

FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA a: CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS E APLICAÇÕES PRÁTICAS

E. Campostrini

Professor de Ecofisiologia Vegetal do Setor de Fisiologia Vegetal, Laboratório de Melhoria Genética Vegetal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 28015 620, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, e-mail: campost@uenf.br

Resumo

Nesta revisão, procurei relatar as informações mais avançadas sobre a fluorescência da clorofila, e tentei mostrar o grande potencial desta ferramenta nos estudos relacionados aos efeitos dos fatores do ambiente sobre o processo fisiológico em plantas. Inicialmente, faço um resumo sobre o processo fotoquímico, o qual serviu como base para descrever os conceitos básicos da fluorescência da clorofila. Posteriormente, na fluorescência não-modulada, relato a cinética da curva de Kautsky, explicando cada fase desta curva. No item fluorescência modulada, são descritas as análises dos dissipadores da fluorescência (*quenchings*) e os rendimentos quânticos efetivos e máximo do fotossistema II. No final, relato alguns protocolos de amostragem e descrevo algumas citações relacionadas ao uso da fluorescência como ferramenta avaliadora do estresse em plantas.

Símbolos

FFF: Fluxo de fótons fotossintéticos; Ph: Fotoquímica; Chl a: Clorofila a; Chl b: Clorofila b; NADP: Nicotinamida adeninina dinucleotídeo fosfato; NADPH₂: Nicotinamida adeninina dinucleotídeo fosfato reduzida; LHCII: Sistema coletor de luz do fotossistema II; PSII: Fotossistema II; PSI: Fotossistema I; P₆₈₀: Centro de reação do fotossistema II; Q_a: quinona a; Q_b: quinona b; PQ: Pool de plastoquinona; Cysts: citocromos; ATP: Trifosfato de adenosina; Fd: Ferredoxina; D: dissipação por calor; DCMU: 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia; F: Fluorescência; Z: resíduo de tirosina; FLM: Fluorímetro modulado; FLNM: Fluorímetro não-modulado; FM: Fluorescência modulada; FNM: Fluorescência não-modulada; F₀: Fluorescência inicial; F_m: Fluorescência máxima; F_v: Fluorescência variável; q: dissipação (*quenching*); q_p: dissipação fotoquímica (*quenching fotoquímico*); q_N: dissipação não-fotoquímica (*quenching não-fotoquímico*); NPQ: dissipação não-fotoquímica (*quenching não-fotoquímico*); Ph: dissipação pelo processo fotoquímico; F_v/F_m: φII_m: rendimento quântico máximo do PSII; ΔF/F_m: φII_e: rendimento quântico efetivo do PSII; ETR: taxa de transporte de elétrons; R_{fd}: razão de decréscimo da fluorescência; ΔpH: gradiente de prótons; e⁻: elétrons; F'_v/F'_m: Parâmetro de Genty

Introdução

Os pigmentos fotossintéticos (clorofilas (a+b) e carotenóides), localizados nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos, absorvem a energia luminosa que é utilizada no processo fotossintético. Quando uma luz branca incide sobre cada solução de clorofila, as clorofilas **a** (maior quantidade) e **b** (pigmento acessório) têm o ponto máximo de absorção dos fótons (λ_{\max}) na região de 428 e 660 nm (clorofila a) e na região de 452 e 641,8 nm (clorofila b), em éter dietílico, metanol e acetona 80% (Lichtenthaler, 1987). Estes pontos de λ_{\max} , os quais variam com o tipo de solvente utilizado, correspondem à região do azul e do vermelho, respectivamente (Lichtenthaler, 1987) (**Figura 1**). Este fato mostra que a luz verde que não é absorvida é refletida e transmitida, o que evidencia a coloração verde destes pigmentos. Esta luz verde refletida caracteriza a coloração verde das folhas. Ambas as clorofilas são componentes das membranas dos cloroplastos e ocorrem na razão clorofila a/clorofila b de aproximadamente 3 para 1 (Lichtenthaler et al, 1981). Plantas expostas a elevados fluxos de fótons fotossintéticos (**FFF**) apresentam razões clorofila a/b em torno de 3,2 a 4,0 e plantas crescendo em ambientes com reduzidos **FFF** possuem razões a/b em torno de 2,5 a 2,9 (Seybold e Egle, 1970).

As moléculas de clorofila absorvem a energia luminosa (fótons) e alteram temporariamente as suas configurações eletrônicas. Estes pigmentos passam do estado basal (**Chl a**) para o estado excitado (nível de energia mais alto), denominado de *singlet 1* (**Chl a***). Este estado excitado é muito instável e de vida muito curta ($\approx 10^{-8}$ s). Desta maneira, estes pigmentos fotossintéticos, após receberem a energia dos fótons, dissipam esta energia proveniente da luz por meio de três vias de dissipação (desexcitação) do estado excitado (estado de elevada energia). Estas três vias são assim denominadas:

- a) **Dissipação Fotoquímica (*Ph*)**: é a utilização da energia luminosa para os processos fotoquímicos da fotossíntese (doação do elétron proveniente da molécula de água para um aceptor denominado **NADP** (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato)). Este processo é a base da fotossíntese (**Figura 2**). Esta energia dissipada é usada para a formação do poder redutor e da molécula de ATP (Trifosfato de adenosina), os quais serão utilizados na fase bioquímica do processo fotossintético. Esta dissipação de energia é representada pelo *quenching* fotoquímico (q_P) (dissipador fotoquímico)

- b) **Fluorescência (F):** emissão de radiação na região do visível (vermelho e vermelho distante).
- c) **Dissipação Não-Fotoquímica (D):** é a produção de calor na forma de radiação infravermelha. Esta dissipação de energia é representada pelo *quenching* não-fotoquímico (q_N)(dissipador não-fotoquímico)

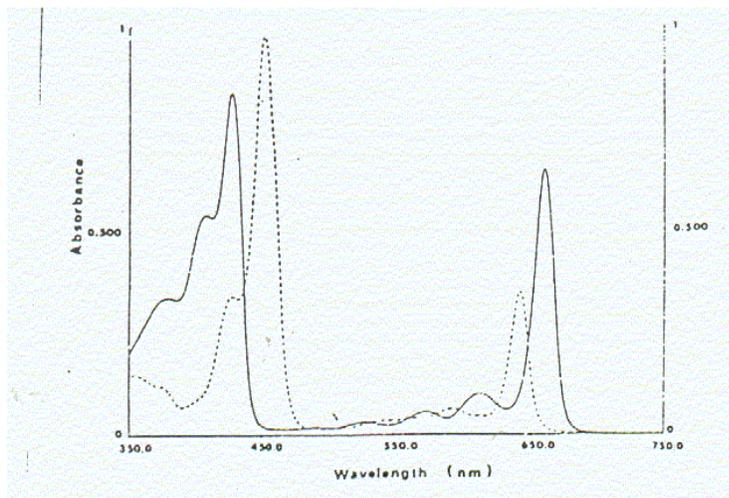


Figura 1. Espectro de absorção de uma solução de clorofila a (linha sólida) e de clorofila b (linha tracejada) em éter dietílico (solvente puro). (Lichtenthaler, 1987)

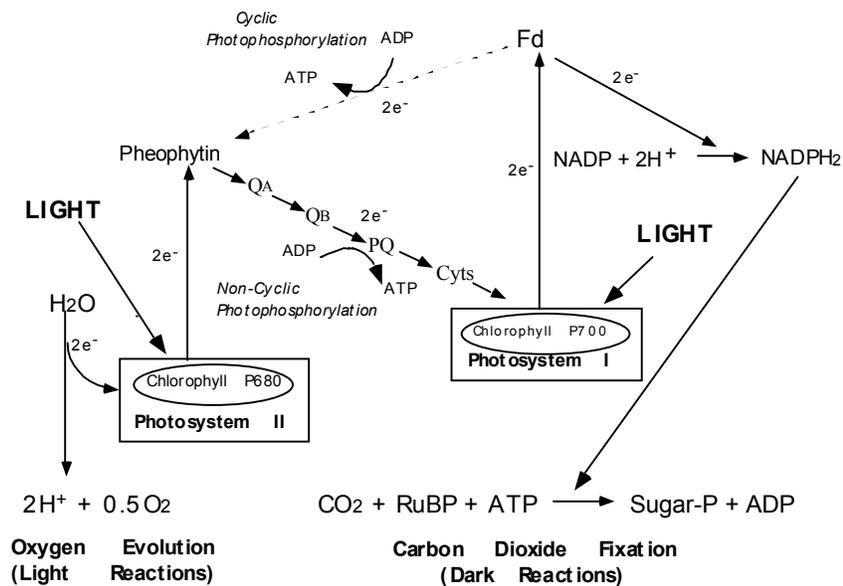


Figura 2. Esquema simplificado do processo fotossintético. Manual de instruções. Qubit System (Canadá).

a) Dissipação fotoquímica:

O processo fotossintético é a conversão da energia luminosa em energia química. Esta conversão é possível devido à sensibilidade das moléculas de clorofila à luz. Os sistemas de coleta de luz do fotossistema II (*Light-Harvesting Complex II – LHCI*) são compostos de numerosas moléculas de clorofilas aderidas a complexos protéicos que capturam a energia luminosa e a transferem para o centro de reação do fotossistema II (*PSII*). No centro do PSII, está localizada uma molécula de clorofila **a** especial denominada de P_{680} (λ_{\max} de 680 nm) e esta molécula torna-se excitada (P_{680}^*) quando recebe os fótons de luz (energia luminosa). Em condições ideais para o processo fotossintético, o elétron doado pela P_{680}^* reduz um aceptor primário denominado de feofitina (molécula de clorofila **a** desprovida do átomo de Mg), que então transfere o elétron para uma série de carreadores incluindo a Q_a , a Q_b , *pool* de plastoquinona (**PQ**) e os citocromos (**Cyts**). Esta transferência de elétrons está associada com a produção de um gradiente de prótons (H^+) transtilacoidal (ΔpH) entre o lúmen e o estroma no cloroplasto. Em relação ao estroma ($pH \approx 8,0$), as maiores concentrações de H^+ estão localizadas no lúmen ($pH < 4,0$) (Prezelin e Nelson, 1990). Este processo de formação do ATP proveniente do ΔpH é denominado fotofosforilação não-cíclica e requer cerca de 2 elétrons vindos de duas moléculas de P_{680} para a produção de ≈ 1 **ATP** (trifosfato de adenosina).

A partir do *PSII*, os elétrons (e^-) são transferidos para uma segunda molécula de clorofila **a** especial chamada P_{700} (λ_{\max} de 700 nm) que está localizada no centro de reação do fotossistema I (*PSI*). Concomitantemente à absorção da energia luminosa pelo *PSII*, o P_{700} absorve a energia luminosa e torna-se excitado (P_{700}^*), ou seja, um elétron desta molécula de clorofila **a** especial é elevado para um nível mais energético. Este fato permite que o P_{700}^* reduza a molécula de ferredoxina (**Fd**), a qual está relacionada com a redução do **NADP** para **NADPH₂**. O **NADPH₂** pode ser usado para a redução do CO_2 a triose fosfato no processo bioquímico da fotossíntese.

Quando o elétron liberado da molécula do P_{700} é usado para a redução do CO_2 , a molécula de P_{700} torna-se com carga líquida positiva. A neutralidade desta molécula é restabelecida pela passagem do elétron da molécula de P_{680} para o P_{700} . Em adição, a perda de um elétron deixa a molécula P_{680} com carga positiva e a neutralidade desta molécula é restabelecida pela molécula de água. A oxidação da molécula de água

provocada indiretamente pela energia luminosa produz o oxigênio que é liberado pelas folhas das plantas.

Como qualquer outro processo de troca de energia, a conversão da energia luminosa em energia química no processo fotossintético não é perfeita. Nem todos os elétrons que estão num nível energético elevado (molécula de clorofila excitada) é passado para os aceptores. Estes elétrons retornam ao estado inicial (estado antes das moléculas receberem a energia dos fótons), sem a produção de **ATP** e **NADPH₂**. Ao retornar ao estado inicial, a energia é dissipada em forma de calor ou luz (fluorescência):

A **Figura 3** mostra graficamente a distribuição da energia (Bolhàr-Nordenkampf e Öquist, 1993).

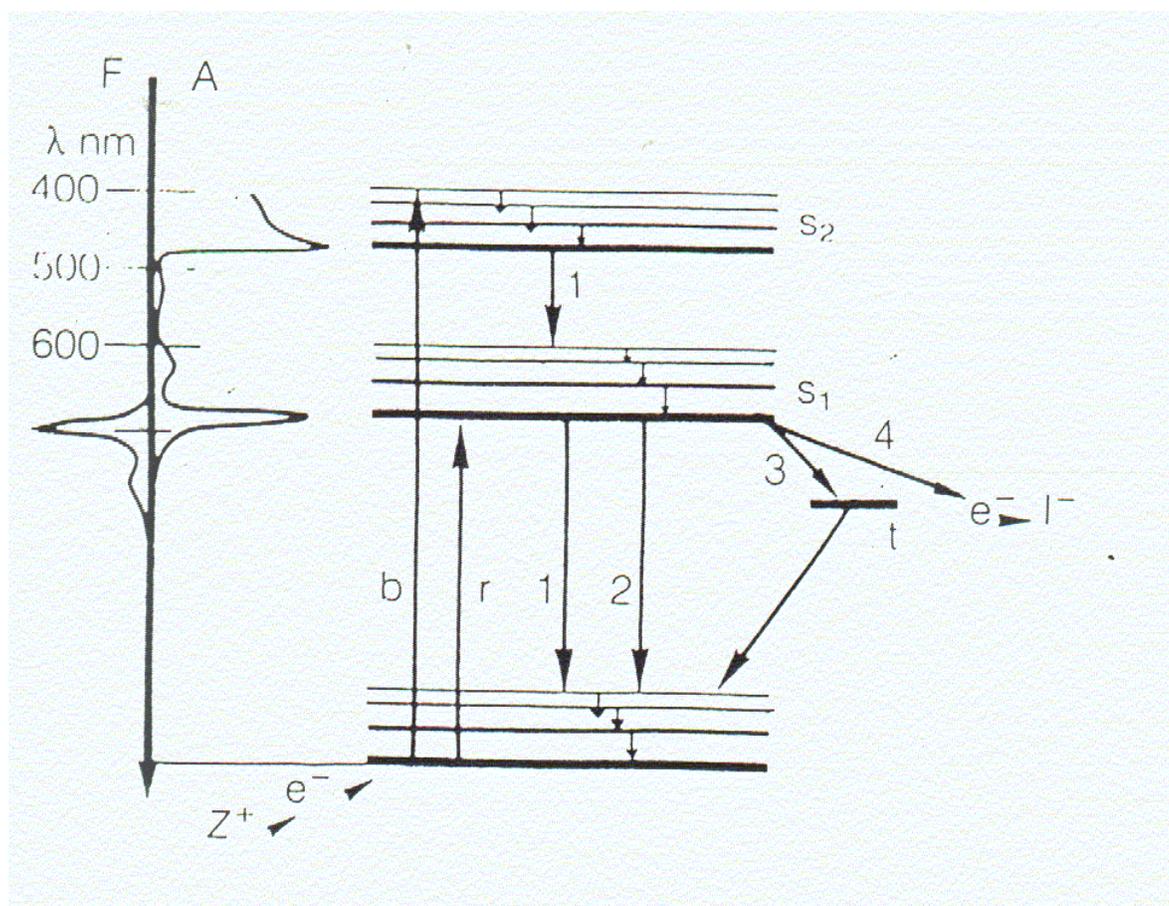


Figura 3. Diagrama do nível de energia da molécula de clorofila. F: espectro da fluorescência; A: espectro da absorvância; b: fóton de luz azul; r: fóton de luz vermelha; 1: conversão interna; 2: fluorescência; 3: sistema intermediário; 4: separação de cargas; I¹: aceitador intermediário do PSII; s₁, s₂: estados *singlets*; t: estado *triplet*; Z⁺: doador de elétrons do complexo de evolução do oxigênio (oxidação da molécula de água) (Bolhàr-Nordenkampf e Öquist, 1993)

b) Fluorescência:

Em temperatura ambiente (temperatura fisiológica, 20 a 25°C), a fluorescência é uma luz emitida e exibe um ponto máximo de emissão na faixa de 682 nm e outro ponto menos pronunciado em 740 nm (**Figura 4**) (Krause e Weis, 1994).

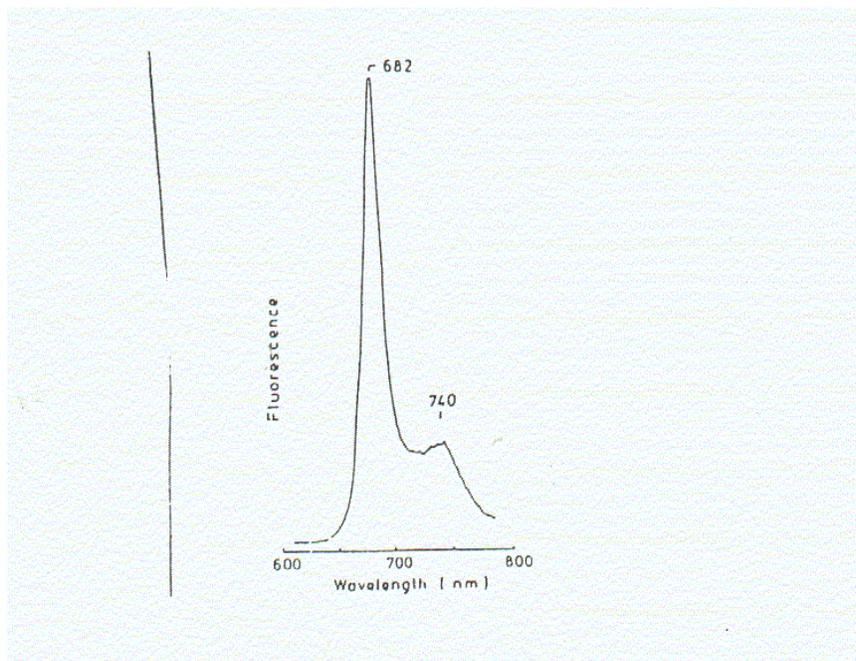


Figura 4. Espectro de emissão da fluorescência na temperatura ambiente de cloroplastos isolados intactos na presença de DCMU (2×10^{-5} M). A fluorescência foi induzida com 480nm de luz (Krause e Weis, 1994).

Ao contrário das temperaturas baixas (77 K ou -196°C), as quais são efetuados estudos teóricos da fluorescência (será discutido posteriormente), existe um consenso entre os cientistas de que na temperatura ambiente, a fluorescência da clorofila **a**, em sua maioria, é emitida pelo **PSII** e pelo Sistema Coletor de Luz do **PSII** (*Light-Harvesting Complex II - LHClI*). Entretanto, alguma contribuição na região dos comprimentos de onda maiores pode ser emitida pelo **PSI**. A emissão de fluorescência proveniente do PSI parece contribuir para a fluorescência inicial denominada de F_0 (Krause e Weis, 1984, Krause e Weiss, 1988).

Os três processos de dissipação da energia luminosa pelas moléculas de clorofilas (**Ph+F+D**) são competitivos, ou seja, alterações nas taxas fotossintéticas e na dissipação de calor causará alterações complementares na emissão da fluorescência. Sendo assim,

alterações na fluorescência podem mostrar a ausência ou presença de comprometimentos no processo fotossintético.

A relação entre os três processos é expressa matematicamente:

$$\text{Dissipação total da energia} = (Ph + F + D)n$$

Em que:

n= número de moléculas de clorofila

Na temperatura fisiológica, praticamente toda a fluorescência é proveniente das moléculas de clorofilas associadas ao **PSII**. As variações da fluorescência refletem o estado primário do **PSII**, o rendimento (ϕ_{PSII}) da fluorescência do **PSII** pode ser definido, sob iluminação constante (Bolhàr-Nordenkampf e Öquist, 1993), como:

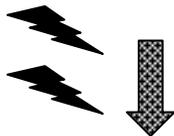
$$\phi = F/(Ph+F+D)$$

Esta equação matemática somente é aplicada se todos os centros de reação estão na forma ativa, ou seja, “abertos” (**Q_a** oxidada). Ver esquema a seguir.

Nas reações fotoquímicas primárias, o elétron vindo da molécula de água é transferido, via doador **Z** (resíduo de tirosina) para o pigmento **P₆₈₀** (clorofila **a** especial) o qual foi excitado pelos fótons (oxidante forte). Este pigmento especial doa o elétron para a feofitina e esta repassa o elétron ao acceptor **Q_a** (molécula de quinona). A saída do elétron do **PSII** é provocada pela forte oxidação do **PSI**. Estas informações supracitadas podem ser representadas pelo esquema a seguir (Krause e Weis, 1988):

$Z - P_{680} - \text{Feofitina} - Q_a - Q_b$
 (centro de reação aberto, Q_a oxidada) (após o período de adaptação no escuro)

Fóton de luz azul
e/ou vermelha



$Z - \underline{P680}^{e^-}$ (recebeu 1 fóton, molécula foi excitada, recebeu 1 elétron da molécula de água) – Feofitina – $Q_a - Q_b$



$Z - P_{680} - \underline{\text{Feofitina}}^{e^-} - Q_a - Q_b$



$Z - P_{680} - \text{Feofitina} - \underline{Qa}^{e^-} - Q_b$
 (centro de reação fechado, Q_a reduzida)



$Z - P_{680} - \text{Feofitina} - Q_a - \underline{Qb}^{e^-}$
 (centro de reação aberto) (Q_a oxidada)

Sob condição de baixa intensidade luminosa, em elevados rendimentos quânticos (quantidade molar de O_2 liberado ou CO_2 fixado por cada mol de fótons absorvidos pelo aparelho fotossintético), cerca de 97% da energia dos fótons absorvidos é usada no processo fotoquímico (produzir ATP e NADPH), 2,5% é transformada em calor e 0,5% é re-emitida como fluorescência (Bolhàr-Nordenkampf e Öquist, 1993). Entretanto, se os centros de reação estiverem fechados (Q_a reduzida), 95 a 97% da energia absorvida pode ser dissipada na forma de calor e 2,5 a 5,0% na forma de fluorescência (Bolhàr-Nordenkampf e Öquist, 1993). Esta fluorescência emitida pelo **PSII** pode ser detectada com um fotodetector, ou seja, um fotomultiplicador ou fotodiodo sensível aos comprimentos de onda na região de 680 nm. Entretanto, uma vez que o tecido fotossintetizante pode ser iluminado com uma luz branca, torna-se necessário separar uma considerável quantidade

de luz vermelha que poderá ser refletida do tecido que não seja a emitida como fluorescência. A **Figura 5a** mostra o esquema do funcionamento dos dois tipos básicos de fluorímetros encontrados no mercado: a) fluorímetro não-modulado (**FLNM**) e b) fluorímetro modulado (**FLM**).

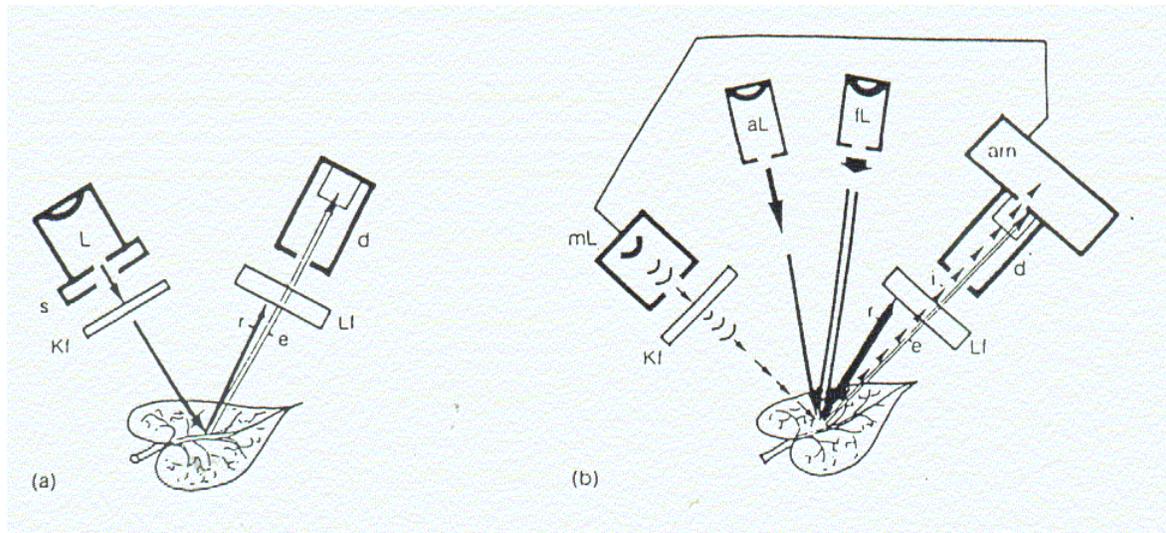


Figura 5. Esquema genérico de construção dos dois tipos de fluorímetros. a) sistema não-modulado. b) Sistema modulado. L: fonte luminosa (branca de halogênio ou luz provenientes de LED's vermelhos); aL: luz actínica branca; fL: pulso saturante de luz branca; d: detector; am: amplificador sincronizado com o pulso da fonte luminosa; Kf: filtro *Schott*, BG38, <680nm); Lf: filtro de banda longa (690, 710 e 730nm); r: luz branca refletida; e: fluorescência não-modulada emitida; i: fluorescência modulada (em forma de pulsos) emitida (Bolhâr-Nordenkampf e Ôquist, 1993)

b.1) Fluorescência não-modulada (FNM):

Quando um tecido fotossintetizante é iluminado, ele irá emitir fluorescência continuamente. Entretanto, a fluorescência contínua *per si* fornece poucas informações sobre os processos fisiológicos. A melhor maneira de obter informações a partir da emissão da fluorescência, é por meio de interpretações da cinética de emissão da fluorescência com o tempo. Os estudos com a fluorescência têm-se relacionados com as respostas da fluorescência quando um tecido fotossintetizante é rapidamente iluminado, após este tecido ter sido mantido no escuro por horas ou minutos. Na condição de escuro (centros de reação abertos) várias enzimas do Ciclo de Calvin tornam-se desativadas e devem ser ativadas pela luz. Ainda, os metabólitos produzidos no Ciclo de Calvin devem alcançar níveis apropriados para que a fixação do CO₂ possa ocorrer em taxas ótimas. Sendo assim, existe um “período de indução fotossintética” quando se efetua a rápida

transferência do tecido fotossintetizante da condição de escuro para a presença da luz. Neste período, a fixação do CO_2 é baixa.

Durante o período de indução fotossintética, os aceptores localizados nas membranas dos tilacóides estão aptos a receberem elétrons das moléculas excitadas pelos fótons. Entretanto, a fase bioquímica da fotossíntese não está ativa e nem otimizada. Como resultado, após a iluminação, o número de aceptores apto a aceitarem os elétrons, rapidamente reduz a zero, pois todos os sítios de redução estão ocupados em consequência da ativação da fase fotoquímica pela luz. Conseqüentemente, a energia absorvida pelas moléculas de clorofilas deve ser dissipada em fluorescência e em calor. Desta maneira, é esperado que a fluorescência deva ser elevada durante o período de indução fotossintética e, após este período, a emissão da fluorescência será reduzida. Esta redução na emissão da fluorescência é explicada, pois somente a partir de um determinado tempo de iluminação do tecido, as reações de fixação do carbono tornam-se ativas. A cinética desta resposta é denominada de curva de Kautsky (Kautsky e Hirsch, 1934) (**Figura 6**). A terminologia das variáveis da fluorescência foi reformulada e proposta por Kooten e Snel (1990).

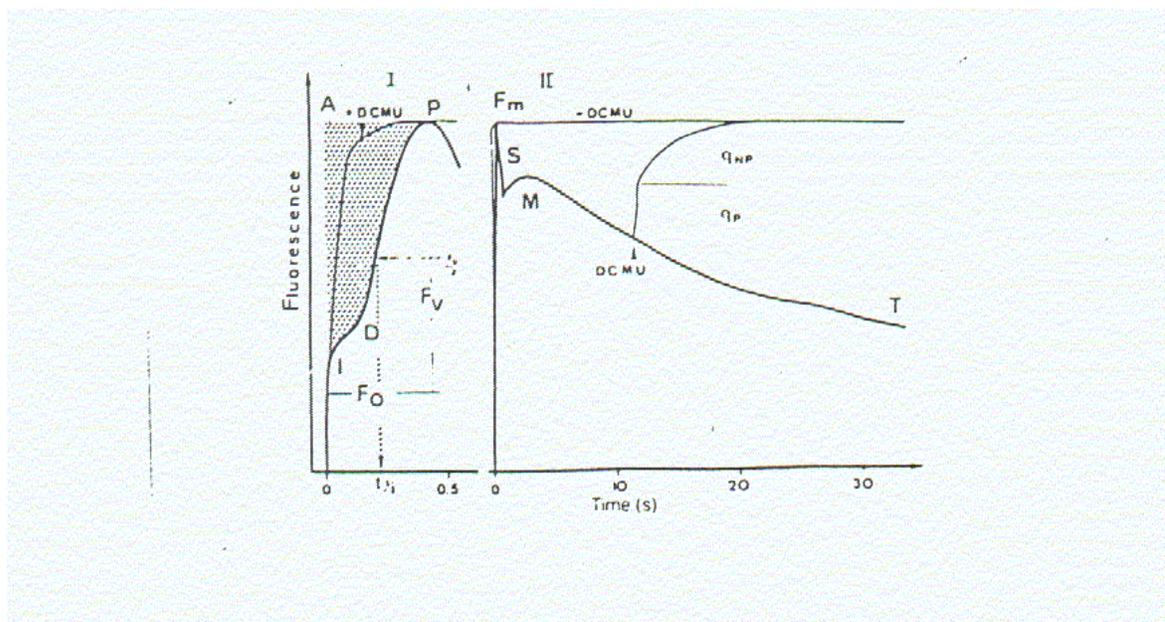


Figura 6. Cinética de emissão da fluorescência ou curva Kautsky registrada de uma suspensão de *Chlorella* adaptada ao escuro. I: cinética rápida; II: cinética lenta; A: área acima da curva; F_0 : fluorescência inicial (centros de reação do PSII abertos); O: origem; I: nível intermediário; D: ponto de depressão; P: pico (ponto) máximo da curva; F_v : fluorescência variável; $t_{1/2}$: metade do tempo de F_0 até F_m ; F_m : fluorescência máxima (centros de reação do PSII fechados); S: inclinação da curva; M: pico secundário máximo; T: nível terminal; DCMU; q_{NP} : dissipação não fotoquímica (*quenching* não-fotoquímico); q_P : dissipação fotoquímica (*quenching* fotoquímico) (Bolhàr-Nordenkampf e Öquist, 1993)

A **Figura 6** mostra a cinética de emissão da fluorescência e as fases da curva são convencionalmente denominadas de **OIDPSMT** (Papageorgiou, 1975). A quantificação da fluorescência é normalmente arbitrária. Após mantido o tecido fotossintetizante no escuro (em tecidos saudáveis, uma adaptação de 15 a 30 minutos é normalmente considerado suficiente (Larcher e Cernusca, 1985); posteriormente será discutido a função deste período escuro), verifica-se que, após o início da iluminação (T_0 /tempo zero), há uma elevação inicial da fluorescência denominada de F_0 (fluorescência mínima ou inicial). O valor F_0 representa a emissão de luz pelas moléculas de clorofilas **a** excitadas, antes da energia ser dissipada para o centro de reação do **PSII** (Mathis e Paillotin, 1981). Desta maneira, esta fluorescência é independente dos eventos fotoquímicos. O valor F_0 é um valor referência para a determinação das outras variáveis da fluorescência (Hipkins e Baker, 1986). Na indução do sinal, o verdadeiro valor de F_0 é somente observado, quando antes da iluminação, o acceptor Q_a estiver completamente oxidado (centro de reação aberto) (Krause e Weis, 1984). Entretanto, F_0 nem sempre é uma constante, o seu valor pode aumentar caso os centros de reação do **PSII** estejam comprometidos, ou se a transferência da energia de excitação da antena para os centros de reação esteja prejudicada (Bolhàr-Nordenkampf et al, 1989). O valor de F_0 é alterado por estresses do ambiente que causam alterações estruturais nos pigmentos fotossintéticos do **PSII**. Estresse por temperaturas infraótimas decresce significativamente os valores de F_0 (Adams e Perkins, 1993) e o estresse por temperaturas supra-ótimas é caracterizado por incrementar drasticamente os valores de F_0 (Krause e Santarius, 1975; Schreiber e Berry, 1977; Smillie e Nott, 1979). O valor desta variável apresentou valores elevados em plantas cultivadas sob deficiência de fósforo (Conroy et al, 1986).

Ao se iluminar o tecido fotossintetizante com uma luz forte (luz actínica), a fluorescência incrementa a partir do nível F_0 , atinge um nível intermediário **I**, depois atinge o nível **D** e, após este nível, atinge o pico máximo **P** da curva Kautsky. Esta elevação na fluorescência revela um declínio do processo fotoquímico (**Ph**) (Figura 1). A razão do declínio de **Ph** é que o acceptor Q_a torna-se reduzido. É suposto que a fase **OI** esteja relacionada com o início da liberação de O_2 (Papageorgiou, 1975). No ponto **I**, os elétrons iniciam a saída de Q_a para o *pool* de plastoquinona via Q_b . Após a depressão **D**, ocorre um incremento na fluorescência até atingir o ponto **P**. Neste ponto **P**, cerca de 0,5 a 2 segundos após o tecido fotossintetizante ter sido iluminado com um pulso de luz actínica de elevada intensidade, todos os centros de reação tornam-se fechados (Q_a reduzida,

Fotoquímica ($Ph=0$, dissipação fotoquímica (*quenching*) (q_p) igual a zero) e a fluorescência atinge o nível máximo denominada F_m . No ponto P a taxa inicial de redução de Q_a é superior a taxa de reoxidação pela plastoquinona e pela atividade do PSI . A fluorescência emitida de F_0 até P é denominada fluorescência rápida.

Após o ponto P (F_m), os elétrons iniciam o fluxo de saída de Q_a (fase $P-S$ da curva Kautsky. Neste ponto, Q_a está parcialmente oxidada e a transferência de elétrons para o PSI , via complexo citocromo b_6/f e plastocianina, ocorre. Nesta fase, como foi discutido anteriormente, o processo fotoquímico está operando com eficiência. A fase S é caracterizada pela formação do gradiente de prótons causado pelo transporte de elétrons. Este gradiente de H^+ provoca uma energização na membrana do tilacóide e um decréscimo na emissão da fluorescência (fase $P-S$) é verificada (Bolhàr-Nordenkampf et al, 1989). A cinética da fluorescência após o pico P é complexa e está relacionada com a fixação do CO_2 e a liberação do O_2 . Um segundo pico (M), usualmente surge após o pico P e corresponde ao início da assimilação do CO_2 (Ireland et al, 1984). Após o pico M , a fluorescência declina para um estado estacionário denominado (T), que corresponde ao estado estacionário da assimilação do CO_2 . O declínio de P até T pode requerer vários minutos e esta fase é denominada fluorescência lenta (**Figura 6II**). O decréscimo da fluorescência do ponto P até o ponto T é denominado de dissipação e é utilizada a terminologia *quenching* (q) para referir-se a este decréscimo. Os *quenchings* podem ser classificados em dois tipos: o *quenching* fotoquímico (q_p) é a dissipação (extinção) causada pelo processo fotoquímico, ou seja, é causado pela utilização da energia para a redução do NADP. Este *quenching* decresce na proporção do fechamento dos centros de reação (redução de Q_a). O *quenching* não-fotoquímico (q_N) representa todas as outras formas de dissipação de energia, principalmente calor. As análises mais detalhadas dos *quenchings* serão efetuadas posteriormente no item fluorescência modulada.

Um outro parâmetro da cinética rápida da fluorescência é denominado fluorescência variável (F_v). F_v é o incremento fluorescência a partir de F_0 até F_m .

Na prática, a razão entre a fluorescência máxima (F_m) (toda Q_a reduzida) e a fluorescência mínima (F_0) (toda Q_a oxidada) é aproximadamente 5 a 6 em tecidos fotossintetizantes saudáveis e adaptados no escuro. Entretanto, esta razão pode variar, dependendo da iluminação e dos tratamentos fisiológicos que afetam principalmente a fluorescência máxima (Schreiber et al, 1998).

Quando um fóton de luz excita a molécula de clorofila, um único elétron é elevado a um maior grau de energia. Como foi relatado no item **1**, esta energia pode ser dissipada

e ser usada para produção de **ATP** e **NADPH₂**, liberado na forma de calor (**D**) ou reemitida como fluorescência (**F**). Desta maneira, os processos podem ser expressos pela equação:

$$Ph + D + F = 1$$

Em que:

Ph= rendimento quântico da fotossíntese (representa energia dos fótons que chega no **PSII**, em relação à energia que será usada na produção de **ATP** e **NADPH₂**)

F= fluorescência

D= dissipação na forma de calor

Destes parâmetros supracitados, a determinação de **Ph** é o de maior interesse dos cientistas, pois este mede o rendimento quântico da atividade fotoquímica do processo fotossintético. O valor de **F** pode ser facilmente determinado com o uso de um fluorímetro, e o parâmetro **D** é difícil de mensurar. Entretanto, medidas corretas de **Ph** podem ser derivadas das medidas de **F**. Segundo Schreiber et al (1998), a derivação de **Ph** a partir de **F** segue as equações que serão descritas posteriormente:

Novamente, considere que um tecido fotossintetizante foi mantido no escuro por um período longo. Se, após este período, a folha é exposta a um curto período de luz intensa, as moléculas de clorofila presentes nos tilacóides dos cloroplastos ficarão excitadas e passarão os elétrons excitados para os aceptores do **PSII** e **PSI** (**Figura 2**). Contudo, as reações enzimáticas do ciclo de Calvin não estão ativas neste início de iluminação. Desta maneira, o **NADPH₂** formado no processo fotoquímico não pode ser usado e o *pool* de **NADP** disponível para a redução está exaurido. Como consequência, nos poucos microsegundos de iluminação, após o tecido ter sido mantido no escuro, os carreadores de elétrons no **PSI** e **PSII** não estão capacitados a transferir os elétrons e permanecem na condição de reduzidos. Conseqüentemente, durante o período de iluminação, os elétrons excitados da clorofila não podem ser usados para as reações fotoquímicas.

Segundo Schreiber et al (1998), durante a aplicação do pulso saturante de luz e após o tecido ter sido mantido no escuro, o rendimento quântico do processo fotoquímico (**Ph**) reduz para zero e a emissão da fluorescência e a dissipação do calor tornam-se máximos (**F_m** e **D_m**).

Sendo assim, durante a iluminação: (**Ph=0**, **F=F_m** e **D=D_m**)

$$Ph + F + D = 1 \text{ ou } Ph = 1 - F - D$$

$$F_m + D_m = 1$$

$$D_m = 1 - F_m$$

Tem sido demonstrado experimentalmente que a quantidade relativa da dissipação de calor e da fluorescência pode ocorrer durante uma curta (0,8 segundos) iluminação saturante. Sob condições normais de irradiância, as reações são similares ao que ocorre nesse pouco tempo de 0,8 segundos. Ainda, a razão entre a dissipação (**D**) e a fluorescência (**F**) é assumida por ser constante durante um breve pulso de saturação. Desta maneira:

$$D_m/F_m = D/F, \text{ considerando } D_m = 1 - F_m$$

$$(1 - F_m)/F_m = D/F \text{ ou } D = (F/F_m) - F$$

$$Ph + D + F = 1$$

$$Ph + [(F/F_m) - F] + F = 1$$

$$Ph = 1 - F - [(F/F_m) - F]$$

$$Ph = 1 - (F/F_m)$$

$$Ph = (F_m - F)/F_m$$

$$Ph = F_v/F_m$$

Na prática, **Ph** é representado pelo rendimento quântico do **PSII** (ϕ_{II}) e pode ser avaliado após uma adaptação no escuro. Na condição de ausência de luz e antes da aplicação do pulso saturante de luz, a emissão da fluorescência é mínima, e é denominada de **F₀**. Durante a aplicação do pulso saturante de luz, a emissão da fluorescência é máxima, e é definida como **F_m** (Rendimento quântico máximo). Ainda, ϕ_{II} pode ser determinado durante uma iluminação com emissão de uma fluorescência **F**, com máxima emissão durante o pulso com valor **F_m**'. Neste caso, o rendimento quântico é denominado rendimento quântico efetivo. Desta maneira, as expressões abaixo, relacionadas com a fluorescência, podem ser utilizadas para a determinação do rendimento quântico fotoquímico do **PSII** (Schreiber et al, 1998):

$$\text{Rendimento quântico máximo: } \phi_{II_m} = (F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$$

(amostra adaptada no escuro)

Rendimento quântico efetivo: $\phi II_e = (F_m - F) / F_m' = \Delta F / F_m'$ (amostra recebendo uma determinada quantidade de **FFF** (Este rendimento quântico será discutido posteriormente no item fluorescência modulada)

Björkman e Demmig (1987) determinaram os valores da razão F_v/F_m em um grande número de espécies vasculares. Foi verificado a 77K que folhas sadias de várias espécies vegetais apresentaram valores de F_v/F_m em torno de $0,832 \pm 0,004$. Entretanto, segundo Pfúndel (1995) o **PSI** pode contribuir significativamente no valor de F_0 , em torno de 5 a 11% da fluorescência máxima em plantas **C₃** e **C₄**, respectivamente. Desta maneira, se não houver uma correção, o valor de ϕII pode ser subestimado. Como exemplo, valores em torno de 0,82-0,85, determinados num fluorímetro PAM, deverão ser incrementados para 0,86-0,90.

O valor da razão F_v/F_m foi proporcional ao rendimento quântico da fase fotoquímica da fotossíntese (Butler e Kitajima, 1975). O declínio da relação F_v/F_m é um bom indicador do dano fotoinibitório quando plantas estão sujeitas a estresses do ambiente incluindo frio (Baker et al, 1983) e seca (Ögren e Öquist, 1985).

O valor da razão F_v/F_m é amplamente usado. Entretanto, duas fontes de erro poderão afetar a determinação desta relação (Bolhàr-Nordenkampf et al, 1989).

1) A definição de F_v depende da exata determinação de F_0 . Na curva Kautsky, o ponto **O** (F_0) é identificado pela descontinuidade da variação de F em função do tempo. A determinação correta de F_0 depende da construção do equipamento. O equipamento deverá ser capaz de efetuar as leituras do sinal da fluorescência induzido pela iluminação com extrema rapidez. Atualmente, com os fluorímetros modulados, esta fonte de erro é insignificante. A fluorescência modulada será discutida posteriormente.

2) É assumido que os aceptores estão completamente reduzidos no ponto F_m . Se a luz de excitação não é suficiente, a fluorescência não alcançará o pico máximo. Desta maneira, o pico máximo obtido não será o sinal máximo da fluorescência F_m , e o valor de F_m determinado não será correto. Sendo assim, este valor incorreto de F_m não deverá ser usado para calcular a relação F_v/F_m . A luz de excitação para a obtenção de F_m varia de espécie para a espécie, com o período de adaptação no escuro e de acordo com as condições do ambiente de cultivo.

Existem outras variáveis obtidas da curva Kautsky que podem ser usados nas interpretações do processo fotossintético. A razão de decréscimo da fluorescência (R_{fd}), que é determinada pela expressão $(F_m - F_t) / F_t$, é denominada de índice de vitalidade e é usada para avaliar a atividade de Ciclo de Calvin e seus processos relacionados

(Lichtenthaler et al, 1986). Valores de R_{fd} superiores a 2,5 indicam um bom funcionamento da atividade fotossintética (Rinderle e Lichtenthaler, 1988) e valores abaixo de 1 sugerem que a fixação do CO_2 tem sido severamente comprometida (Haitz e Lichtenthaler, 1988).

A área sobre a curva de fluorescência entre F_o e F_m é proporcional à quantidade dos aceptores de elétrons (Murata et al, 1966). Sendo assim, se a transferência dos centros de reação para o *pool* de plastoquinona é bloqueado, ou seja, como exemplo a aplicação do herbicida **DCMU** (Diclorofenil-dimetilureia - Diuron) (bloqueia a transferência de Q_a para Q_b), a área da curva será drasticamente reduzida (**Figura 6**).

b.2) Fluorescência modulada:

Recentes progressos relacionados à pesquisa da fluorescência têm sido obtidos após construção dos fluorímetros modulados (**FLM**) (Ögren e Baker, 1985; Schreiber 1986; Schreiber et al, 1986). Estes equipamentos se diferenciam dos equipamentos do tipo **FLNM**, pois utilizam uma fonte luminosa de excitação modulada (1 a 100 kHz), em conjunto com um sistema de detecção de fluorescência. Nesta condição, permite-se monitorar a fluorescência na frequência e fase da luz modulada de excitação. Sendo assim, estes aparelhos permitem monitorar a fluorescência na presença de uma luz contínua de qualquer comprimento de onda, incluindo a luz solar. O esquema ilustrado do fluorímetro modulado é mostrado na **Figura 5b**. Normalmente, a luz modulada inicial aplicada após o tecido vegetal ter sido mantido no escuro é de baixa intensidade ($<1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e não induz a curva da fluorescência. Uma segunda luz com cerca de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ induz a cinética da curva. Esta segunda luz é frequentemente denominada de luz actínica. Para efetuar as análises dos *quenchings* (dissipações), uma luz com elevada intensidade luminosa ($>2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) é utilizada para “fechar” os centros de reação. Nestes equipamentos, as medições são efetuadas ligando-se inicialmente uma luz modulada inicial ($< 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Esta luz modulada inicial é de insuficiente intensidade para “fechar” todos centros de reação, ou seja, é incapaz de gerar qualquer fluorescência variável. Entretanto, é capaz de induzir apenas o nível F_o (**Figura 7**). Desta maneira, um tempo t de luz modulada inicial pode ser permitido para uma clara definição de F_o . Os fluorímetros modulados têm facilitado as análises das dissipações (*quenchings*). Estes processos de extinção da fluorescência, denominados *quenchings*, serão descritos a seguir.

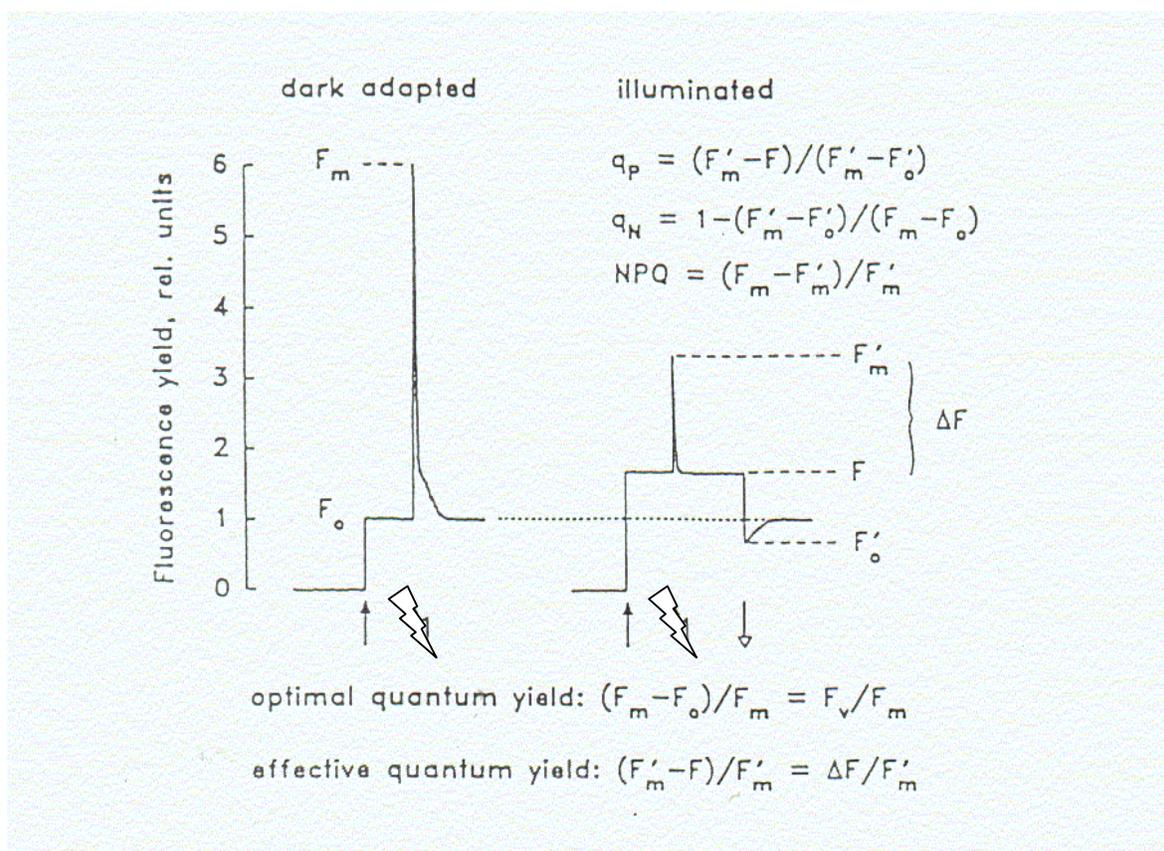


Figura 7. Definição dos níveis da fluorescência modulada, dissipações (*quenchtings*) e expressões para o rendimento quântico do PSII em amostras adaptadas (máximo ou ótimo) e não-adaptadas ao escuro (efetivo). Os níveis de fluorescência máxima após a amostra ser adaptada ao escuro (F_m) e não-adaptada ao escuro (F'_m) foram induzidas pela completa redução de Q_a com um pulso saturante de luz de 0,5-1s. A seta (•) indica o início da aplicação da luz, a seta (⚡) indica a aplicação do pulso de saturação e a seta (•) indica o desligamento da luz actínica. O rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m : ϕ_{II_m}) foi obtido com a adaptação da amostra no escuro (centros de reação abertos ($q_p=1$ e $q_{NPQ}=0$)). O rendimento quântico efetivo foi medido após a iluminação. No modelo PAM 2000 (Walz, Alemanha), para as determinações dos *quenchtings* fotoquímico e não-fotoquímico, torna-se necessário o conhecimento de F'_0 . Na determinação de NPQ não se utiliza F'_0 (Bolh ar-Nordenkampf et al. 1989). Para os cálculos de q_N e q_p , o fluorímetro modelo Mini-PAM (Walz, Alemanha) utiliza o valor de F_0 e não F'_0 na determina o dos *quenchtings*.

Análise das dissipat es (*quenchtings*)

Após a eleva o da fluorescência, ponto **P** na curva Kautsky,   observado um decréscimo na emissão da fluorescência. Esta queda pode ocorrer em 1 ou em vários minutos, até atingir o nível de equilíbrio **T**. A transferência de elétrons de Q_a para Q_b e para o *pool* de plastoquinona reabre os centros de rea o, reduzindo a fluorescência. Entretanto, segundo Duysens e Sweers (1963) o declínio da fluorescência a partir de **P**

não pode ser explicado exclusivamente pela reoxidação de Q_a (*quenching* fotoquímico: conversão da energia fotoquímica no **PSII**). Atualmente, além do *quenching* fotoquímico, outros não relacionados à reoxidação de Q_a são conhecidos. A extensão do abaixamento da fluorescência a partir de **P** pode ser expressa pelos coeficientes dos *quenchtings* ($0 \leq q \leq 1$) e indica a proporção de redução de F_v .

Apesar do termo *quenching* ter um exato significado físico, na literatura relacionada à fisiologia vegetal, a palavra *quenching* tem sido definida como qualquer decréscimo (dissipação) da fluorescência (Krause e Weis, 1984). Como foi citado anteriormente, existem dois tipos de *quenchtings*: *quenching* fotoquímico (q_p) e *quenching* não-fotoquímico (q_N). A fase rápida de indução da fluorescência (fases **OIDP** da curva Kautsky) reflete as mudanças de q_p , enquanto que as mudanças em q_N são mais lentas. As mudanças em q_p são rápidas (frações de segundo) e as mudanças em q_N requerem um período maior (≈ 10 segundos ou vários minutos). Esta diferença na resposta dos *quenchtings* é a base da separação entre q_p e q_N (Bradbury e Baker, 1981). Em qualquer ponto no tempo, a aplicação de uma luz de alta intensidade contínua após o pico **P** causará uma completa redução dos centros de reação do **PSII** e, conseqüentemente, uma rápida redução de q_p (rápida supressão de q_p , isto é, q_p tende a zero). Segundo Krause e Weis (1988), q_p está relacionado com a quantificação da energia de excitação capturada pelos centros de reação abertos (devido a transferência de energia entre as unidades do **PSII**, q_p não é proporcional a Q_a oxidada). O *quenching* fotoquímico é determinado pela fotoquímica e decresce na proporção em que os centros de reação são fechados, ou seja, redução de Q_a (Bolhàr-Nordenkampf e Öquist, 1993). Segundo Pospisil (1997), o decréscimo do rendimento quântico da fluorescência, associado às reações fotoquímicas, é denominado de *quenching* fotoquímico. Krause e Weis (1991) relatam que q_p representa a fração “aberta” do **PSII** em relação à fração total deste fotossistema.

Usando um fluorímetro modulado é mostrado a separação dos *quenchtings* pela aplicação de apenas 1 pulso de luz saturante (**Figura 7 (iluminated)**). O sinal reflete a emissão da fluorescência. Este sinal varia de em torno de 5, entre o valor de F_0 (centros de reação abertos) e o valor de F_m (centros de reação fechados). Após um tecido fotossintetizante ter sido mantido no escuro, foi efetuada a medição da fluorescência em função do tempo em um fluorímetro modulado. Inicialmente, quando foi incidida sobre a folha, uma luz modulada de baixíssima intensidade, a fluorescência (F) atingiu o valor de F_0 . Após alguns segundos, quando a mesma folha foi exposta a um breve e intenso pulso de luz saturante (1 segundo de duração), a fluorescência incrementou até o nível máximo

F_m . Neste ponto, se a luz actínica é intensa, todos os centros de reação tornam-se fechados e a fotoquímica torna-se zero (neste ponto, q_p e q_n atingem valores iguais a zero). Segundo Schreiber et al (1998), não é possível induzir F_m em menos de 100 ms. Após este pulso, a emissão da fluorescência diminui de F_m para o nível F_0 como resultado da reoxidação dos centros de reação fechados pelo pulso de luz actínica. Após o pico de emissão da fluorescência, uma seqüência de pulsos de luz saturantes é aplicada ao tecido fotossintetizante para analisar os *quenchings*. O pico da fluorescência em cada pulso aplicado (F'_m) é reduzido à medida que os valores dos *quenching* são demonstrados (**Figura 7**). Na **Figura 7**, é mostrado apenas um pulso de luz para induzir F'_m . Se os *quenchings* estão relacionados com a fotoquímica, cada aplicação do pulso saturante elevará a fluorescência até o nível F'_m , pois cada pulso luminoso é suficiente para fechar os centros de reação (q_p igual a zero). Entretanto, é observado que a cada pulso, F'_m não retorna ao valor inicial F_m . Este fato indica que o *quenching* não-fotoquímico está atuando para diminuir a emissão da fluorescência (Bradbury e Baker, 1981). Esta é a base para a diferença de q_N e q_p . Segundo Pospisil, (1997) o *quenching* não-fotoquímico é o decréscimo do rendimento quântico da fluorescência associado à dissipação termal da energia de excitação. Schreiber et al (1998) relatam que o *quenching* não-fotoquímico está relacionado ao incremento da energia de de-excitação não-radiativa, envolvendo formação de calor ou transferência para o **PSI** não-fluorescente. No modelo PAM 2000 da Empresa Walz, Alemanha, quando a luz actínica é desligada, após um determinado tempo (estabelecido pelo aparelho), é ligada uma luz fraca de comprimento de onda na região do vermelho distante e é observado que a fluorescência atinge o valor F'_0 , inferior a F_0 . No modelo MINI-PAM, fabricado por essa mesma empresa alemã, este equipamento não possui esta luz na região do vermelho distante. Desta maneira, os cálculos de q_N e q_p são sempre dependentes de F_0 .

Apesar dos conceitos dos *quenchings* serem motivos de controvérsias entre os autores, segundo Krause e Weis (1988) o *quenching* não-fotoquímico é composto pelos seguintes componentes:

- a) *quenching* dependente de energia (q_e): relacionado com o gradiente de prótons através da membrana do tilacóide:

É o principal componente do *quenching* não-fotoquímico (dissipação da energia não-radiativa). Briantais et al (1979) tem mostrado que o valor de q_e é linearmente relacionado à concentração de prótons dentro dos tilacóides dos cloroplastos. Em alta intensidade luminosa, quando um alto gradiente de prótons é

formado dentro dos tilacóides, 80% da fluorescência variável pode ser reduzida ($q_e=0,8$). Uma maior parte de q_e está altamente relacionada com a formação de zeaxantina. Este carotenóide tem sido relacionado como uma “armadilha” dissipativa no sistema antena (Demmig-Adams e Adams, 1992). Horton e Ruban (1992) propuseram que a zeaxantina facilita a agregação do **LHCII** e, como consequência, incrementa a energia não-radiativa.

b) *quenching* relacionado à fosforilação **LHCII** (q_t)

A distribuição da energia de excitação entre os dois fotossistemas é regulada pela fosforilação e desfosforilação do **LHCII** (Bullerjahn, 1997). A Fosforilação do **LHCII** tem sido indicada por funcionar como um balanço na distribuição da energia de excitação entre os dois fotossistemas (Briantais et al, 1986). O **LHCII** fosforilado é separado do **PSII** e migra das regiões da grana para as lamelas do estroma dos tilacóides. A diminuição da excitação do **PSII** em relação ao **PSI** reduz a emissão da fluorescência. A contribuição deste mecanismo para a redução do rendimento quântico da fluorescência é relativamente pequeno (q_t max. $\approx 0,2$). A cinética de q_t é relativamente lenta em comparação à q_e (Krause e Behrend, 1986; Horton e Hague, 1988).

c) *quenching* relacionado à fotoinibição da fotossíntese (q_i): possivelmente causado pela transformação dos centros de reação do **PSII**.

A fotoinibição da fotossíntese, a qual ocorre em excessivos **FFF**, está relacionada com o *quenching* da fluorescência variável. Este decréscimo na emissão da fluorescência se desenvolve dentro de minutos ou horas, dependendo da **FFF** e do estado de aclimatação do aparato fotossintético. O processo fotoinibitório é promovido por vários fatores do ambiente que comprometem a utilização da energia luminosa sobre o metabolismo do carbono. Existe um consenso de que o **PSII** é o centro primário do processo fotoinibitório e este distúrbio não-somente reduz o rendimento quântico do **PSII**, como compromete o fluxo de elétrons neste fotossistema (Barenyi e Krause 1985). Segundo Krause e Weis (1988), q_i é expressado pelo decréscimo na relação F_v/F_m na cinética da fluorescência. Um incremento da dissipação termal dos sistemas antena do **PSII** tem sido considerado como uma causa do *quenching* (Demmig e Björkman, 1987) e uma correlação com

as reações do ciclo das xantofilas (formação de zeaxantina a partir da violaxantina) foi encontrado (Demmig et al, 1987).

Quando as condições são favoráveis, o processo fotoinibitório e as respectivas relações com a fluorescência são completamente reversíveis dentro de minutos ou horas. Desta maneira, uma parcela reversível de q_i não deverá ser visto como um dano, mas sim como um mecanismo de proteção que permite dissipar o excesso de energia termal.

- d) quenching causado pelo decréscimo da concentração de Mg^{++} , causando incremento na transferência de excitação para o *PSI*. Na literatura, este tipo de *quenching* é pouco discutido.

Em condições normais, q_p e q_e são os maiores componentes no declínio da emissão da fluorescência.

Como foi discutido, os dois tipos de *quenchings* podem ser facilmente obtidos utilizando a fluorescência modulada. Por meio do modelo PAM 2000 (Walz, Alemanha) matematicamente, os dois *quenchings* podem ser assim expressos (Kooten e Snel, 1990):

$$q_p = (F'_m - F)/(F'_m - F'_0)$$

$$q_N = 1 - [(F'_m - F'_0)/(F_m - F_0)]$$

No modelo MINI-PAM (Walz, Alemanha), estes *quenchings* são assim expressos:

$$q_p = (F'_m - F)/(F'_m - F_0)$$

$$\text{Se } q_N = 1 - q_p$$

$$q_N = (F_m - F'_m)/(F_m - F_0)$$

Torna-se importante relatar que os parâmetros da fluorescência que apresentam o sinal (') estão relacionados a uma pré-iluminação da amostra (estão relacionados à fluorescência modulada).

Quando um tecido fotossintetizante é mantido no escuro, após o início da indução da curva de fluorescência, F_0 e F_m são determinados (**Figuras 6 e 7**). Como foi dito, a

razão $(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$ é uma medida do potencial máximo do rendimento quântico do **PSII** de uma dada amostra (Björkman 1987). Durante a iluminação, ou seja, após o(s) pulso(s) de luz actínica a cinética da fluorescência torna-se mais complexa. Com o(s) pulso(s) de luz, obtem-se variações nos níveis de F_m , que passa a ser denominada de F'_m . Desta maneira, determina-se $F_m - F'_m$ (*quenching* não fotoquímico) e $F'_m - F$ (*quenching* fotoquímico). Segundo Bilger e Schreiber (1986) o valor de F_0 pode ser reduzido por q_e . Sendo assim, para um correto cálculo de q_p e q_N torna-se necessário uma determinação prévia de F'_0 . Após o desligamento da luz actínica (\downarrow na **Figura 7**). Este parâmetro da fluorescência pode ser determinado mantendo a amostra no escuro (Q_a terá sido oxidada em poucos segundos quando o pool estará parcialmente oxidado) e, após, efetuar a aplicação uma luz fraca ($7\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de fundo na região do vermelho distante para que o **PSI** provoque uma re-oxidação em Q_a . O conhecimento de F'_0 é indispensável para obter informações sobre a extensão da abertura do **PSII** via cálculo de q_p (Schreiber et al, 1998). Uma outra maneira de calcular o *quenching* não-fotoquímico foi proposta por Bilger e Björkman (1990) e, para o cálculo, não utiliza o parâmetro F'_0 . A expressão é mostrada abaixo.

$$NPQ = (F_m - F'_m)/F'_m$$

Esta expressão do *quenching* não-fotoquímico é baseada no modelo matricial da organização do sistema antena (Butler, 1978), assumindo a existência de “armadilhas” de q_n , ou seja, zeaxantina (Demmig-Adams, 1990). O atual mecanismo do *quenching* não-fotoquímico é ainda motivo de controvérsias entre os autores. Schreiber et al (1998) relataram que a relação entre **NPQ** e o excesso de **FFF** são lineares e que esta linearidade é observada também quando se relaciona **NPQ** com o conteúdo de zeaxantina (Bilger et al 1995). Evidenciando a dissipação da energia não-radiativa via **NPQ**.

Um outro parâmetro da fluorescência foi proposto por Genty et al (1989) (F'_v/F'_m). Estes autores demonstraram que o rendimento quântico efetivo do **PSII** pode ser determinado usando a seguinte expressão:

$$\phi_{II} \text{ (rendimento quântico efetivo)} = q_p \times (F'_v/F'_m) = (F'_m - F)/F'_m = \Delta F/F'_m$$

A expressão F'_v/F'_m (parâmetro de Genty) representa a eficiência de captura da excitação pelos centros de reação abertos do **PSII** (Schreiber et al, 1994) e está relacionada à dissipação da energia termal no sistema antena (Demmig-Adams et al. 1985).

Essa equação tem uma grande vantagem de não utilizar o parâmetro F'_o . Schreiber et al 1994 relata que a determinação de F'_o pode ser problemática em condições de campo. Note que nas amostras adaptadas ao escuro, a expressão equivalente a $(F'_m - F)/F'_m = \Delta F/F'_m$ (amostra pré-iluminada) é a expressão F_v/F_m (amostra adaptada no escuro), e é definida como rendimento quântico **ótimo**. Segundo Björkman (1987), F_v/F_m é a medida do potencial máximo do rendimento quântico do **PSII**.

O rendimento quântico efetivo representa melhor as variações no rendimento quântico da fotossíntese do que a relação F_v/F_m (Genty et al, 1989) e, desta maneira, é de melhor utilidade (Mohammed et al, 1995). Ainda, este parâmetro da fluorescência (F'_v/F'_m (parâmetro de Genty)) não necessita que as amostras sejam adaptadas no escuro, e a sua determinação é feita em menos de 1 segundo (Mohammed et al, 1995).

Na botânica e em ambientes como o laboratório, a casa-de-vegetação e em condições de campo, do ponto de vista prático, a mais importante aplicação da fluorescência da clorofila, é a avaliação, durante um “estado de equilíbrio da iluminação”, do rendimento quântico efetivo (ϕ_{II_e}). O rendimento quântico efetivo do **PSII** pode ser usado para estimar a taxa de transporte de elétrons na amostra (tecido fotossintetizante) se o **FFF** incidente no tecido é conhecido. Uma vez que 1 μmol de fótons causa a excitação de 1 μmol de elétrons da clorofila, verifica-se que o ϕ_{II_e} representa a proporção destes elétrons que são usados na fase fotoquímica (redução do **NADP**). Sendo assim, a taxa de transporte de elétrons (**ETR**) pode ser definida como $ETR = \phi_{II_e} \times FFF$. Entretanto, nem toda a luz incidente sobre a folha é absorvida pelas moléculas de clorofila, alguns fótons podem ser transmitidos e outros podem ser refletidos. Cerca de 84% da luz incidente sobre a folha é absorvida pelas moléculas de clorofila, com 50% dos fótons ativando as moléculas de clorofila associada ao **PSII** e 50% dos fótons ativando as moléculas associadas ao **PSI**. Desta maneira, a taxa estimada de transporte de elétrons pode ser derivada da seguinte equação:

$$ETR = \phi_{II_e} \times FFF \times 0,84 \times 0,50$$

ou

$$ETR = \phi_{II_e} \times FFF \times 0,42$$

A **FFF** é medida pelo sensor adaptado ao equipamento.

Como exemplo, a **ETR** foi significativamente afetada por elevadas temperaturas (43°C por 5 minutos) em plantas de *Phaseolus coccineus* (Schreiber et al, 1994).

Uma informação importante sobre o desempenho do processo fotossintético de uma tecido fotossintetizante é o traçado de curvas de luz (taxa aparente de transporte de elétrons *versus FFF*). Efetuando uma analogia com as curvas obtidas por equipamentos relacionados às trocas gasosas, a inclinação da curva em baixos **FFF** está relacionada com o rendimento quântico máximo. A estabilização da curva alcançada na luz de saturação é a medida da capacidade máxima de transporte de elétrons em elevados valores de **FFF** (Schreiber et al, 1998).

A fluorescência modulada pode ser medida concomitantemente com as trocas gasosas, usando um Analisador de gás no infravermelho (*Infrared Gas Analyser - IRGA*) (Ireland et al. 1984; 1985 e 1988) ou um eletrodo de oxigênio (Schreiber e Bilger, 1987; Walker, 1987). A **Figura 8** mostra um exemplo da medida da fluorescência e da liberação de O₂ (Bolhàr-Nordenkampf et al, 1989). Observa-se na curva uma forte relação entre a cinética de liberação do oxigênio e q_p . Exceto em alguns pontos em que q_p antecede alguns pontos da curva dO_2/dt . Segundo Schreiber e Bilger (1987) estes desvios podem estar relacionados com o fluxo de elétrons para o O₂ (reação de Mehler, ou fotorespiração) ou com o fluxo cíclico de elétrons no **PSII**. O *quenching* fotoquímico (q_p), predominantemente, reflete o metabolismo fotossintético do carbono. Entretanto, ele não pode representar uma alternativa para a medida da assimilação do carbono e vice-versa. Como exemplo, plantas que apresentam o metabolismo do tipo CAM e plantas submetidas a déficits hídricos acentuados, as quais estão com os estômatos fechados, podem apresentar valores significantes de q_p devido à reciclagem interna de CO₂. Nesta condição, a fluorescência pode fornecer informações sobre o rendimento quântico, o fluxo de elétrons e sobre o estado de energia dos cloroplastos (Winter e Demmig, 1987), mesmo que nenhuma fixação do CO₂ ou liberação do oxigênio ocorra. Neste caso q_p está relacionado com a estimativa da disponibilidade de dissipação de energia para o metabolismo do carbono (Bolhàr-Nordenkampf et al, 1989).

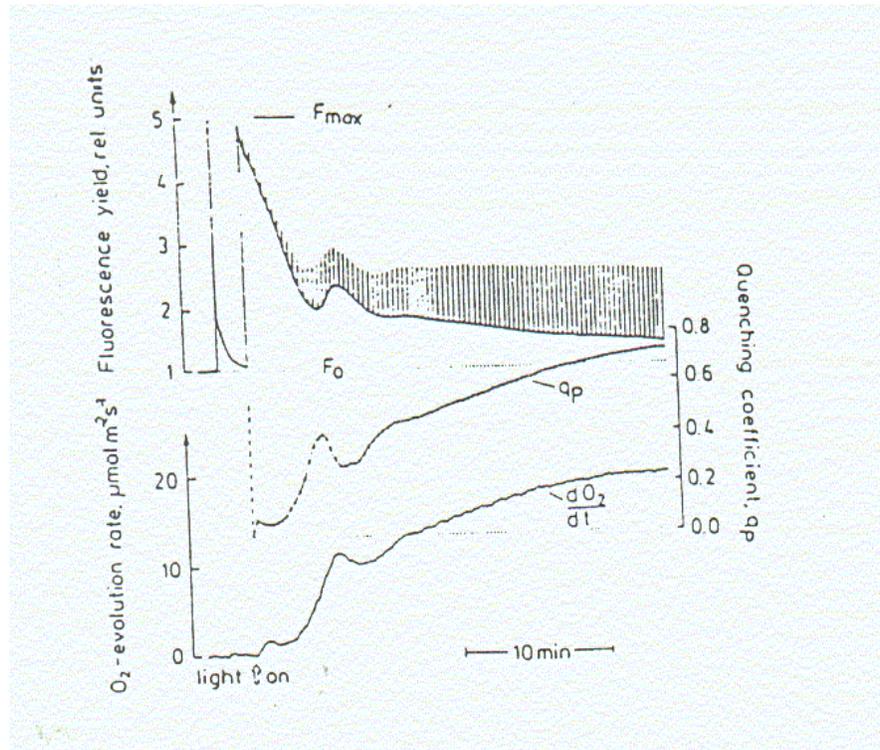


Figura 8. Registro simultâneo da fluorescência da clorofila e da liberação de oxigênio. Pulsos saturantes de luz ($5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram aplicados repetidamente para determinar o *quenching* fotoquímico. Discos Foliares de espinafre adaptadas ao escuro foram iluminados com luz branca de intensidade de $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no eletrodo de Clark e simultaneamente registrada a fluorescência modulada (Bolhàr-Nordenkamp et al, 1989).

A **Figura 9** mostra as curvas de indução da fluorescência e o parâmetro $\Delta F/F'_m$, na ausência e na presença de CO_2 . Observa-se na Figura 9A que na presença de CO_2 , um decréscimo inicial de F'_m é observado, seguido de um incremento no valor desta variável. Na Figura 9B, é observado um incremento do parâmetro $\Delta F/F'_m$ na presença de CO_2 . O decréscimo inicial de F'_m depende da presença de O_2 (a atividade da enzima ascorbato peroxidase, que utiliza H_2O_2 , produto da atividade da superóxido dismutase cujo substrato é o O_2 , tem uma função essencial na ativação do fluxo de elétrons (Asada e Takahashi, 1987, Schreiber et al, 1971)) e reflete a formação do gradiente de prótons entre o estroma e o lúmen dos tilacóides dos cloroplastos. Segundo Schreiber et al (1994), o incremento de F'_m acontece paralelamente ao início do Ciclo de Calvin e da liberação de oxigênio. Na ausência de CO_2 , quando a atividade do Ciclo de Calvin é suprimida, um estado de

equilíbrio é alcançado e é caracterizado pelo elevado valor de q_n e por um reduzido valor na taxa de fluxo de elétrons, evidenciado pelo valor de $\Delta F/F'_m$. Como é esperado, a adição de CO_2 diminui o q_N e estimula o fluxo de elétrons (Figura 9B).

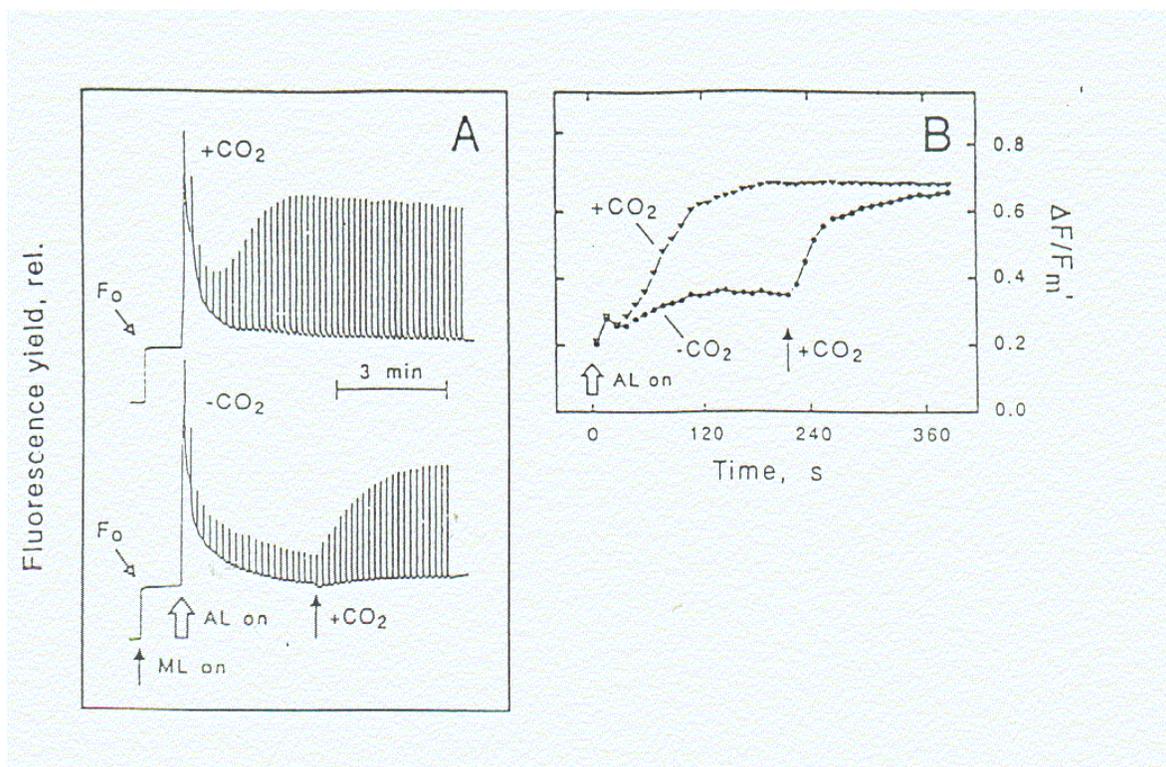


Figura 9. Determinação do fluxo de elétrons assimilatório e não-assimilatário em folhas de espinafre adaptadas ao escuro na presença e ausência de CO_2 . A: Traços originais. B: Valores calculados do rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F'_m$). (Schreiber et al, 1994)

Possivelmente, o maior potencial da análise da fluorescência em condições de campo será o seu uso em conjunto com as medidas das trocas gasosas. Esta combinação permite determinar *in vivo* a atividade dos pontos chaves do processo fotossintético (Bolhàr-Nordenkampf et al, 1989).

Adaptação no escuro

Como foi discutido anteriormente, antes da indução da cinética da fluorescência, torna-se necessário uma adaptação do tecido fotossintetizante ao escuro (≈ 30 minutos). Nesta condição, q_N anulará completamente, embora numa taxa reduzida. Se o $NADPH_2$ é o produto final do transporte de elétrons não-cíclico, então, o estado de redox deste acceptor final de elétrons afetará a capacidade de transporte de elétrons, a fotoquímica, q_p e indiretamente q_e . O estado de redox do acceptor final é afetado pelo seu consumo no ciclo de Calvin e por outras reações redutoras do carbono fotossintético e do metabolismo do nitrogênio, as quais ocorrem no estroma. Similarmente, a taxa de consumo de **ATP** afetará a capacidade de consumo do gradiente transtilacoidal de prótons e, desta maneira, afetará q_e . Torna-se evidente que a fluorescência seja determinada na eficiência química máxima do **PSII** expressa como F_v/F_m . Esta condição somente é obtida com a adaptação da folha no escuro.

Fluorescência a baixas temperaturas

A influência na fluorescência da clorofila pela capacidade de transporte de elétrons (limitada, por exemplo, pela atividade do Ciclo de Calvin e por qualquer outra reação enzimática) pode ser suprimida pelas medidas das amostras em nitrogênio líquido (77K). Nestas condições, somente as reações fotoquímicas primárias serão medidas. Praticamente, toda a fase bioquímica está suprimida.

Antes do congelamento, ao se adaptar um tecido fotossintetizante ao escuro, o rendimento quântico da fluorescência do **PSII** será dependente somente do estado de redox de **Qa**, ou seja do *quenching* fotoquímico. Todos os outros processos termais relacionados ao *quenching* não-fotoquímico serão inibidos.

A fluorescência a 77K pode ser usada no estudo da distribuição de energia entre os dois fotossistemas (Baker et al, 1983). Como foi discutido anteriormente, os estudos da cinética da fluorescência a 77K está mais direcionado às interpretações teóricas do processo.

Protocolos de amostragem:

Apesar do avanço na execução das medidas da fluorescência devido aos progressos no processo de instrumentação, tem sido pouco documentada a padronização das amostras para que se possa ter boa precisão e repetibilidade das medidas (Mohammed et al, 1995).

As formas das curvas, bem com a amplitude, podem ser afetadas por vários fatores como o horário da medição, a estação de crescimento, a posição da folha, as características de adaptação à luz, ao tempo de adaptação ao escuro e à temperatura e intensidade de luz durante o ensaio. Desta maneira, torna-se importante minimizar a influência de fatores externos, os quais podem conduzir a erros experimentais elevados e subseqüentes falhas na interpretação dos dados.

Hora do dia/estação de crescimento

A estação de crescimento influencia a fotossíntese e, por sua vez, a emissão da fluorescência. Deve-se observar o período de dormência de espécies vegetais que se desenvolvem em regiões com baixas temperaturas.

A hora do dia em que se coleta uma amostra e/ou o horário de medição pode influenciar nos resultados. Valentini et al (1994) observaram que os valores da relação F_{690}/F_{730} em *Papulus Alba* L. foi reduzida a partir de 8:00 até o período da tarde, atingindo a estabilidade em torno das 16:00. Em folhas de *Carica papaya* L., crescidas a $2450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a relação F_v/F_m apresentou valores de 0,825 às 6:00 e 0,555 às 12:00 (Marler, 1993). Em condição de campo (FFF em torno de 500 e $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 6:00 e 14:00, respectivamente), este mesmo autor encontrou valores de 0,825 às 6:00 e valores de 0,700 às 14:00. Em folhas desta mesma espécie, crescida em FFF de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Campostrini (1997) encontrou pouca variação (0,825 a 0,850), durante o dia (8:00 às 18:00). As medidas da emissão da fluorescência da clorofila têm sido obtidas, geralmente, nos períodos do dia em que a taxa fotossintética apresenta maiores valores, ou seja, poucas horas após o amanhecer (Saarinen e Liski, 1993).

Seleção das amostras:

Os resultados da emissão da fluorescência da clorofila podem ser afetados pela posição da folha no dossel. A posição das folhas determina se uma folha apresenta características de sol ou de sombra e, ainda, se está relacionada à idade da folha. Como exemplo, uma elevada variação em R_{fd} foi encontrada em folhas crescidas no ápice do dossel (folhas de sol) e folhas crescidas nas partes mais baixas do dossel (folha de sombra). O valor deste parâmetro da fluorescência foi mais elevado em folhas jovens do que em folhas mais velhas cronologicamente. Os efeitos da exposição das folhas ao sol e à sombra são importantes quando se analisa a superfície abaxial e adaxial, principalmente em folhas de maiores áreas. Desta maneira, a padronização das amostras torna-se importante, principalmente quando pequenas áreas foliares estão sendo usadas. Estes cuidados proporcionam maior precisão e repetibilidade dos resultados (Mohammed et al, 1995).

A estratégia de amostragem dependerá dos objetivos do estudo. Se o estudo objetiva mostrar diferenças significativas entre duas populações num determinado ponto no tempo, ou entre folhas de uma mesma população em diferentes tempos, uma elevada quantidade de amostras (>50) torna-se necessária (Bolhàr-Nordenkamp et al, 1989).

Intensidade da luz

A intensidade da luz antes e durante as medidas da fluorescência pode ter significativos efeitos nos resultados. Este fator é um dos maiores fatores de variação nos estudos relacionados com a fluorescência. O **FFF** usado durante as medidas tem variado de 15 a milhares de $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na determinação da curva Kautsky. Não há um valor típico de **FFF** nos relatos, entretanto, valores inferiores a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ são usados com mais freqüência (pulso de saturação são necessariamente altos ($>3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)) para que ocorra uma completa redução dos aceptores de elétrons. Nestas condições, podem fornecer informações significativas sobre as determinações dos coeficientes dos *quenchings*. Na determinação da curva Kautsky, a intensidade da luz de excitação tem sido mostrada por influenciar os parâmetros da fluorescência como R_{fd} e F_v/F_m (Mohammed et al, 1995).

Na determinação de R_{fd} , por exemplo, é requerido uma luz de excitação saturante para uma correta determinação de F_m (Lichtenthaler e Rinderle, 1988). Contudo, altas

intensidades luminosas podem não ser necessárias para a determinação precisa da relação F_v/F_m . O trabalho clássico de Björkman e Demmig (1987) que identificou valores de F_v/F_m em torno de 0,830 (77K), para espécies C_3 , foi utilizado valores baixos de FFF . Subseqüentes estudos comprovaram os resultados desses autores. Öquist e Wass (1988) mostraram que os valores constantes para a obtenção de F_v/F_m foram obtidos nas intensidades de luz variando de 70 a 570 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz actínica. Bolhàr-Nordenkamp et al (1989), relataram que os efeitos da variação na intensidade de luz nos parâmetros da fluorescência, como F_v/F_m , deverão ser testados com o material vegetal que se vai trabalhar.

As variações dos fatores do ambiente como cobertura do céu com nuvens, a presença de competição por luz e o autosombreamento do dossel podem afetar significativamente a intensidade luminosa no ambiente em estudo e, desta maneira, afetar o rendimento quântico do **PSII** determinado *in situ* (Schreiber et al, 1994). O rendimento quântico apresenta valores elevados em condição de baixa intensidade luminosa em comparação com altas intensidades. Mohammed et al, 1995 citam que relacionar **ETR** com **FFF** pode ser mais informativo. A inclinação desta curva representa a eficiência quântica ótima e, em altas **FFF** representa a limitação do fluxo de elétrons fotossintéticos passando através do **PSII**.

Quando se está utilizando fluorímetros em condição de campo, uma observação importante relatada por Marler e Lawton (1994), foi a influência da elevada temperatura nas minicubetas utilizadas na adaptação da folha ao escuro. Em condição de campo e em condição de céu limpo, estas minicâmaras são diretamente expostas a elevadas intensidades de luz solar direta (elevados **FFF**). Os valores elevados de **FFF** podem causar elevações na temperatura das minicâmaras e podem influenciar significativamente os valores de F_o , F_m e da relação F_v/F_m . Nestas condições, os autores propõem metodologias que reduzem a interpretação direta da **FFF** (cobertura com papel alumínio, como exemplo) e/ou uma padronização na orientação das minicâmaras, para reduzir o efeito da temperatura sobre as variáveis da fluorescência.

Aplicações

Vários tipos de estresses como temperaturas supra-ótimas, déficits hídrico e elevados **FFF** podem afetar direta ou indiretamente o desempenho do **PSII** (Öquist, 1987). Desta maneira, a fluorescência da clorofila tem sido usada como uma ferramenta de

seleção de genótipos tolerantes a diversos tipos de estresse (Strand e Öquist, 1985; Belkhodja et al 1994; Araus et al 1998; Flagella et al 1994; Flagella et al 1995, Kitao et al (1998).

Em outros estudos relacionados ao estresse, algumas publicações abaixo são exemplos das aplicações da fluorescência da clorofila.

- 1. Temperaturas infra-ótimas:** Larcher e Neuner (1989); Brüggemann et al (1992); Rütten e Santarius (1992)
- 2. Temperatura supra-ótimas:** Havaux et al (1988); Havaux et al (1991), Bilger et al (1987)
- 3. Déficit hídrico e salinidade:** Cornic e Briantais (1991); Cornic e Ghashghaie (1991); Winter e Gademann (1991); Larcher et al (1990); Havaux e Lannoye (1985); Havaux e Lannoye (1983); Belkhodja et al (1994); Araus et al (1998); Flagella et al (1994); Flagella et al (1995).
- 4. Poluição do ambiente:** Kooten et al (1988); Schmidt et al (1987, 1990), Atal et al (1991); Saarinen e Liski (1993).
- 5. Deficiência nutricional:** Kitao et al (1998), Conroy et al (1986)

Agradecimentos

O autor gostaria de agradecer imensamente aos professores Dr. Carlos Pimentel, Departamento de Fitotecnia, do Instituto de Agronomia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Dr. Jurandi Golçalves de Oliveira do Setor de Fisiologia Vegetal/LMGV, da Universidade Estadual do Norte Fluminense e o Dr. Carlos A. Martinez, da Universidade de São Paulo pelas valiosas sugestões a este trabalho.

Referências

- Adams, G.T.; Perkins, T.D. **Environment Experimental Botany**. 33: 377. 1993
- Araus, J.L.; Amaro, T.; Voltas, J.; Nakkoul, H.; Nachit, M.M. **Field Crops Research**. 55: 209. 1998
- Asada, H.; Takahashi, M. In: **Photoinhibitor**. (eds.) Kyle, D.J.; Osmond, C.B.; Arntzen, C.Z. Elsevier, Amsterdam, 1987. 227
- Atal, N.; Saradhi, P.P.; Mohanty, P. **Plant Cell Physiology**. 32: 943. 1991
- Baker, N.R.; East, T.M.; Long, S.P. **Journal Experimental Botany**. 139: 189. 1983
- Barenyi, B.; Krause, G.H. **Planta**. 163: 218. 1985
- Belkhodja, R.; Morales, F.; Abadía, A, Gómez-Aparisi, J.; Abadía, J. **Plant Physiology**. 104: 667-673. 1994
- Bilger, W.; Schreiber, U. **Photosynthesis Research**. 10: 303. 1986

- Bilger, W.; Schreiber, U; Lange, O.L. In: **Plant response to stress**. (ed.) Tenhunen, G.D. SpringerVerlag, Berlin, 1987. 27
- Bilger, W.; Björkman, O. **Photosynthesis Research**. 25: 173. 1990
- Bilger, W.; Fisahn, W.; Brummet, W.; Kossmann, J.; Willmitzer, L. **Plant Physiology**. 108: 1479. 1995
- Björkman, O. In: **Photoinhibition**. (eds.) Kyle, D.J.; Osmond, C.B.; Arntzen, C.J. Elsevier, Amsterdam, 1987. 123
- Bolh ar-Nordenkamp, H.R.; Oquist, G. In: **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. (eds.) Hall, D.O.; Scurlock, J.M.O.; Bolh ar-Nordenkamp, H.R.; Leegood, R.C.; Long, S.P. Chapman & Hall, London, 1993. 193
- Bolh ar-Nordenkamp, H.R., Long, S.P.; Baker, N.R.; Oquist, G.; Schreibers, U; Lechner, E.G. **Functional Ecology**, 3:497. 1989
- Bradbury, M.; Baker, N.R. **Biochimica Biophysica Acta**. 63: 542. 1981.
- Briantais, J.M.; Vernet, C.; Picaud, M.; Krause, G.H. **Biochimica Biophysica Acta**. 548: 128. 1979
- Briantais, J.M.; Vernet, C.; Krause, G.H.; Weis, E. In: **Light emission by plants and bacteria** (eds.) Govindjee, Ames, J.; Fork, C.D. Academic Press, New York, 1986. 539.
- Br uggemann, W.; van der Kooij, T.A.W., van Hasselt, P.R.. **Planta**. 186: 179. 1992
- Bullerjahn, G.S. In: **Handbook of photosynthesis**. (ed.) Pessarakli, M. Marcel Dekker. New York, 1997. 257
- Butler, W.L. **Annual Review Plant Physiology**. 29: 345. 1978
- Butler, W.L.; Kitajima, M. In: **Proceedings of the 3rd International Congress on Photosynthesis**. (ed.) Avron, M. Elsevier, Amsterdam. 1975. 13
- Campostrini, E. **Comportamento de quatro genótipos de mamoeiro (Carica papaya L.) sob restri o mecânica ao crescimento do sistema radicular**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ. 166p. 1997
- Conroy, J.P.; Smillie, R.M.; Koppers, M.; Bevege, D.I.; Barlow, E.W. **Plant Physiology**. 81: 423. 1986
- Cornic, G.; Briantais, J.M. **Planta**. 183: 178. 1991
- Cornic, G.; Ghashghaie, J. **Planta**. 185: 255. 1991
- Demmig, B.; Bj rkman, O. **Planta**. 171: 171. 1987
- Demmig, B.; Winter, K.; Kr ger, A.; Czygan, F.C. **Plant Physiology**. 84: 218. 1987.
- Demmig-Adams, B. **Biochimica Biophysica Acta**. 1020: 1. 1990
- Demmig-Adams, B.; Adams, W.W. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 43: 599. 1992
- Duysens, L.N.M.; Sweers, H.E. In: **Studies on microalgae and photosynthetic bacteria**. University of Tokyo Press, Tokyo, 353. 1963
- Flagella, Z.; Pastore, D.; Campanile, R.G.; Di Fonzo, N. **Journal of Agricultural Science, Cambridge**. 122: 183. 1994
- Flagella, Z.; Pastore, D.; Campanile, R.G.; Di Fonzo, N. **Journal of Agricultural Science, Cambridge**. 125: 325. 1995
- Genty, B.; Briantais, J.M.; Baker, N. **Biochimica Biophysica Acta**. 990: 87. 1989
- Haitz, M.; Lichtenthaler, H.K. In: **Applications of chlorophyll fluorescence**. (ed.) Lichtenthaler, H.K.. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1988. 249
- Havaux, M.; Greppin, H.; Strasser, R.J. **Planta**. 186: 88. 1991
- Havaux, M.; Mohamed, E., Lannoye, R. **Journal Plant Physiology**. 133: 555. 1988
- Havaux, M.; Lannoye, R. **Irrigation Science**. 4: 147. 1983
- Havaux, M.; Lannoye, R. **Journal Agricultural Science Cambridge**. 104: 501. 1985
- Hipkins, M.F.; Baker, N.R. In: **Photosynthesis-energy transduction: a practical approach**. (eds.) Hipkins, M.F.; Baker, N.R. IRL Press, Oxford, 1986. 51
- Horton, P.; Hague, A. **Biochimica Biophysica Acta**. 932: 107. 1988
- Horton, P.; Ruban, A.V. **Photosynthesis Research**. 34: 375. 1992
- Ireland, C.R.; Long, S.P.; Baker, N.R. **Planta**. 160: 550. 1984
- Ireland, C.R. Baker, N.R.; Long, S.P. **Planta**. 165: 477. 1985

- Ireland, C.R.; Telfer, A.; Covello, P.S.; Baker, N.R.; Barber, J. **Journal of Experimental Botany**. 37: 299. 1986
- Kautsky, H.; Hirsch, A. **Biochemische Zeitschrift**, 274: 423. 1934
- Kitao, M.; Lei, T.T.; Koike, T. **Tree Physiology**, 18: 135. 1998
- Kooten, O.; Snel, F.H. **Photosynthesis Research**, 25: 147. 1990
- Krause, H.; Weis, E. **Photosynthesis Research**, 5: 139. 1984
- Krause, H.; Weis, E. **Annual Review Plant Physiology**. 42: 313. 1991
- Krause, H.; Weis, E. In: **Applications of chlorophyll fluorescence**. (ed.) Lichtenthaler, H.K.. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1988. 3
- Krause, G.H.; Santarius, K.A. **Planta**. 127: 285. 1975
- Krause, G.H.; Behrend, U. **FEBS Letters**. 200: 298. 1986
- Larcher, W.; Cernusca, A. **Bericht der Oesterreichische Akademie der Wissenschaften**, 194: 45. 1985
- Larcher, W.; Neuner, G. **Plant Physiology**. 89: 740. 1989
- Larcher, W.; Wagner, J. Thammathaworn, A. **Journal Plant Physiology**. 136: 92. 1990
- Lichtenthaler, H.K. **Methods in enzymology**, 148: 350. 1987
- Lichtenthaler, H.K.; Rinderle, U. **CRC Critical Review Analytic Chemistry**. 19: 529. 1988
- Lichtenthaler, H.K.; Buschmann, C.; Doll, M.; Fietz, H.J.; Bach, T.; Kozel, U.; Rahmsdorf. **Photosynthesis Research**, 2: 115. 1981
- Lichtenthaler, H.K.; Buschmann, C.; Rinderle, U.; Schmuck, G. **Radiation and Environmental Biophysics**. 25: 297. 1986
- Marler, T.; George, A.P.; Nissen, R.J.; Anderesen, P.C. In: **Handbook of environmental physiology of fruit crops**. (eds.) Schaffer, B.; Andersen, P.C. CRC Press, Florida, 1994. 199
- Marler, T. Lawton, P. **HortScience**. 29: 1172. 1994
- Mathis, P.; Paillotin, G. In: **The biochemistry of plants**. (eds.) Hatch, M.D.; Boardman, N.K. Academic Press, New York, 1981. 97
- Mohammed, G.H.; Binder, W.D.; Gilles, S.L. **Scandinavian Journal of Forest Research**. 10: 383. 1995
- Murata, N.; Nishimura, M.; Takamiya, A. **Biochemica Biophysica Acta**. 120: 23. 1966
- Öquist, G. In: **Progress in Photosynthesis Research**. (ed.) Biggins, J. Martinus Nijhoff, Dordrecht, 1987, 1
- Öquist, G.; Wass, R. **Physiologia Plantarum**. 73: 211. 1988
- Ogren, E.; Oquist, G. **Planta**. 166: 380. 1985
- Ogren, E.; Baker, N.R. **Plant, Cell and Environment**. 8: 539. 1985
- Papageorgiou, G. In: **Bioenergetics of photosynthesis** (eds.) Amesz, J.; Govindjee. Academic Press, New York, 1975. 320
- Pospisil, P. **Photosynthetica**. 34:343. 1997
- Prézelin, B.; Nelson, N. In: **Plant physiology, biochemistry and molecular biology**. (eds.) Dennis, D.T.; Turpin, D.H. Longman Scientific & Technical, Singapore, 1990. 212
- Qubit Systems. **CO₂ Analysis Package. Instructor's Manual**. Qubit Systems Inc. Kingston. 1999.
- Rinderle, U.; Lichtenthaler, K.K. In: **Applications of chlorophyll fluorescence**. (ed.) Lichtenthaler, H.K.. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1988. 189
- Rütten, D.; Santarius, K.A. **Planta**. 187: 224. 1992
- Saarinen, T.; Liski, J. **Europe Journal Forest Pathology**. 23: 353. 1993
- Schmidt, W.; Neubauer, C.; Kolbowski, J. **Photosynthesis Research**. 25: 241. 1990
- Schreiber, U.; Berry, J.A. **Planta**. 136: 233. 1975
- Schreiber, U.; Bilger, W. In: **Plant response to stress**. (ed.) Tenhunen, G.D. SpringerVerlag, Berlin, 1987. 27
- Schreiber, U.; Bilger, W.; Neubauer, C. In: **Ecophysiology of photosynthesis**. (eds.) Schulze, E.D.; Caldwell, M.M. Springer, New York, 1994. 49
- Schreiber, U. **Photosynthesis Research**. 9: 261. 1986
- Schreiber, U.; Schliwa, U.; Bilger, W. **Photosynthesis Research**. 10: 51. 1986
- Schreiber, U.; Bilger, W.; Hormann, H.; Neubauer, C. In: **Photosynthesis: a comprehensive treatise**. (ed.) Raghavendra, A.S.. Cambridge University Press, Cambridge, 1998. 320
- Seybold, A.; Egle, K. **Planta**, 26: 491. 1970

- Smillie, R.M.; Nott, R. **Australian Journal Plant Physiology**. 6: 135. 1979
- Strand, M.; Öquist, G. **Physiologia Plantarum**. 65: 117. 1985
- Valentini, R.; Cecchi, G.; Mazzinghi, P.; Scarascia Mugnozza, G.; Agati, G.; Bazzani, M.; De Angelis, P.; Fusi, F.; Matteicci, G.; Raimondi, V. **Remote Sensing Environment**. 47: 29. 1994
- Van Kooten, O.; van Hove, B.; van Wijk, K.J. In: **Applications of chlorophyll fluorescence**. (ed.) Lichtenthaler, H.K.. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1988. 203
- Van Kooten, O.; Snel, J.F.H. **Photosynthesis Research**, 25: 147. 1990
- Walker, D.A. **The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis**. Packard Publishing Limited. Chichester. 1987. 182p
- Winter, K.; Demmig, B. **Plant Physiology**. 85: 1000. 1987
- Winter, K.; Gademann, R. **Plant Physiology**. 95: 768. 1991