
- Millar, A.J. (2004). Input signals to the plant circadian clock. *J. Exp. Bot.* 55: 277–283.
- Miller, A. J.; Straume, M.; Chory, J.; Chuan, N. H. & Kay, S.A.(1995) The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science* 267: 720-722.
- Moore-Ede, M.C.; Sulzman, F.M.; Fuller, C.A. (1982) *The Clocks that Time us: Physiology of the Circadian Timing System*. Cambridge, Harvard University Press.
- Morgan, P.W.; He, C.J.; Degreef, J.A. e Deproft, M.P. (1990) Does water deficit stress promote ethylene synthesis by intact plants? *Plant Physiology* 94: 1616 – 1624.
- Ouyang, Y.; Ersson, C.R.; Kondo, T.; Golden, S.S. & Johnson, C.H. (1998) Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8660-8664.
- Pittendrigh, C.S. (1960) Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems. *Cold Spring Harbor Symposium. Quanta. Bio.*, 25: 159-184
- Pittendrigh C. S. & Daan. S. (1976) A functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodents. *Journal of Comparative Physiology* 106: 223-252.
- Pittendrigh, C. S. & Bruce, V. G. (1959) in *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals*, ed. Withrow, R. B. (Am. Assoc. Advance. Sci., Washington, DC), pp. 475–505.
- Pullerits, T. & Sundström V. (1996) Photosynthetic light-harvesting pigments-protein complex: Toward understanding how and why. *Acc. Chem.* 29: 381-389.
- R.J. Porra, W.A. Thompson & P.E. Kriedemann (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic

- absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975: 384-394
- Robert, D. & Roland, J.C. (1998) *Biologie Végétale*. 2 Ed. V.1. Doin, Paris. 367pp.
- Roenneberg T. e Merrow M. (1998). Molecular circadian oscillators: an alternative hypothesis. *J. Biol. Rhythms* 13:167–79
- Rose, J.K.C., Braam J., Fry S.C., Nishitani K. (2002) The XTH Family of Enzymes Involved in Xyloglucan Endotransglucosylation and Endohydrolysis: Current Perspectives and a New Unifying Nomenclature. *Plant Cell Physiol* 43: 1421–1435.
- Santos, H.P. & Buckeridge, M.S. (2004) The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* L. under different light conditions. *Annals of Botany* 94: 819-830.
- Santos, H.P.; Purgatto, E.; Mercier, H., Buckeridge, M.S. (2004) The control of storage xyloglucan mobilisation in cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. *Plant Physiology* 135: 287-299.
- Schildknecht, H. (1983) Turgorins, Hormones of the Endogenous Daily Rhythms in Higher Organized Plants-Detection, Isolation, Structure, Synthesis, and Activity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22: 695-710.
- Simon, E.; Satter, R.L. S. Galston, A.W. (1976) Circadian rhythmicity in excised *Samanea pulvini*, I. Sucrose-white light interaction. *Plant Physiology* 58:417-420.
- Souza, R.P.; Valio, I.F.M. (1999) Carbon translocation as affected by shade in saplings of shade tolerant and intolerant species. *Biologia Plantarum* 42: 631-636.
- Strauss-Debenedetti S. & Bazzaz F.A. (1996) Photosyn-thetic characteristics of tropical trees along successional gradients. Pages 162-186 in S. S. Mulkey, R. L. Chazdon, and A. P. Smith, editors. Tropical forest. plant ecophysiology. Chapman and Hall, New York
- Taiz, L. & Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. 3ed: Artmed: Porto Alegre, pag. 339-364, 2004.
- Thain, S.C.; Hall, A.; Millar, A.J. (2000) Functional independence of circadian clocks that regulate plant gene expression. *Curr. Biol.* 951-956.
- Thomas, B. & Vince-Prue, D. (1997) *Photoperiodism in plants* (2nd ed). Academic Press, London.
- Tiné, M.A.S.; Cortelazzo, A.L. & Buckeridge, M.S. (2000) Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Plant Science* 154: 117-126.
- Toth, R.; Kevei, E.; Hall, A.; Millar, A.J.; Nagy, F.; Kozma-Bognar, L. (2001) Circadian clock-regulated expression of phytochrome and

- cryptochrome genes in Arabidopsis. *Plant Physiology* 127: 1607-1616.
- Van Grondelle, R; Dekker, J.P.S; Gillbro, T. & Sundström, V. (1994) Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochemistry Biophysics Acta* 1187:1-65.
- Viswanathan, N. & Subbaraj, R. (1983) Action of gibberelic-acid in plants-shifts of the circadian leaf-movement rhythm of a cotton plant, *Gossypium hirsutum*. *Can. J. Bot.* 61: 2527-2529
- Zhong, H.H.; Resnick, A.S.; Straume, M. & McClung, C.R.(1997) Effects of synergistic signaling by phytochrome A and cryptochrome 1 on circadian clock-regulated catalase expression. *Plant Cell* 9: 947-955.