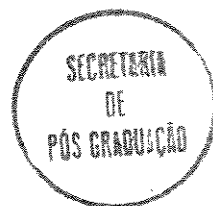


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Este exemplar corresponde à
redação final da Tese defendida
pelo candidato Tomas de Aquino
Portes e aprovada pela Comissão
Julgadora



Aluísio

A EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA PELA CLOROFILA A E O
BALANÇO DE O₂ COMO PARÂMETROS DE DETERMINA-
ÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA CONDICIONANTE
DA PRODUTIVIDADE EM FEIJÃO
(*Phaseolus vulgaris* L.)

TOMA'S DE AQUINO PORTES

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE
BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS, PARA A OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS, NA
ÁREA DE BIOLOGIA VEGETAL

P835e

12322/BC

CAMPINAS - SP
1990

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

**EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA PELA CLOROFILA A E O BALANÇO
DE O₂ COMO PARÂMETROS DE DETERMINAÇÃO DA VARIABILIDADE
GENÉTICA CONDICIONANTE DA PRODUTIVIDADE EM FEIJÃO
Phaseolus vulgaris L.)**

TOMA'S DE AQUINO PORTES

Pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa de
Arroz e Feijão - CNPAF/EMBRAPA

Orientador: Prof. Dr. *Antonio Celso Novaes de Magalhaes*

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para a obtenção do
título de Doutor em Ciências, na
área de Biologia Vegetal.

**CAMPINAS - SP
1990**

*À minha querida mãe, Zaira,
Aos meus filhos Ricardo e Gustavo,
À minha esposa, Cristina,
Dedico*

AGRADECIMENTOS

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e ao Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAF), pela oportunidade e apoio concedidos para a realização do Curso.

A Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pelo ensino proporcionado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos concedida.

Ao Prof. Dr. Antônio Celso N. Magalhães, pela orientação, pelo incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Hilton da Silveira Pinto, pela concessão de recursos materiais, pelo estímulo e pela amizade.

A Bioplanta (Tecnologia de Planta), pelo empréstimo de equipamento.

Aos Drs. Ruy Caldas e Marcos Machado, que mostraram interesse no trabalho, adquirindo, através da Bioplanta, o equipamento utilizado.

A Rosana, Edilene, Silvana e Claudir, do CEPAGRI-UNICAMP, pela colaboração sempre que solicitados e pela amizade.

Aos irmãos Jurandir e Sérgio Zullo, pela constante colaboração e amizade.

Aos colegas Olinto, Tatiana e Zelão, pela amizade e incentivo.

A colega Beatriz da Silveira Pinheiro, pela amizade e incentivo.

A Maria Auxiliadora Afonso Alves, pelo trabalho de datilografia.

Ao Sebastião José de Araújo, pelos desenhos.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, participaram para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

I N D I C E

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Fotoquímica e Fluorescência	3
2.2. Rendimento Quântico	9
2.3. Interação Fotossíntese Respiração	9
3. MATERIAL E METODOS	12
3.1. Medições da fluorescência da clorofila a	12
3.2. Cultivo das plantas para os experi- mentos 3.3; 3.4; 3.5 e 3.6	13
3.3. Efeito da temperatura na cinética de indução da fluorescência	15
3.4. Efeito do tempo de adaptação ao escuro na cinética de indução da fluorescência	16
3.5. Cinética de indução da fluorescência induzida por diferentes densidades de fluxo de fótons	16
3.6. Cinética de indução da fluorescência em discos foliares tratados e não tratados com DCMU	16
3.7. Determinação da cinética da indução da fluorescência e do balanço de O ₂ em 13 genótipos de feijão	17
3.7.1. Método usado para medir a liberação de O ₂	17
3.7.2. Calibração do eletrodo	18
3.7.3. Medição do O ₂ de um disco foliar	19

3.7.4. Cultivo das plantas para o experimento	21
3.7.5. Medição da liberação ou consumo de CO ₂ pelo disco foliar dos genótipos	21
3.7.6. Medição da cinética de indução da fluorescência	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Efeito da temperatura na cinética de indução da fluorescência	28
4.2. Efeito do tempo de adaptação ao escuro na cinética de indução da fluorescência	30
4.3. Cinética de indução da fluorescência induzida por diferentes densidades de fluxo de fótons	32
4.4. Efeito do DCMU na emissão de fluorescência	34
4.5. Comparação de característica da emissão da fluorescência entre genótipos de feijoeiros	35
4.6. Resultados das medições das trocas de O ₂ em genótipos de feijoeiros	51
4.7. Eficiências e exigências quânticas apresentadas pelos genótipos	56
5. CONCLUSÕES	64
6. RESUMO	67
7. ABSTRACT	70
LITERATURA CITADA	73

1. INTRODUÇÃO

A busca de genótipos mais produtivos tem sido o objetivo de várias instituições de pesquisa que trabalham com feijão. No entanto, muitos trabalhos têm sido feitos sem praticamente nenhum controle ambiente, com o objetivo final de selecionar os materiais mais produtivos, de elevada adaptabilidade fisio-ecológica. Esse tipo de trabalho demanda muita mão-de-obra e os resultados, muitas vezes, são mascarados, pois, em condições de campo, as variações ambientais são muito grandes.

Foi com essa preocupação que se procurou direcionar o presente trabalho, usando-se a técnica de determinação da fluorescência mínima (F_0), máxima (F_m), terminal (F_t) e variável (F_v) da clorofila a , além das eficiências fotoquímicas (E_f), do "Quencher" (ou extintor) (E_q) e da liberação de O_2 pelo processo fotossintético.

A utilização do método de emissão da

fluorescência, *in vivo*, da clorofila, visou selecionar genótipos com características semelhantes às da cultivar Carioca, reconhecidamente mais produtiva e de melhor estabilidade fenotípica.

A exploração da técnica é apenas parcial, visto que o seu completo domínio, para uma conclusão final sobre sua validade, demandará outros trabalhos que permitam testar, com maior rigor, sua aplicabilidade na avaliação de variabilidade genética das plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fotoquímica e Fluorescência

A realização do processo fotossintético resulta de três estádios básicos, sendo o primeiro representado pela fase fotoquímica na qual ocorre a captura dos fótons, o segundo pela transferência de elétrons acoplada à formação de ATP e à redução do NADP e NADPH₊H⁺ e, finalmente, o terceiro estádio que compreende as reações bioquímicas envolvendo a incorporação de CO₂ em carboidratos (NOBEL, 1974).

O processo fotoquímico ocorre nos sítios denominados Centros de Reação, presentes nas membranas tilacoides dos cloroplastos, com organização e posicionamento bem definidos (MATHIS & PAILLOTIN, 1981; BARBER, 1983).

Os Centros de Reação são constituídos por uma fração dos pigmentos fotossintéticos (aproximadamente 1%), que são grupos de moléculas especializadas de clorofila A, organizadas, possivelmente, com dímeros ou combinação de

de clorofila associadas a protefmas específicas.

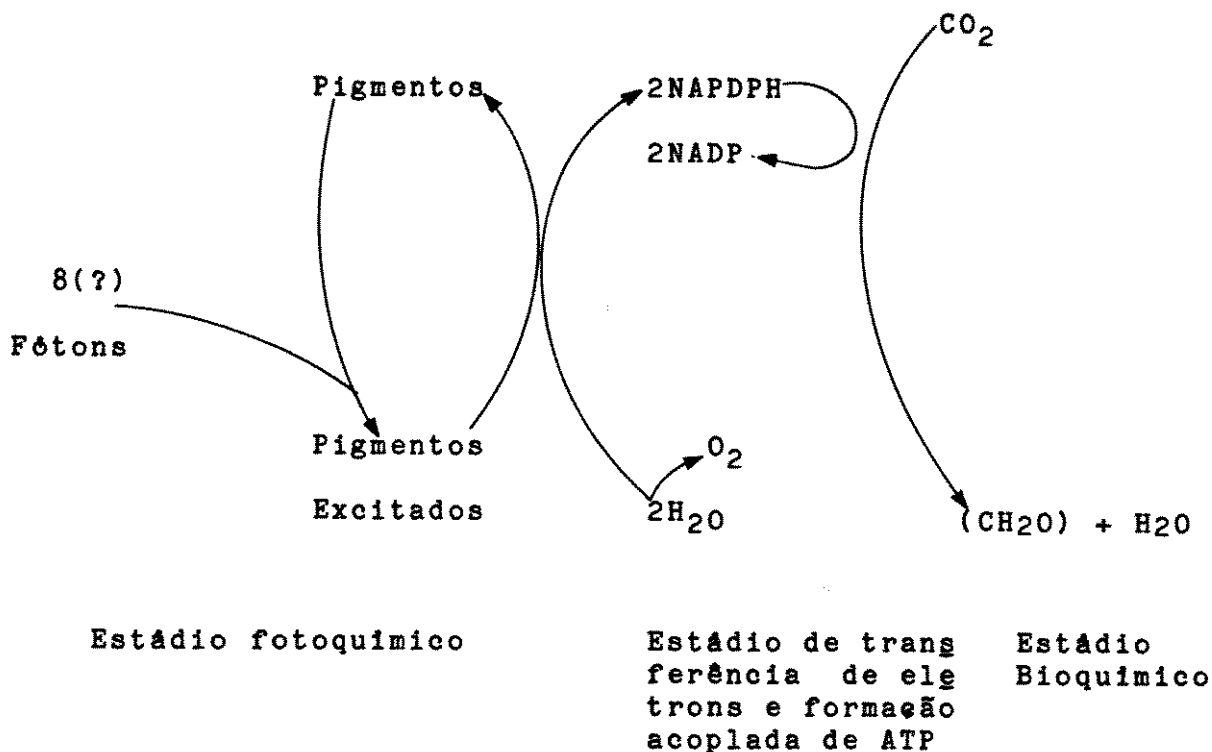


Fig. 1. Esquema do processo fotoquímico acoplado à assimilação do CO_2 (NOBEL, 1974).

Para a realização do processo fotoquímico, que ocorre no centro de reação, a luz precisa ser captada, sendo uma função realizada por conjuntos de pigmentos absorvedores da radiação luminosa, organizados na estrutura denominada antena (CLAYTON, 1980; HALL & RAO, 1981; MAGALHÃES, 1985). Esses pigmentos compreendem, principalmente, as clorofilas "a" e "b", bem como os vários pigmentos acessórios. Dos pigmentos colhedores de luz, a energia de excitação eletrônica, resultante

da absorção da luz, é transferida para o centro de reação (MATHIS & PAILLOTIN, 1981; HILLER & GOODCHILD, 1981; GLAZER, 1981).

O Centro de Reação e os conjuntos de pigmentos que compõem a antena formam a unidade fotossintética (PSU) representada por um número mínimo de moléculas de clorofila envolvidas na absorção de 1 (um) quantum de energia (SCHIMID & GAFFRON, 1968; MATHIS & PAILLOTIN, 1981; MALKIN et alii, 1981).

Após a absorção da luz (excitação) pelas moléculas de clorofila, os elétrons que receberam a energia passam do estado estável ou fundamental (S_0) para os estados excitados singlet 1 (S_1) ou singlet 2 (S_2), dependendo da energia do quantum absorvido.

Após a excitação eletrônica acontece a desexcitação das moléculas, que pode ocorrer por diferentes processos: a) desexcitação não radiativa, com emissão de calor; b) emissão de fluorescência; c) transferência de energia ou elétrons para moléculas de pigmentos ou outros compostos associados aos Centros de Reação (BUSCHMANN et alii, 1984).

Se a energia radiante absorvida por uma folha não for utilizada para realizar fotossíntese (trabalho fotoquímico), será convertida em calor e fluorescência. O balanço de energia do processo resulta em: E_a (Energia absorvida) = E_f (fluorescência) + E_c (calor) + E_f (fotossíntese).

Portanto, quando a fotossíntese é máxima a emissão de fluorescência e a liberação de calor são mínimos. Ao contrário, se a fluorescência e emissão de calor aumentam, o rendimento quântico fotossintético é reduzido (BUSCHMANN et alii,

1984). O aumento da fluorescência é observado quando se aplica um inibidor fotossintético, como o Dichlorophenyldimethylurea (DCMU), que bloqueia o transporte fotossintético de elétrons, entre o extintor (Q) e a plastoquinona (PQ).

O traço típico da cinética de indução da fluorescência da clorofila A, de uma folha adaptada ao escuro na temperatura ambiente (20-30°C), é mostrado na figura 2.

O sinal da fluorescência exibe fases características, com níveis de fluorescência denominados O, I, D, P, S, M, T (KRAUSE & WEISS, 1984). O nível O (F_0) significa um valor mínimo de fluorescência, observado após um período escuro, quando todos os Centros de Reação do PSII estão "abertos" (moléculas de quinona (Q) não reduzidas). Admite-se que o nível F_0 representa emissão de fluorescência por moléculas de clorofila A excitadas da antena, que ocorre antes dos excitons (elétrons ejetados das moléculas ao nível da antena) terem migrado para os Centros de Reação (MATHIS & PAILLOTIN, 1981). O exame do sinal da cinética rápida (Fig. 2A) mostra que, a partir de F_0 a curva de indução continua a crescer rapidamente até o pico P de fluorescência máxima (F_m), significando que as moléculas Qa receberam elétrons do PSII e reduziram-se. Este aumento rápido mostra duas fases: na primeira um ponto máximo denominado inflexão (I), seguido por depressão (D) em uma segunda fase. F_v é a fluorescência variável e representa o incremento entre F_0 e F_m ($F_v = F_m - F_0$). O valor F_v origina-se de pigmentos do PSII, e está correlacionado com a disponibilidade de moléculas Quinonas (Q) receptores (DUYSENS & SWEERS, 1963, citados por OQUIST & WASS, 1988).

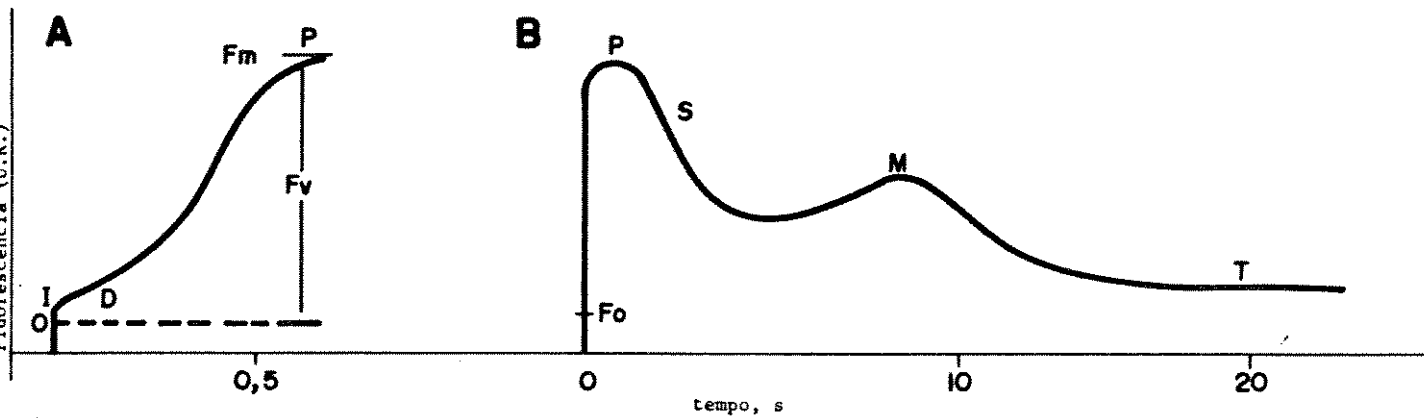


Fig. 2. Sinal característico da cinética de indução da fluorescência de uma folha adaptada ao escuro ($t = 30$ min). A - Cinética rápida; B - Cinética lenta. Adaptado de Oquist & Wass, 1988.

A cinética lenta da fluorescência (Fig. 2B), que se inicia em P, apresenta uma fase de extinção rápida S, seguida de um aumento (M) proveniente de fluorescência secundária originada, provavelmente, da transferência de energia entre pigmentos. A emissão novamente decai até atingir um estado estável ou terminal T de extinção máxima.

A cinética lenta da fluorescência depende, além do estado redox de Q, também de mudanças conformacionais provocadas pelo gradiente de pH na membrana tilacoide e, em menor intensidade, de fosforilação do complexo "clorofila-proteína colhedores de luz" (LHCP)(MATHIS & PAILLOTIN, 1981). O oxigênio também pode receber elétrons da cadeia de transporte de elétrons, tendo efeito competitivo sobre o estado de oxidação de Q, influenciando assim sobre a capacidade extintora de Q (FRAZER et alii, 1987).

Nos últimos anos medições da emissão de fluorescência pela clorofila A vem sendo intensamente utilizada em vários estudos de fisiologia vegetal. Destacam-se sua utilização na determinação da reação de plantas a herbicidas do grupo ureia (FEDTKE, 1982; HARRIS & CAMLIN, 1988), na avaliação do tamanho das unidades fotossintéticas (MALKIN & FORK, 1981), um possível uso como método para monitoramento de respostas fotossintéticas a estresse hídrico (OGREN & OQUIST, 1985), de discriminação de plantas resistentes ao frio (BARNES & WILSON, 1984; SUNDBOM & OQUIST, 1982), e de avaliação do balanço nutricional com interesse especial para cátions (BAKER, 1978).

As vantagens da determinação da fluorescência são, principalmente, a portabilidade dos equipamentos atuais, seu

custo relativamente baixo, facilidade de manuseio e obtenção rápida de dados.

2.2. Rendimento Quântico

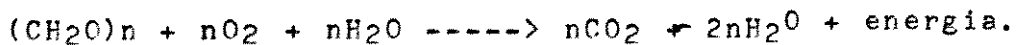
O rendimento quântico (Q) representa a eficiência de utilização da luz pela fotossíntese, indicado pela razão entre o número de moles de O_2 liberados (ou de CO_2 fixado) por mol de fótons absorvidos pelo aparelho fotossintético, na ausência da fotorrespiração (EVANS, 1987; BJORKMAN & DEMMIG, 1987). O rendimento quântico máximo somente pode ser obtido em baixos valores de densidade de fluxo de fótons, condições em que a intensidade da fotossíntese é proporcional à quantidade de luz incidente. Portanto, o rendimento quântico poderá ser avaliado, graficamente, através da inclinação inicial da curva de resposta da liberação de O_2 à níveis crescentes de radiação.

Se as frações de luz refletida e transmitida não forem levadas em consideração, o que se obtém, na verdade, é o rendimento quântico aparente. O rendimento quântico real é calculado utilizando apenas a luz realmente absorvida pelo tecido (LONG & HALLGREN, 1985).

2.3. Interação Fotossíntese Respiração

A equação empírica básica da fotossíntese, representada por: $nCO_2 + 2nH_2O + luz \rightarrow (CH_2O)_n + nO_2 + nH_2O$, mostra que, no cloroplasto, a reação envolvendo água e CO_2 , utilizando a energia da luz, produz carboidratos, $(CH_2O)_n$ e

O processo respiratório é representado pela equação:



Tanto as reações da fotossíntese como da respiração produzem quantidades de CO_2 e de O_2 estequiometricamente idênticas. Existem, porém, evidências sobre o efeito inibitório da luz na respiração mitocondrial envolvendo o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (GRAHAM & CHAPMAN, 1979). MANGAT et alii (1974) mostraram que, em ambiente livre de CO_2 , a respiração mitocondrial em células autotróficas era quase totalmente suprimida por altos níveis de ATP no citoplasma. Em condições ambiente normais, todavia, a respiração mitocondrial, na luz, difere pouco da respiração no escuro, à mesma temperatura (FARQUHAR & CAEMMERER, 1982).

O consumo ou a liberação de O_2 , bem como de CO_2 , podem resultar de outros processos bioquímicos, em especial fotorrespiração, reação de Mehler ou oxidação de fenóis, que interferem na estequiometria dos processos fotossintético e respiratório.

Na fotorrespiração ocorre a absorção do oxigênio e a formação de CO_2 em reações associadas com a fotossíntese. Para cada $1/2$ mol de CO_2 liberado, um mol e meio de O_2 são consumidos no processo fotorrespiratório, sendo um mol para cada mol de glicolato formado e meio mol na sua oxidação a glioxilato. Esta alta taxa de consumo de O_2 é balanceada pela sua própria liberação durante a redução fotossintética do 3-P-Glicerato. (TOLBERT, 1979). Sabendo-se que, nas reações fotoquímicas a liberação de O_2 está acoplada à produção de ATP e NADPH, que

serão consumidos nos processos fotorespiratório e fotossintético, o balanço final resultante da integração do ciclo fotossintético de redução do carbono (PGR) e do ciclo fotorrespiratório de oxidação do carbono (PCO) é de um mol de O_2 consumido por mol de CO_2 liberado (TOLBERT, 1979; FARQUHAR & CAEMMERER, 1982).

TOLBERT (1979) e FARQUHAR & CAEMMERER (1982) mostraram que no processo fotossintético a razão CO_2 consumido e O_2 liberado é muito próxima da unidade. Porém, TOLBERT (1979, 1980) relata que no processo fotorrespiratório, pela sua dependência da luz, temperatura e concentrações de O_2 e CO_2 , e pelas interações múltiplas das reações metabólicas competitivas laterais, como para formação de glioxilato, glicina, serina e P-glicerato, torna-se difícil quantificar precisamente o total de O_2 consumido e de CO_2 liberado.

Outro processo que consome O_2 , denominado "Reação de Mehler", consiste na oxidação do receptor (ou receptores) de elétrons do fotossistema 1. Esta absorção do O_2 resulta na perda da capacidade fotossintética potencial. A absorção do O_2 , na reação de Mehler, resulta em uma produção igual de O_2 pelo fotossistema 2, com a troca líquida de O_2 igual a zero (TOLBERT, 1980; WALKER, 1986).

Quanto a oxidação de fênis, catalizada ou não por enzimas, parece não ser tão importante em tecidos intactos, mas sim em homogenados utilizados para purificação de enzimas (BUTT, 1980).

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Medições da Fluorescência da Clorofila A

As medições foram feitas utilizando-se detector de fluorescência Hansatech Ltd, modelo LD2 (Inglaterra), com fonte de luz de intensidade máxima de 235 $\mu\text{M}/\text{m}^2.\text{s}$ de fluxo de fótons (medido com quantômetro da LI-COR - Nebraska), ao nível do disco foliar. Esta fonte de luz apresenta pico de emissão em torno de 660 nm, com faixa de espectro entre 640-680 nm. Entre a folha e o detector de fluorescência o aparelho apresenta um filtro de interferência com banda de corte centrada em $740 \pm 10\text{nm}$, permitindo a passagem de parte do sinal da fluorescência, mas excluindo a luz actínica ou de excitação. A radiação da fluorescência que atravessa o filtro de interferência é detectada por fototransistor que, após amplificação do sinal, o retém na memória do próprio aparelho (ver Figura 3). Esse pode ser enviado tantas vezes quanto necessárias para o registrador potenciométrico, ou osciloscópio, ou microcomputador. No

presente caso utilizou-se de um registrador potenciométrico e um osciloscópio.

A temperatura da câmara porta-amostra é mantida aproximadamente constante, através de circulação de água com controle preciso de temperatura.

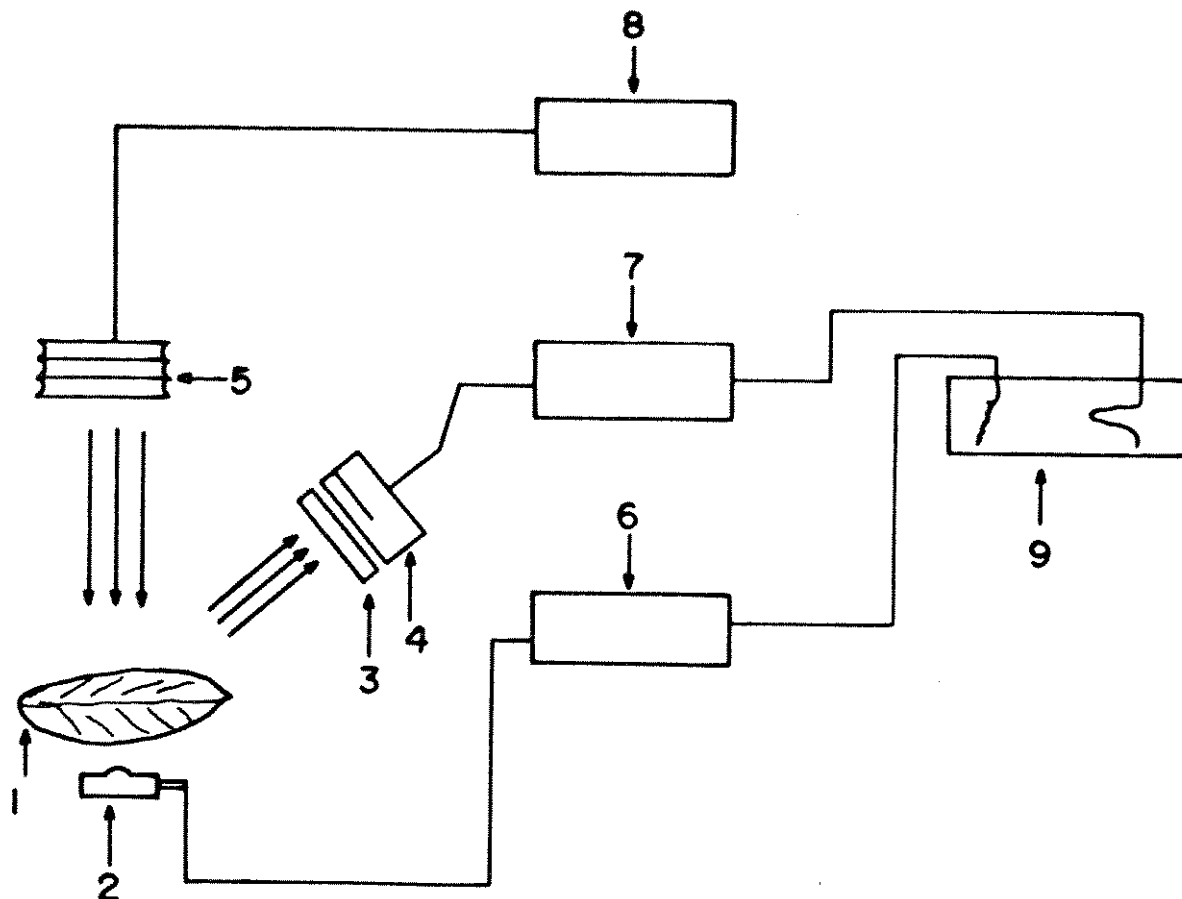
3.2. Cultivo das Plantas para os Experimentos 3.3; 3.4; 3.5 e 3.6

Foram utilizadas sementes da cultivar Carioca-80, plantadas em vasos de plástico com capacidade de aproximadamente 3,0 kg de solo. Para a adubação utilizou-se a fórmula 4-14-8, na quantidade de 2,7 g/vaso.

As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação com variação de temperatura noturna-diurna entre 15° e 30°C. Foram utilizados 10 vasos com três plantas por vaso após o desbaste, realizado logo após a emergência das plantas.

As folhas foram coletadas sempre do 3º nó da haste principal, procurando-se, assim, trabalhar com folhas de idades aproximadas.

As folhas foram coletadas na casa-de-vegetação, sendo o pecíolo imediatamente introduzido em um copo com água destilada e conduzidas para o laboratório para as medições. Não foram consideradas repetições para estes experimentos.



1. Folha da planta (disco foliar)
2. Eletrodo de Clark (conc. de oxigênio)
3. Filtro de interferência. Deixa passar parte da fluorescência (Banda $740 \pm 10\text{nm}$)
4. Detector da fluorescência (fototransistor)
5. Fonte de luz actínica (Leds)
6. Caixa amplificadora do sinal procedente do eletrodo de Clark
7. Caixa amplificadora do sinal procedente do detector de fluorescência, com memória para guardar o sinal
8. Caixa controladora da fonte de luz
9. Registrador potenciométrico.

Fig. 3. Desenho do sistema de detecção da fluorescência e do oxigênio.

3.3. Efeito da Temperatura na Determinação da Cinética de Indução da Fluorescência

Discos foliares foram retirados e imediatamente imersos em solução de DCMU 20 μM , contendo espalhante adesivo agral [Nonil fenóxi poli (etilenóxi) etanol] a 1%. O material foi submetido a vácuo (20 psi) por um minuto em um dessecador, sendo 30 segundos de vácuo seguido de despressurização, mais 30 segundos de vácuo e novamente despressurização. Após a aplicação do vácuo os discos foliares permaneceram aproximadamente 30 minutos imersos na solução para permitir melhor absorção do DCMU. Estas etapas foram realizadas em condições ambiente sob baixa luminosidade.

Em seguida um dos discos foi removido da solução, enxugado em papel toalha fino e levado para a determinação do sinal da fluorescência.

As diferentes temperaturas impostas durante as medições foram 10, 12, 25, 35 e 40°C. Estes níveis térmicos foram obtidos variando a temperatura do circulador de água conectado à câmara porta-amostra. Entre uma temperatura e outra esperou-se em torno de 15 minutos para que o sistema disco foliar-câmara porta amostra alcançasse o equilíbrio. A radiação fornecida para a excitação foi de 235 $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3.4. Efeito do Tempo de Adaptação ao Escuro na Cinética de Indução da Fluorescência

Para a realização do teste, um disco foliar foi colocado na câmara porta-amostra e os tempos escolhidos para o estudo da adaptação ao escuro, na própria câmara, foram de 1, 5, 15, 30 e 60 minutos. Em seguida, a luz actínica ($235 \mu\text{Mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) foi fornecida e o sinal de fluorescência mantido na memória do aparelho sendo, posteriormente, enviado para o registrador potenciométrico.

3.5. Cinética de Indução da Fluorescência Induzida por Diferentes Densidades de Fluxo de Fótons

As densidades de fluxo de fótons escolhidas para a indução da fluorescência foram de 45, 80, 130 e $235 \mu\text{Mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

O disco foi destacado do folíolo e transferido para a câmara porta-amostra para um período de adaptação ao escuro de 30 minutos antes da exposição à luz para a excitação. O sinal de fluorescência resultante foi armazenado na memória do aparelho e, posteriormente, enviado para o registrador potenciométrico.

3.6. Cinética da Indução da Fluorescência em Discos Foliáres Tratados e não Tratados com DCMU

Discos foliares foram removidos do folíolos do feijoeiro e colocados em placa de Petri contendo solução de DCMU $20 \mu\text{M}$. O material foi deixado para embebição durante 24 horas,

em condições ambiente de temperatura. O disco foi retirado da solução, enxugado com papel toalha macio, introduzido na câmara porta-amostra e deixado por 10 minutos para o estabelecimento do equilíbrio com o ambiente da câmara. A luz actínica foi ligada e o sinal registrado durante um minuto. Em seguida a iluminação foi desligada, guardado um período de escuro de 30 minutos, e novamente acionada a luz, registrando-se o sinal após este novo tempo de adaptação ao escuro.

O disco foliar não tratado foi retirado de outro folíolo da mesma folha utilizada para o tratamento com DCMU, e deixado em água destilada nas mesmas condições ambiente em que foi mantido o disco tratado. A primeira leitura da emissão de fluorescência ocorreu após um (1) minuto de adaptação ao escuro, quando a luz foi ligada e o sinal registrado por um (1) minuto. Em seguida a luz foi desligada, e após 30 minutos de nova adaptação ao escuro, nova medida foi feita.

3.7. Determinação da Cinética da Indução da Fluorescência e do Balanço de O_2 em 13 Genótipos de Feijão

3.7.1. Método usado para medir a liberação de O_2

A liberação de O_2 pela fotossíntese, ou o seu consumo pela respiração, foram quantificados com o uso de um eletrodo de Clark devidamente calibrado, conectado a uma câmara porta amostra (Hansatech Ltd).

O eletrodo foi preparado segundo recomendação do fabricante. O anodo (prata) e o catodo (platina) foram ligados

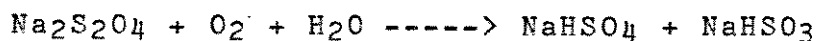
por uma ponte eletrolítica de solução de cloreto de potássio saturada, colocada numa depressão específica para tal finalidade e revestido por uma membrana de-Polytetrafluoroethylene (PTFE). Para assegurar a polarização do eletrodo foi necessário um período de estabilização de 2 a 3 horas.

O sinal de saída do equipamento, em mv, pode ser lido diretamente no mostrador do aparelho, enviado a um registrador potenciométrico, ou mesmo transferido para microcomputador através de uma interface. No presente caso a leitura do sinal foi feita diretamente, e também registrado em potenciômetro. Posteriormente, usando fator de calibração, o sinal em mv era convertido em concentração de O₂.

Mesmo na ausência de O₂ as reações eletroquímicas geram uma pequena "corrente residual"; deste modo, para uma calibração exata, esta discrepância entre "O₂ zero" e o "zero elétrico", deve ser eliminada.

3.7.2. Calibração do eletrodo

A calibração consistiu, primeiramente, em reduzir a concentração de oxigênio na superfície do eletrodo para obter o zero. Para isto colocou-se sobre o eletrodo uma gota de água destilada contendo alguns grânulos de ditionito de sódio, para eliminar o O₂. A reação que se processa é a seguinte:



O equipamento possui um dispositivo que, uma vez acionado, mantém o verdadeiro zero (elimina a corrente residual)

mesmo após a solução de ditionito ter sido removida e o eletrodo lavado por 2 ou 3 vezes com água destilada. Com a remoção do ditionito e o catodo exposto, o sinal gerado refletirá o conteúdo de O₂ do ar (21% de O₂). O eletrodo, assim preparado, foi colocado cuidadosamente na câmara.

3.7.3. Medição do O₂ de um disco foliar

Em um sistema fechado, a quantidade de O₂ depende da sua pressão parcial e do volume da câmara, sendo necessário portanto, a sua determinação. Antes de estimar o volume da câmara, é necessário prepará-la, introduzindo alguns dispositivos como disco metálico e esponja de nylon, com finalidades específicas citadas por WALKER (1986). A esponja de nylon é saturada com um (1) ml de solução tampão (uma parte de tampão 0,4 M de borato pH 9,0 e duas partes de solução de bicarbonato de sodio 1,0 M), previamente ajustada para pH 9,0 pela adição de carbonato de sodio equimolar, cuja finalidade é repor o CO₂ absorvido pelo tecido, mantendo a sua concentração aproximadamente constante.

O disco foliar é introduzido e a câmara fechada. Nestas condições é feita a leitura L₁ no mostrador do aparelho. Em seguida, com uma seringa, 1,0 ml de ar é injetado na câmara para a obtenção, após a estabilização, da leitura L₂. Com as leituras L₁ e L₂ faz-se o cálculo do volume v da câmara (WALKER, 1986).

$$v = L_1/L_2 - L_1$$

Como já visto anteriormente, com a remoção da

solução de ditionito do eletrodo o sinal em mv gerado deverá corresponder ao conteúdo de O₂ do ar, ou seja, 21% em volume. Assim, nas condições normais de temperatura e pressão, a quantidade de O₂ em 1.0 ml de ar é de 210 µl ou 210/22,414=9.37 µmol (sendo 22,414 o volume ocupado por um (1) mol de qualquer gás nas CNTP). Em qualquer outra temperatura (T) a quantidade pode ser calculada multiplicando-se 9.37 por 273/(273+T).

Considerando-se o volume total da câmara (v) a quantidade (Q) total de O₂ será

$$Q_{O_2} = k \cdot v \text{ em } \mu\text{Moles de O}_2/v,$$

$$\text{onde } k = 9.37 \cdot (273 / (273 + T))$$

Desta quantidade Q_{O₂} resulta o sinal L1 lido inicialmente, indicando que a relação Q_{O₂}/L1 será o fator que, multiplicado pela leitura em qualquer tempo (diferença entre uma determinada leitura num tempo t, 5 minutos, por exemplo, e L1) fornecerá a taxa de O₂ liberado ou consumido naquele momento dentro da câmara.

Encontrada a taxa de O₂ liberado ou absorvido por um disco de 10 cm², por hora, calcula-se a taxa corrigida, em µM de O₂/m²/s, pela equação:

$$\text{Moles O}_2/\text{m}^2/\text{s} = \mu\text{M}/\text{hora}/\text{disco} \times 10000/3600 \times 10$$

O eletrodo de Clark é muito sensível a variações de temperatura que por esta razão deve ser muito bem controlada. Nesse caso, para o seu controle, a câmara possui uma jaqueta por onde circula água, proveniente de banho com controle termostático.

3.7.4. Cultivo das plantas para o experimento

Considerando as dificuldades operacionais para as determinações das trocas de O_2 e emissão da fluorescência, simultaneamente, nos 13 genótipos selecionados, os testes foram realizados em grupos de 4 genótipos, com 3 repetições para cada um, tendo sempre a cultivar Carioca como testemunha (Tabela 1). As sementes para o plantio foram cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e Feijão (CNPAP), de Goiânia (GO). Para garantir a pureza dos genótipos as sementes procedentes do CNPAP foram plantadas em casa de vegetação, sendo cada planta de um mesmo genótipo colhida separadamente. Assim, para o experimento foram utilizadas sempre sementes procedentes de uma mesma planta.

O plantio dos genótipos para as determinações de O_2 e da fluorescência foi feito em casa-de-vegetação com controle de temperatura ambiente. Foram utilizados vasos com capacidade de aproximadamente 3.0 kg de solo. Como adubo utilizou-se a fórmula 4-14-8 na quantidade de 2.7g/vaso.

3.7.5. Medição da liberação ou consumo de O_2 pelo disco foliar dos genótipos

Para a realização das medições de concentrações de O_2 , as folhas, totalmente expandidas, foram destacadas da planta, sempre do 3º nó da haste principal, sendo transportadas para o laboratório com os pecíolos imersos em água, onde permaneceram por 5 minutos até a retirada dos discos. Esse tempo foi utilizado para assegurar equilíbrio com as novas condições de temperatura do laboratório. Na câmara, após o fornecimento de luz, o disco

Tabela 1. Genótipos utilizados, agrupados em 4 grupos, tendo em cada um o Carioca, que serviu como comparação. São mostradas as datas do plantio e da medição.

Grupo	Genótipo	Data Plantio	Data Medição
1	Carioca-80	11/11/88	8/12-11/12/88
	CNF 0480 (Honduras 35)		
	CNF 5455 (IPA 6)		
	CNF 4544 (A 295)		
2	Carioca-80	21/04/89	13/06-15/06/89
	CNF 4844 (LM 21307-0)		
	CNF 4842 (LM 21303-0)		
	CNF 4600 (LM 00252-0)		
3	Carioca-80	09/05/89	13/06-15/06/89
	CNF 4786 (LM 30030-0)		
	CNF 5547 (AN 511608-0)		
	CNF 5529 (SX 2232-0)		
4	Carioca-80	25/05/89	27/06-29/06/89
	CNF 5598 (EMPASC 201)		
	CNF 5520 (AN 12717-0)		
	CNF 5539 (AN 11648-0)		

foi deixado para atingir o equilíbrio por mais 5 minutos, antes do início das leituras.

Experimentos preliminares foram conduzidos para avaliação da fotossíntese em folhas com diferentes idades, utilizando uma planta da cultivar Carioca 80. Os resultados das determinações com folhas provenientes dos diferentes nós da haste principal, são mostrados na Tabela 2 e Figura 4.

3.7.6. Medição da cinética de indução da fluorescência

O sinal da fluorescência foi detectado, primeiramente, no mesmo disco em que foram feitas as medidas da liberação de O_2 e, posteriormente, em outro disco tratado com DCMU, conforme método descrito em 4.1.

Para a detecção do sinal, o disco foliar foi deixado na câmara com a luz desligada por pelo menos 30 minutos, para que todos os centros de reação se tornassem "abertos" ("Quencher" não reduzido). Após esse período foi fornecida a luz actínica e o sinal, além de ser gravado na memória do aparelho, foi simultaneamente registrado no potenciômetro, em baixa velocidade (6 cm/minuto). Posteriormente o sinal foi reenviado da memória para o registrador potenciométrico na velocidade de 60 cm/minuto. Nesta velocidade foi possível detectar o ponto de fluorescência mínimo F_0 . A fluorescência máxima (F_m) foi facilmente detectada, tanto com o registrador em velocidade mínima, como em máxima.

Para o disco tratado com DCMU o procedimento para a obtenção do sinal foi o mesmo, exceto que, neste caso, a luz

Tabela 2. Taxas de libera o de O₂ de folhas de diferentes nós (idades) da haste principal de uma planta da cultivar Carioca-80:-

Folha do N�	$\mu\text{M O}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$
1	-
2	-
3	4.600
4	4.722
5	5.313
6	5.940
7	6.390
8	4.688
9	-
10	-

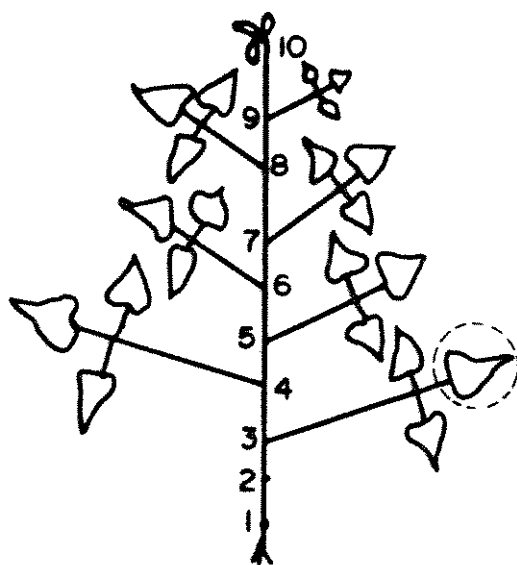


Fig. 4. Planta de feijão mostrando seus diferentes nós da haste principal. N  1   o nó cotiledonar. O disco foi retirado do folhelo central.

para excitação foi fornecida logo após a introdução do disco foliar na câmara, sem adaptação ao escuro.

Obtidos os valores de F_o , F_m e F_t , foram calculadas as eficiências fotoquímicas (E_f) e do "Quencher" ou Extintor (E_q) do PSII, utilizando-se as relações:

$$E_f = (F_m - F_o) / F_m.$$

Como $F_m - F_o$ é igual a F_v , resulta que:

$$E_f = F_v / F_m \text{ e } E_q = (F_m - F_t) / F_o,$$

onde: F_m = fluorescência máxima, F_o = fluorescência mínima, F_t = fluorescência terminal e F_v = fluorescência variável (KITAGIMA & BUTLER, 1975; BUTLER, 1978; MIRANDA et alii, 1981; BJORKMAN & DEMMIG, 1987).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cinética de indução da fluorescência de uma folha de feijoeiro, apresentada no osciloscópio, é mostrada na figura 5 (foto). Não há diferença nas características básicas do sinal de indução de fluorescência de uma folha de feijoeiro e de outra folha de outra espécie qualquer (BAKER, 1978). Basicamente ele consiste da fluorescência inicial, constante, F_0 , da fluorescência máxima, F_m , e da fluorescência terminal F_t , que são os parâmetros mais importantes do sinal para os objetivos deste trabalho. O valor F_t , representa a fluorescência após o primeiro minuto do fornecimento da luz de excitação, enquanto a verdadeira fluorescência terminal, ou de equilíbrio, só é alcançada depois de dois minutos, ou mais. Foi considerado F_t como fluorescência terminal porque o sinal para estudo, para todos os tratamentos, foi registrado no período de um minuto, que é a capacidade máxima que a memória do aparelho é capaz de armazenar.

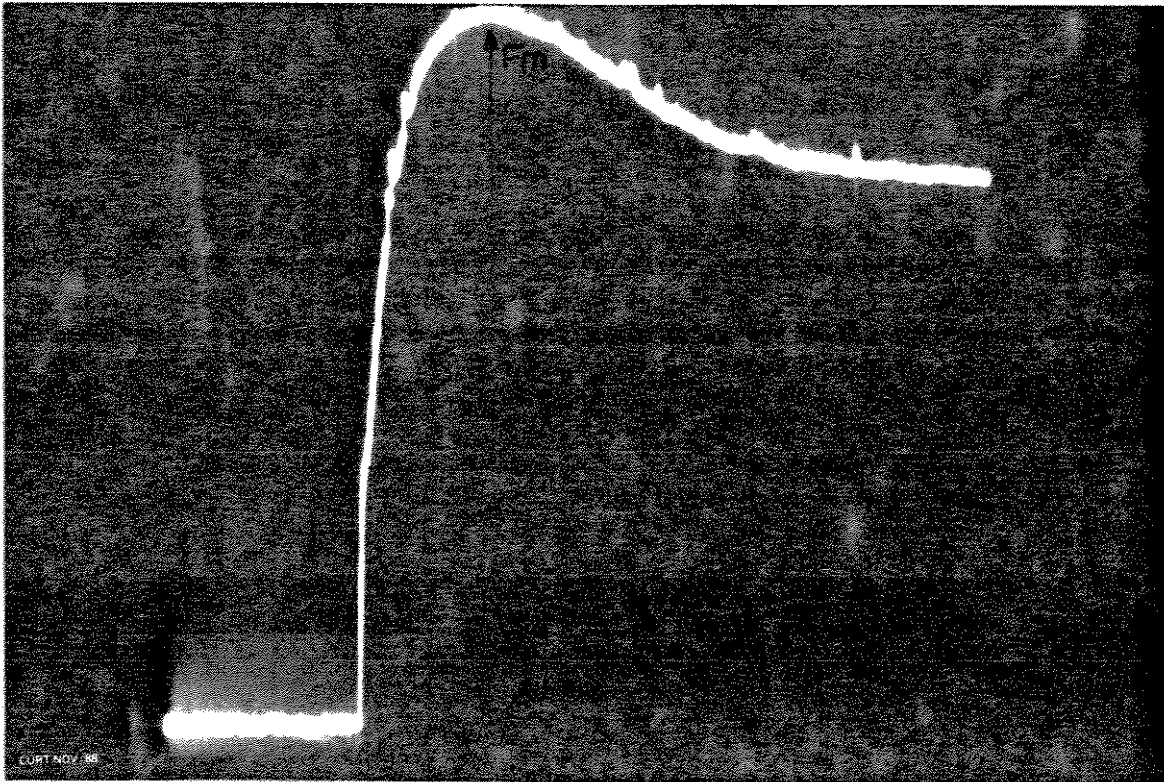


Fig. 5. Sinal da indução da fluorescência de um disco foliar de feijoeiro. Foto tirada da tela de osciloscópio. Fo é fluorescência mínima; Fm é máxima; Ft, terminal e Fv, variável.

Visando calcular as eficiências dos processos fotoquímicos (E_f) e do "Quencher" ou extintor (E_q), foi necessário obter F_m para o extintor (Q) no estado totalmente reduzido (C-), que reflete a F_m real. Este estado é obtido quando se interrompe a cadeia de transporte de elétrons pelo fornecimento de DCMU ao tecido fotossintetizante (BAKER, 1978; WALKER, 1986), ou baixando a temperatura do tecido a 77k (KRAUSE & WEISS, 1984) ou, alternativamente, permitindo o tecido foliar se adaptar ao escuro por algum tempo.

A primeira etapa do trabalho, para utilização da emissão da fluorescência como estimativa da fotossíntese, foi testar alguns métodos para a obtenção do sinal mais significativo, para explicar a hipótese deste trabalho.

4.1. Efeito da Temperatura na Cinética de Indução da Fluorescência

As medidas foram feitas em discos de folíolos embebidos com DCMU, visando a obtenção do valor de F_m real, proporcional a quantidade de "Quencher" realmente presente. O tratamento com DCMU foi incluído com o objetivo de evitar que outros fatores, que não a temperatura, pudessem alterar as leituras, mascarando os resultados.

Como mostram os resultados apresentados na figura 6, os sinais de fluorescência coincidem totalmente nas temperaturas de 10 e 12°C, diferença considerada muito pequena para alterar o fenômeno. A figura mostra sinais de fluorescência menores quando a temperatura aumenta. Como os discos foram

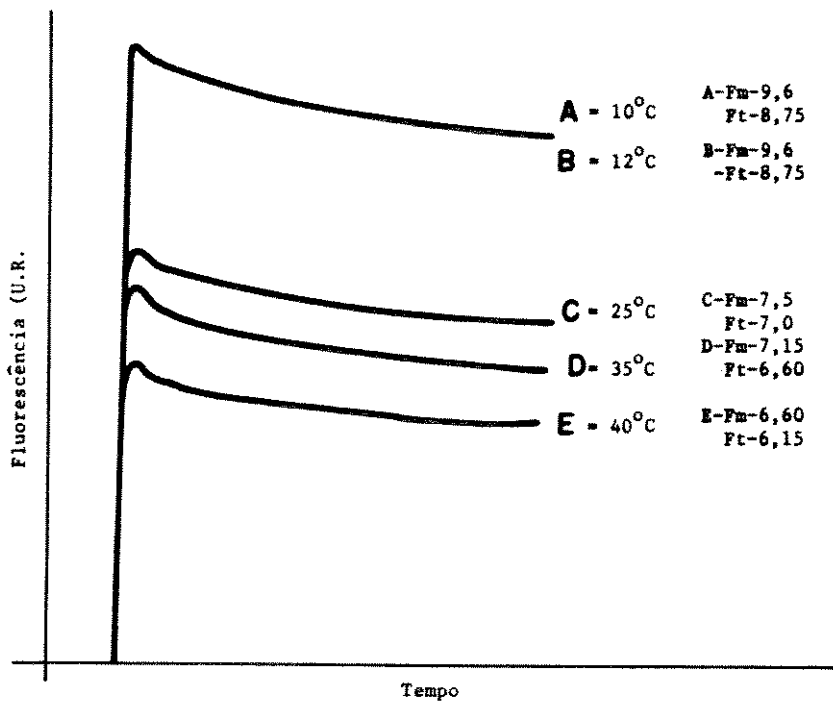


Fig. 6. Cinética de indução da fluorescência de discos de folha embebidos com DCMU, submetidos a diferentes temperaturas.

tratados com DCMU, pressupõe-se o bloqueio, pelo menos parcialmente, da cadeia transportadora de elétrons, sugerindo que o processo de redução do extintor ($Q^+ \rightarrow Q^-$) é afetado pela temperatura. Em temperaturas muito elevadas poderá ocorrer um novo aumento da fluorescência variável (Fv), com a inativação do processo enzimático de fixação do CO_2 , ou o seu desaparecimento total pelo desacoplamento do sistema liberador de oxigênio (TOINOVEN & VIDAVER, 1988). Neste caso ocorreria oxidação das moléculas de clorofila, e a tendência de Fm reduzir-se a Fo.

Neste trabalho foi utilizada uma mesma temperatura para a câmara porta amostra para cada grupo de plantas mostradas na tabela 1. Para os três primeiros grupos trabalhou-se com a temperatura de 25°C, e para o 4º com a temperatura de 20°C. Estas temperaturas foram escolhidas porque eram as que mais se aproximavam da temperatura do laboratório na época das medições.

4.2. Efeito do Tempo de Adaptação ao Escuro na Cinética de Indução da Fluorescência

A figura 7 mostra os resultados da medida da emissão da fluorescência em disco de folha que permaneceu no escuro por diferentes períodos de tempo. Os dados indicam que quanto maior o tempo em que o disco de folha permanece no escuro maior é o sinal da fluorescência emitida, refletindo a quantidade relativa de "Quencher" ou extintor no tecido. Como o equipamento não capta todos os fótons de fluorescência emitidos, a fluorescência é medida em unidades arbitrárias ou relativas

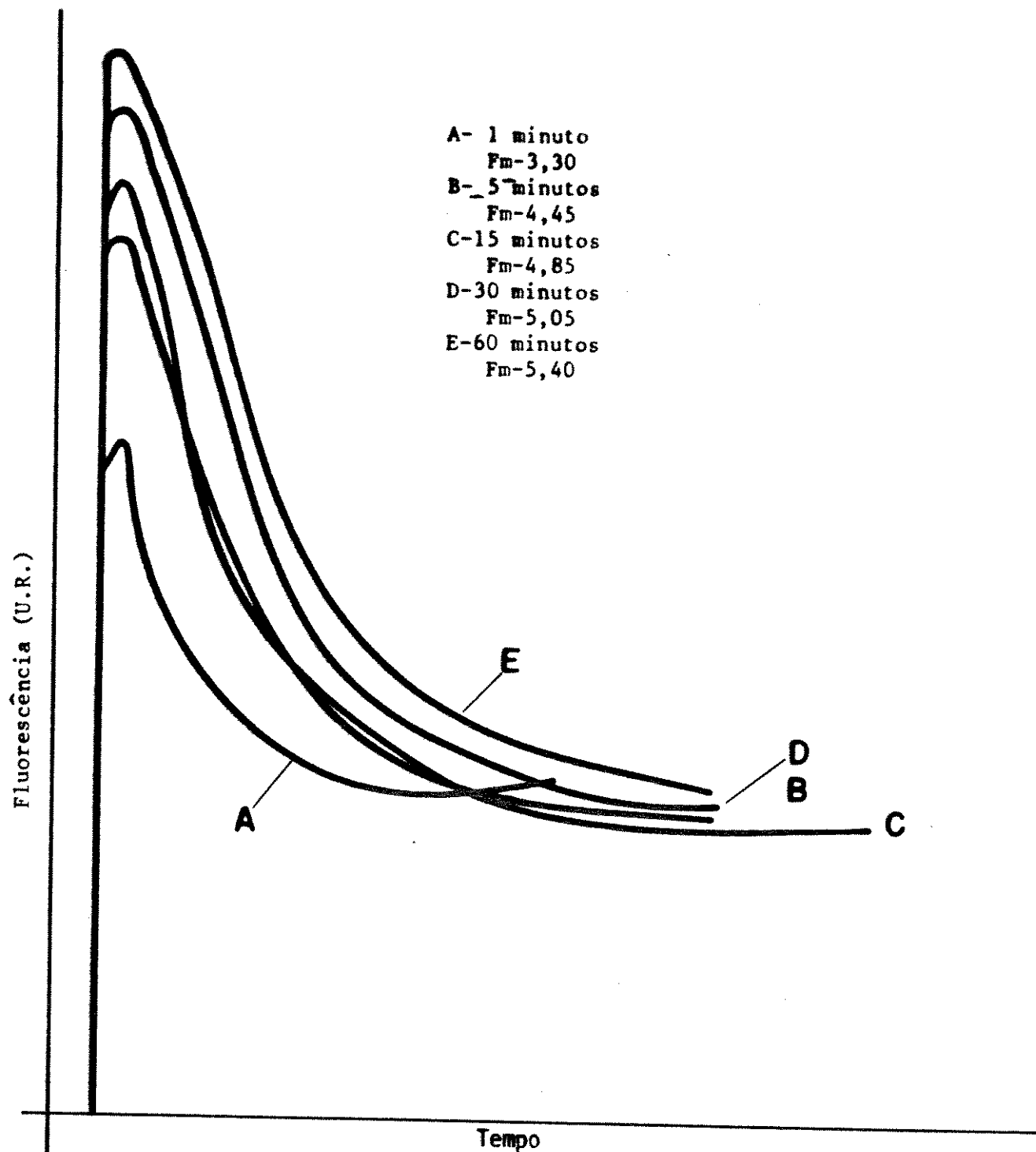


Fig. 7. Efeito da duração do período de adaptação ao escuro sobre o sinal da fluorescência.

(U.R.). O valor de F_m , portanto, não reflete a atividade total de Q. A literatura indica que, em geral, o tempo de adaptação de 30 minutos é suficiente para que todo o "Quencher" atinja o seu estado não reduzido (BAKER, 1979; WALKER, 1986). No entanto, no caso de folha de feijoeiro, o tempo de 30 minutos de escuro foi insuficiente, pois o sinal foi maior quando utilizados 60 minutos de adaptação (Figura 7). Entretanto, optou-se por determinar os sinais de todos os tratamentos após um período de 30 minutos de escuro, pois um tempo de adaptação maior do que este seria demasiadamente longo prejudicando o desenvolvimento normal do trabalho. Não haveria, por exemplo, tempo suficiente para realizar o número de leituras indispensáveis por dia.

4.3. Cinética de Indução da Fluorescência Induzida por Diferentes Densidades de Fluxo de Fótons

A figura 8 mostra os dados da cinética de indução da fluorescência induzida em discos foliares submetidos a diferentes densidades de fluxo de fótons, após 30 minutos de permanência no escuro. A fluorescência máxima ($F_m = 6,2$) foi obtida com maior densidade de fluxo de fótons ($235 \mu M m^{-2} s^{-1}$; sinal A), sendo este o maior nível de fótons fornecido pela configuração de LEDs utilizada. Como não se dispunha de uma fonte de luz mais energética, de modo que pudesse excitar o máximo possível de moléculas de pigmentos, optou-se por utilizar este nível ($235 \mu M m^{-2} s^{-1}$) para todos os tratamentos.

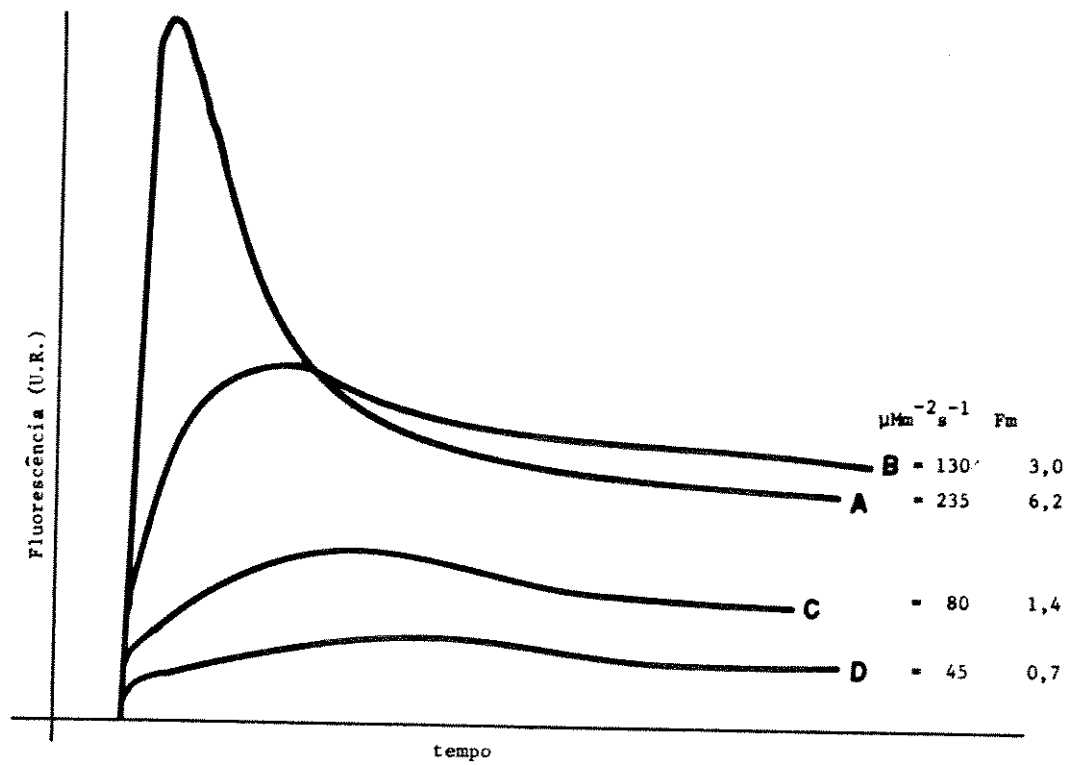


Fig. 8. Cinética de indução da fluorescência induzida em discos de folhas por diferentes densidades de fluxo de fótons, após 30 minutos de escuro.

4.4. Efeito do DCMU na Emissão de Fluorescência

Os resultados da cinética de indução da fluorescência de um disco foliar não tratado com DCMU, após 30 minutos de adaptação ao escuro, e de um segundo disco sem tratamento com DCMU, sem adaptação ao escuro, são mostrados na figura 9. No caso do disco não tratado com DCMU, entre F_0 e F_m observa-se uma cinética um pouco mais lenta do que a evidenciada no disco tratado, significando que elétrons estão sendo transferidos pela cadeia transportadora a partir de Q ou

$Q + e^- \rightarrow Q^- + P \rightarrow Q^+ + P^-$, sendo P o carreador após Q. Portanto, entre F_0 e F_m , sem a presença de DCMU, existe um equilíbrio entre Q^- e Q^+ de modo que $Q^- + Q^+ = Q_{total}$, sendo a fluorescência em qualquer instante entre F_0 e F_m proporcional a quantidade de Q reduzido (Q^-), ou inversamente proporcional a Q^+ .

O tratamento com DCMU deve bloquear a cadeia de transporte de elétrons, isto é, nenhum elétron avança além de Q. Com isto o equilíbrio $Q^- \rightleftharpoons Q^+$, fica totalmente deslocado no sentido de Q^- , obtendo-se um sinal de fluorescência que reflete a real proporção de "Quencher" na amostra. Assim, espera-se que o valor de F_m de um disco tratado com DCMU seja sempre maior do que de um disco não tratado.

De acordo com a lei de Starck-Einstein, cada quantum de luz absorvido ativa unicamente uma molécula e, se desta molécula um único elétron por quantum é lançado para Q, resultará que cada quantum emitido sob a forma de fluorescência representará uma molécula de pigmento captadora de luz (CLAYTON, 1980). Em resumo, em qualquer instante a intensidade da emissão

da fluorescência de um componente é um indicador do número de moléculas excitadas.

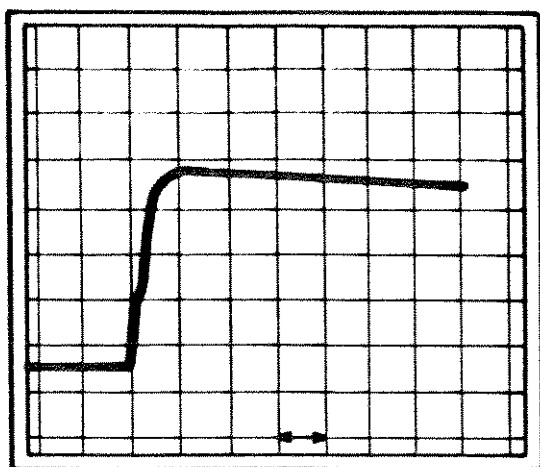
Do exposto, é de se esperar que um disco foliar embebido com DCMU deve produzir uma F_m maior do que o produzido por um disco sem DCMU, mesmo deixado no escuro por certo tempo (30 minutos no caso). Isto é verificado, por exemplo, quando se trabalha com espinafre (BAKER, 1978; WALKER, 1986). No caso de discos foliares de feijoeiros, a absorção do DCMU parece não ser eficiente, como mostram os resultados apresentados nas figuras seguintes.

4.5. Comparação de Características da Emissão da Fluorescência entre Genótipos de Feijoeiros

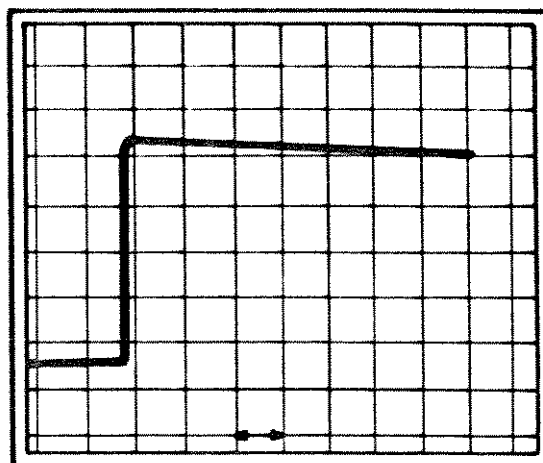
Para os 4 primeiros genótipos de feijão testados (1º grupo) foram usados 2 métodos para a obtenção do sinal máximo de fluorescência: 1) discos de folhas tratadas com DCMU; 2) discos não tratados, adaptados ao escuro na própria câmara de medição, por 30 minutos.

A figura 10 mostra a cinética da indução de fluorescência lenta (a) e rápida (b) de três pares de discos foliares (A, B e C) do genótipo CNF 0480, sendo 3 (três) discos tratados com DCMU e 3 (três) não tratados. O sinal da fluorescência é mostrado no gráfico em unidades relativas (U.R.), uma vez que apenas parte da fluorescência emitida chega ao sensor do aparelho.

Os resultados mostram os valores de fluorescência máxima (F_m), terminal (F_t), mínima (F_o), eficiência do "Quencher"



TEMPO \longleftrightarrow = 0,2 ms



TEMPO \longleftrightarrow = 0,2 ms

Fig. 9. Cinética de indução de fluorescência de um disco foliar tratado com DCMU, adaptado ao escuro por 30 minutos, e de um disco não tratado com DCMU (sem adaptação ao escuro). Cada divisão representa 0,2 milisegundos na tela do osciloscópio.

(Eq) e eficiência fotoquímica (Ef) de discos de folha não tratados com DCMU. Os parâmetros com subíndice "d" significam que os discos foram tratados com DCMU. Pn representa o calanço de Oxigênio dos discos de folha tratados com DCMU sob luz.

Como já relatado (itens 2.1 e 4.4) a fluorescência máxima (Fm) dos discos de folhas tratados com DCMU deve ser maior do que dos discos não tratados. Porém, pelos resultados obtidos verifica-se que, embora todos os discos foliares tenham sido submetidos aos mesmos tratamentos, os valores de fluorescência máxima dos discos tratados nem sempre foram maiores do que dos não tratados. Por exemplo, o valor de Fm do disco tratado (Fmd) foi maior em A (Fmd = 8,7; Fm = 8,1), menor em B (Fmd = 7,45; Fm = 8,1) e aproximadamente iguais em C (Fmd = 7,35; Fm = 7,4). Outro dado interessante refere-se a liberação ou consumo de O₂ pelos discos tratados com DCMU, sob fluxo de fótons de 235 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Na figura 10A verifica-se que houve uma alta taxa de consumo de O₂ (Pn), de 3,730 $\mu\text{M O}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, indicando que o fluxo de elétrons na cadeia de transporte de elétrons foi interrompida. Consequentemente, não houve, provavelmente, produção de O₂ na reação de foto-oxidação da água, mas apenas consumo pelo processo respiratório. A eficiência do "Quencher" do disco tratado com DCMU (Eqd) foi igual a 0,201, bem menor do que o disco foliar não tratado (Eq), que foi igual a 0,735. Na verdade, o Eqd deveria ser zero ou mais próximo do zero possível, pois, se o extintor de fluorescência (Q) está no estado reduzido (estado Q-) não poderia haver extinção alguma refletindo sinal máximo de fluorescência. Porém, é provável que existam outros extintores capazes de receber elétrons, entre outros, o estado

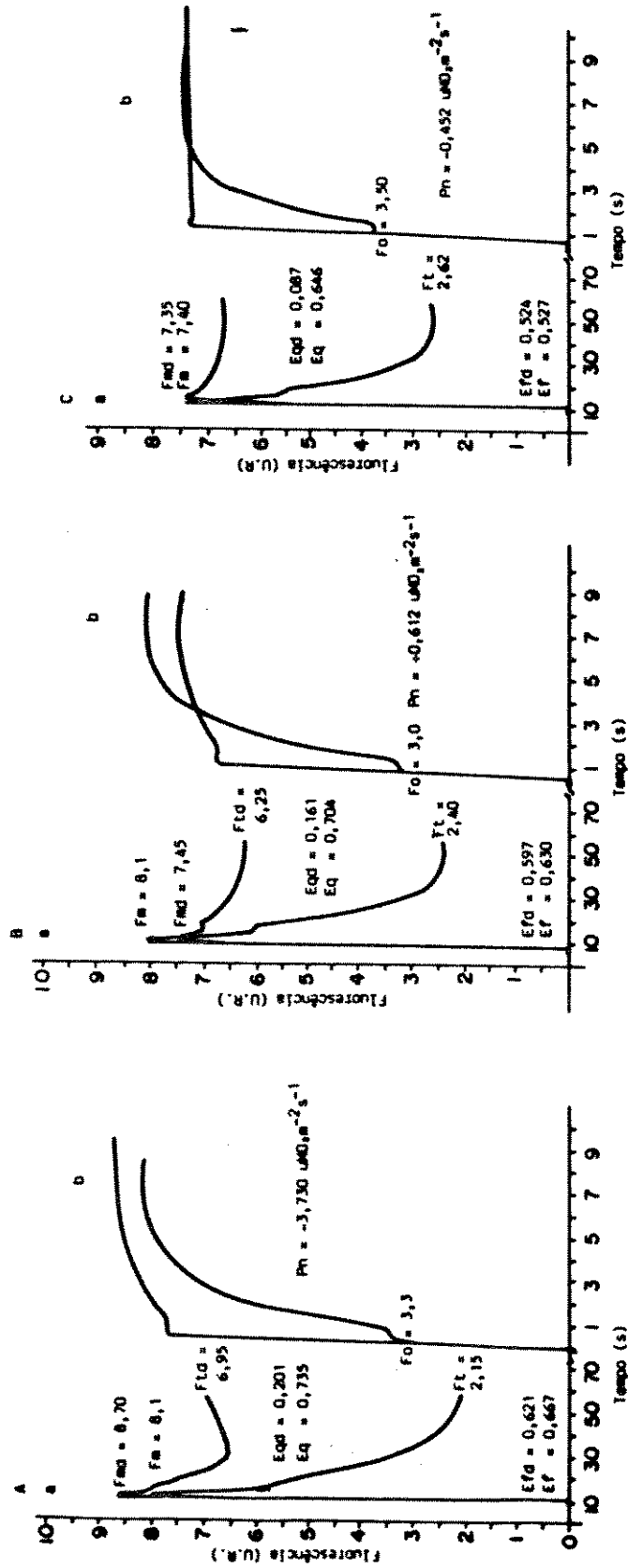


Fig. 10. Cinética da indução de fluorescência lenta (a) e rápida (b) de três discos foliares (A, B e C) do genótipo CNP 0 480, tratados com DCMU (subíndice d) e não tratados. Os discos não tratados com DCMU permaneceram no escuro durante 30 minutos, antes de receberem a luz de excitação. Pn é a produção ou o consumo de O₂ pelos discos foliares tratados com DCMU, sob 235 μM fótons m⁻² s⁻¹.

triplet dos carotenoides e o estado excitado singlet da clorofila, (MATHIS & PAILLOTIN, 1981). Os resultados sugerem que, neste caso, houve uma eficiente absorção do DCMU pelo disco foliar.

Contrariamente à figura 10A, que mostra o consumo de O_2 pelo disco tratado com DCMU, observa-se na figura 10B que um disco extraído da mesma planta, não obstante todos os tratamentos terem sido idênticos, apresentou uma taxa de liberação de O_2 (P_n) de $0,612 \mu M O_2 m^{-2} s^{-1}$. Este resultado, aliado ao fato de que F_{md} (7,45) foi menor que F_m (8,1), indica que aparentemente este disco foliar não absorveu o DCMU adequadamente, isto é, não houve bloqueio completo da cadeia de transporte de elétrons. Mesmo assim, ao contrário do que se esperava, a eficiência do "Quencher" do folíolo embebido com DCMU ($E_{qd} = 0,161$) foi menor do que do disco foliar descrito na figura 10A ($E_{qd} = 0,201$).

Na figura 10C os valores de fluorescência máxima dos discos foliares tratados e não tratados com DCMU mostraram-se aproximadamente iguais. A eficiência do quencher do disco foliar tratado com DCMU ($E_{qd} = 0,087$) foi a menor em relação aos outros dois valores apresentados (0,201 e 0,161). Neste caso, como no primeiro (Figura 10A) houve consumo de O_2 ($P_n = 0,452 \mu M O_2 m^{-2} s^{-1}$) indicando que a cadeia de transporte de elétrons foi parcial ou totalmente bloqueada pelo DCMU. Houve então uma boa relação entre o baixo valor da eficiência do quencher ($E_{qd} = 0,087$) e a eficiência de absorção do DCMU pelo disco foliar.

A figura 11 mostra os sinais da cinética de indução da fluorescência de discos de folhas do genótipo CNF

5455. Da mesma forma que os resultados mostrados para o genótipo anterior, também neste caso os dados parecem ser inconsistentes. Na figura 11A, por exemplo, a fluorescência máxima ($F_m = 8,75$) do disco não tratado com DCMU é aproximadamente igual a do disco tratado ($F_{md} = 8,8$). O disco tratado produziu $2,040 \mu\text{M O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ sob $235 \mu\text{M}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, com uma eficiência do "quencher" (E_{qd}) igual a $0,407$. Portanto, embora tenha ocorrido liberação fotossintética de O_2 , ela foi menor do que para um disco foliar não tratado, como mostra a tabela 4. Os resultados das determinações de P_n e E_{qd} mostram que a absorção do DCMU foi muito pouco eficiente. A figura 11B mostra que F_{md} ($6,8$) foi menor do que F_m ($7,55$). A E_{qd} foi de $0,292$, bem menor que a do disco anterior, com uma taxa de fotossíntese igual a $-0,285 \mu\text{M O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mostrando que houve uma boa inibição da cadeia de transporte de elétrons (CTE) pelo DCMU. Na figura 11C, o valor de F_m , igual a $8,0$, foi maior do que a F_{md} ($7,0$), e a E_{qd} , igual a $0,143$, foi menor que a do disco anterior ($0,292$). Entretanto, no presente caso houve alguma liberação de O_2 ($P_n = +2,640 \mu\text{M O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), significando que a absorção do DCMU não foi eficiente.

A ação do DCMU na CTE foi refletida diferentemente nos diferentes experimentos e nos vários discos utilizados. A figura 10A mostra valores de P_n de $-3,730 \mu\text{M O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, até $+2,640 \mu\text{M O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, na figura 11C.

A taxa fotossintética negativa do disco tratado com DCMU, de $-3,730 \mu\text{M O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, indica, na verdade, um consumo de O_2 superior ao consumo por discos não tratados e no escuro (Tabela 4). Este valor muito elevado aos mostrados na

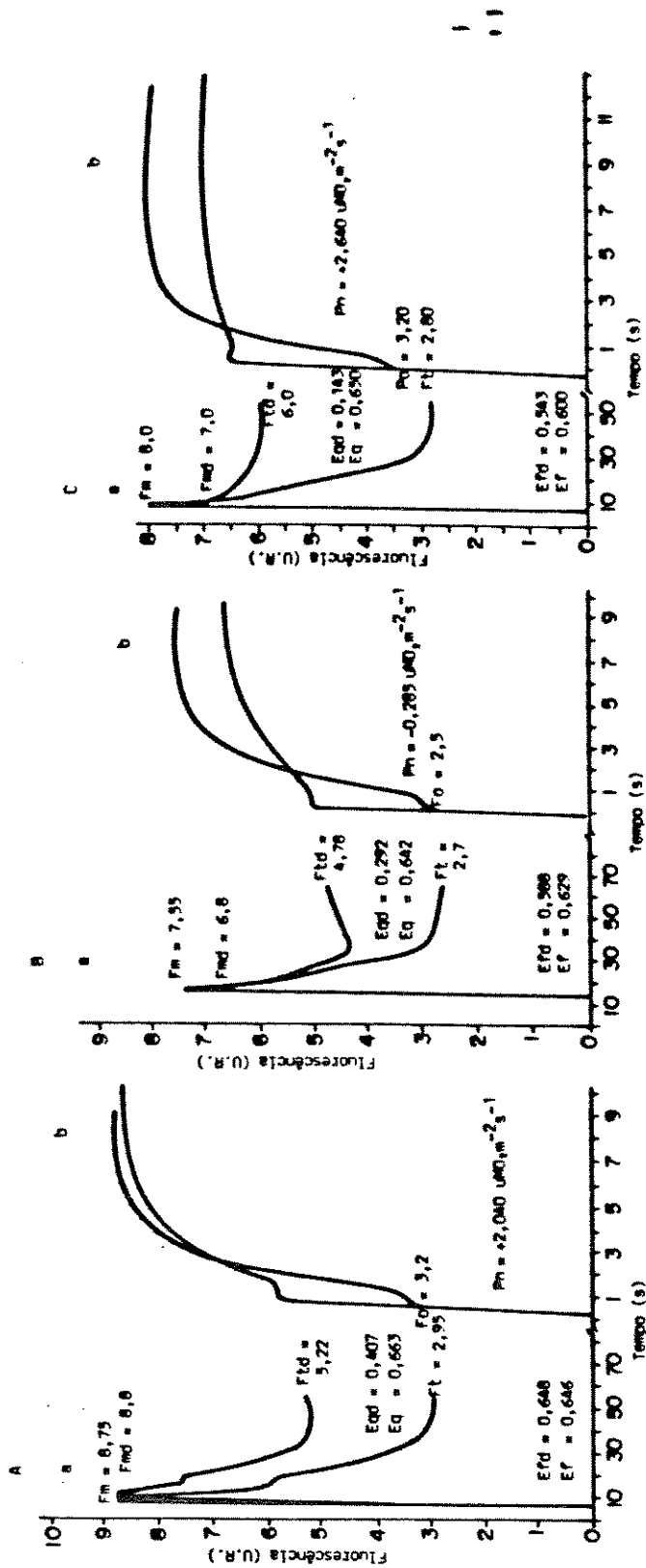


Fig. 11. Cinética da indução de fluorescência lenta (a) e rápida (b) de três discos foliares (A, B e C) do genótipo CNP 3453, tratados com DCMU (subíndice d) e não tratados. Os discos não tratados com DCMU permaneceram no escuro durante 30 minutos antes de receberem a luz de excitação. P_n é a produção ou o consumo de O_2 pelos discos foliares tratados com DCMU, sob $235 \mu\text{M}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabela 4 sugere que tenha ocorrido consumo fotorrespiratório de O_2 , devido a uma possível existência de intermediários do processo. Neste caso em que a taxa fotossintética foi negativa, a absorção do DCMU foi alta, com interrupção, provavelmente total da CTE. As taxas positivas de fotossíntese indicam que a absorção não foi eficiente, havendo interrupção apenas parcial da CTE pelo DCMU.

O terceiro genótipo testado para DCMU foi o CNF 4544. Os dados da figura 12 mostram que apenas o disco foliar embebido com DCMU (Fig. 12C) apresentou Fmd (7,70) menor do que Fm (8,0). Os outros discos, figuras 12A e 12C, apresentaram Fmd (9,0 e 7,5, respectivamente) levemente superiores aos Fm (8,80 e 7,30, respectivamente). Por problemas experimentais a figura 12C não mostra o resultado de Pn (consumo ou liberação de O_2).

Na figura 12B observa-se que houve consumo de O_2 ($P_n = -0,386 \mu M O_2 m^{-2} s^{-1}$), com uma eficiência do "quencher" (E_{qd}) igual a 0,073. Isto mostra que ocorreu eficiente bloqueio da CTE, ao contrário do disco foliar da figura 12A, com liberação de O_2 (P_n) igual a $1,600 \mu M m^{-2} s^{-1}$ e uma E_{qd} igual a 0,344, aproximadamente a metade do valor observado para o disco não tratado com DCMU ($E_q = 0,665$). Os resultados mostram, portanto, que a figura 12A representa um bloqueio apenas parcial da CTE.

O último genótipo testado, Carioca-80, em relação ao qual todos os demais foram comparados, não mostrou, aparentemente, nenhuma informação adicional como mostra a figura 13. Os resultados, como nos casos anteriores, mostram-se, também, pouco consistentes. A figura 13A, por exemplo, apresenta fluorescência máxima do disco tratado com DCMU ($F_{md} =$

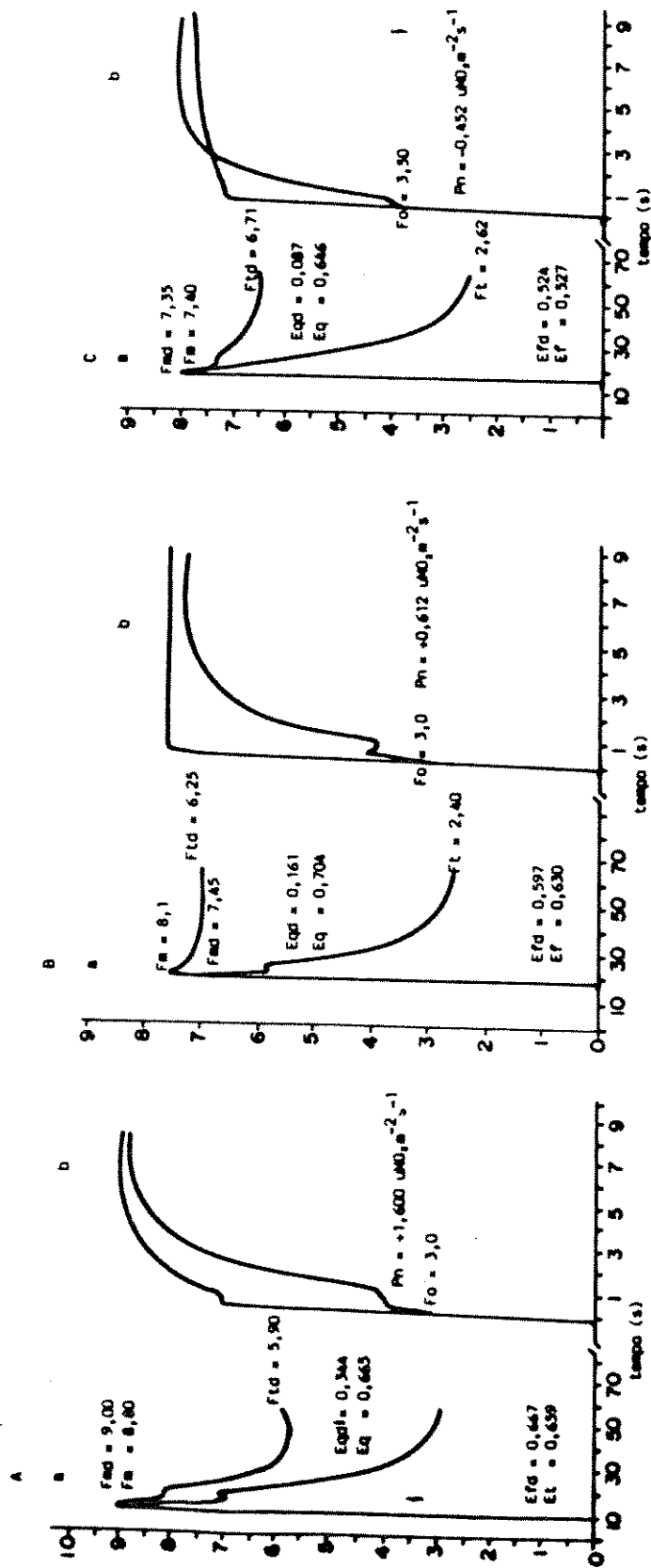


Fig. 12. Cinética da indução de fluorescência lenta (a) e rápida (b) de três discos foliares (A, B e C) do genótipo CNF 4544, tratados com DCMU (subíndice d) e não tratados. Os discos não tratados com DCMU, permaneceram no escuro durante 30 minutos antes de receberem a luz de excitação. P_n é a produção ou o consumo de O_2 pelos discos foliares tratados com DCMU, sob $235 \mu\text{M}$ fótons $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

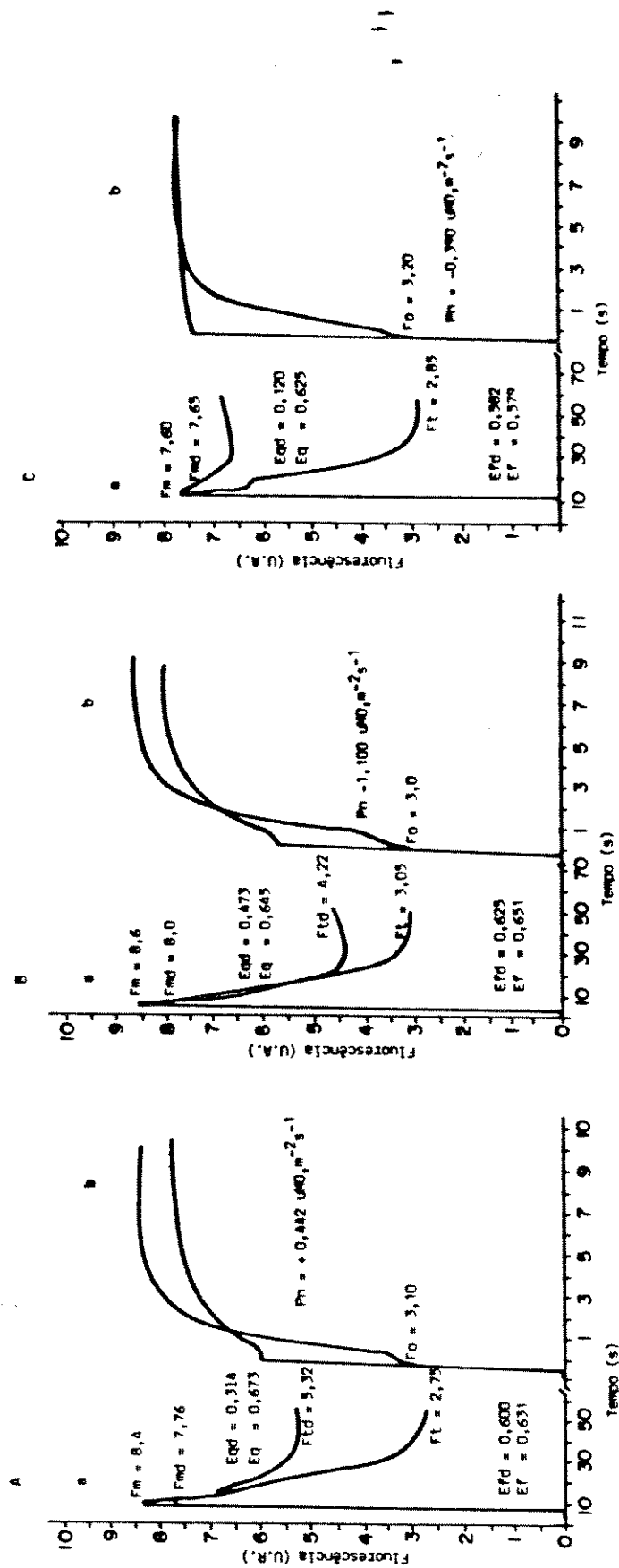


Fig. 13. Cinética da indução de fluorescência lenta (a) e rápida (b) de três discos foliares (a, b e c) do genótipo Carioca 60, tratados com DCMU (subíndice d) e não tratados. Os discos não tratados com DCMU, permaneceram no escuro durante 30 minutos antes de receberem a luz de excitação. Pm é a produção ou o consumo de O_2 pelos discos foliares tratados com DCMU, sob $235 \mu\text{M}$ fótons $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

7,76) menor do que do disco não tratado ($F_m = 8,6$). A eficiência do quencher do disco tratado com DCMU ($E_{qd} = 0,314$) foi menor do que do disco não tratado ($E_q = 0,673$), porém apresentou taxa de liberação de O_2 (P_n) igual a $0,442 \mu M O_2 m^{-2} s^{-1}$. Novamente os resultados indicam que o bloqueio da CTE foi apenas parcial.

Os dados incluídos na figura 13B mostram uma elevada taxa de consumo de O_2 ($P_n = -1,100 \mu M O_2 m^{-2} s^{-1}$) sob luz, o que significa bloqueio da CTE. Entretanto, a eficiência do "quencher" do disco tratado com DCMU ($E_{qd} = 0,473$) mostrou pouca redução em relação a do disco não tratado ($E_q = 0,645$). A F_{md} (8,0) foi menor do que a F_m (8,6).

A figura 13C mostra que os valores de F_m (= 7,60) e F_{md} (= 7,65) foram muito próximos. A E_{qd} (= 0,120) foi a menor das três repetições mostradas, muito inferior do que a E_{qd} da figura (13B) anterior ($E_{qd} = 0,473$), mas com uma taxa de consumo de O_2 ($P_n = -0,390 \mu M O_2 m^{-2} s^{-1}$) bastante menor.

Os valores de eficiência fotoquímica também são mostrados nas figuras 10, 11, 12 e 13, mas as diferenças entre os discos tratados com DCMU (E_{fd}) e não tratados (E_f), são muito pequenas, porque F_m e F_{md} foram em geral muito semelhantes.

Os resultados mostram que para todos os discos foliares tratados houve bloqueio parcial da CTE pelo DCMU, demonstrado pelas eficiências do "quencher" (E_{fd}) sempre menores do que dos discos não tratados e taxas de liberação de O_2 baixas. Para alguns discos foliares houve bloqueio aparentemente total, como nos casos em que apresentaram taxas de consumo de O_2 altas, próximas daquelas encontradas para discos foliares não tratados e

no escuro.

Embora a literatura relate que a absorção do DCMU se dá pela raiz, e dificilmente pela folha (ALMEIDA & RODRIGUES, 1985), o método aqui empregado, utilizando-se espalhante AGRAL e vácuo controlado, deveria assegurar uma absorção eficiente da substância, com aparente ocupação dos espaços intercelulares. Não obstante, os dados mostram que, em muitos casos, a absorção do DCMU pelo tecido não foi muito eficiente. KRAUSE & WEISS (1984) relatam que estresses ambientais como calor, frio e fotoinibição, causam danos aos tilacoides, reduzindo, frequentemente, a fluorescência variável ($F_v = F_m - F_o$). No presente caso, o fato da fluorescência máxima de um disco foliar tratado (F_{md}) ser, em muitos casos, menor do que a de um disco não tratado (F_m), pode ser explicado pela baixa eficiência de infiltração do DCMU e, também, devido a eventuais danos aos tilacoides causados pela aplicação de vácuo aos discos foliares.

Devido a algumas dessas inconsistências verificadas durante obtenção dos dados em discos tratados, optou-se por medir a fluorescência nos demais genótipos de forma a deixar o disco foliar se adaptar por 30 minutos às condições da própria câmara de medição, mesmo considerando que o método mais apropriado seria obter F_m após bloqueio da CTE pelo DCMU (KRAUSE & WEISS, 1984).

Os resultados incluídos nas figuras 10 a 13 anteriores mostram apenas o consumo ou a liberação de O_2 do disco tratado com DCMU, exposto a uma densidade de fluxo de fótons de $235 \mu Mm^{-2} s^{-1}$. A figura 14 mostra os resultados das trocas de O_2 em dois genótipos cujos discos foliares foram tratados com DCMU,

sob fluxo de fótons de $235 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e no escuro. A figura mostra também os sinais de fluorescência de discos foliares tratados e não tratados com DCMU.

Os valores das taxas de consumo de O_2 (escuro) para o genótipo CNF 4842 ($R_{\text{esp}} = -0,996 \mu\text{M O}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$) situa-se dentro da faixa encontrada para discos não tratados com DCMU (Tabela 4). Para o genótipo CNF 4844 o valor da taxa de respiração está um pouco baixo ($-0,614 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$), se comparado aos resultados da tabela 4, para um disco não tratado. Coincidentemente, em nenhum dos dois casos o bloqueio da CTE foi suficiente para inibir totalmente a fotossíntese, que ocorreu com baixas taxas ($P_n = 0,614 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para o genótipo CNF 4844 e $P_n = 1,992 \mu\text{M O}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para o genótipo CNF 4842. Se a absorção do DCMU tivesse sido eficiente, não deveria ocorrer liberação de O_2 , mas apenas seu consumo pela cadeia respiratória.

Embora com variabilidade nos resultados, este método pode ser considerado eficiente para determinar a absorção de herbicidas que agem a nível da cadeia de transporte de elétrons do PSII, conforme demonstrado por FEDTKE, 1982; HARRIS & CAMLIN, 1988.

A tabela 3 mostra os valores da fluorescência mínima (F_o), máxima (F_m), variável (F_v) e terminal (F_t), e eficiências do "quencher" (E_q) e fotoquímica (E_f), dos quatro grupos de genótipos de feijoeiros testados.

Estatisticamente não houve diferença dentro de cada grupo, a nível de 5%, pelo teste F entre os genótipos, para os parâmetros acima citados.

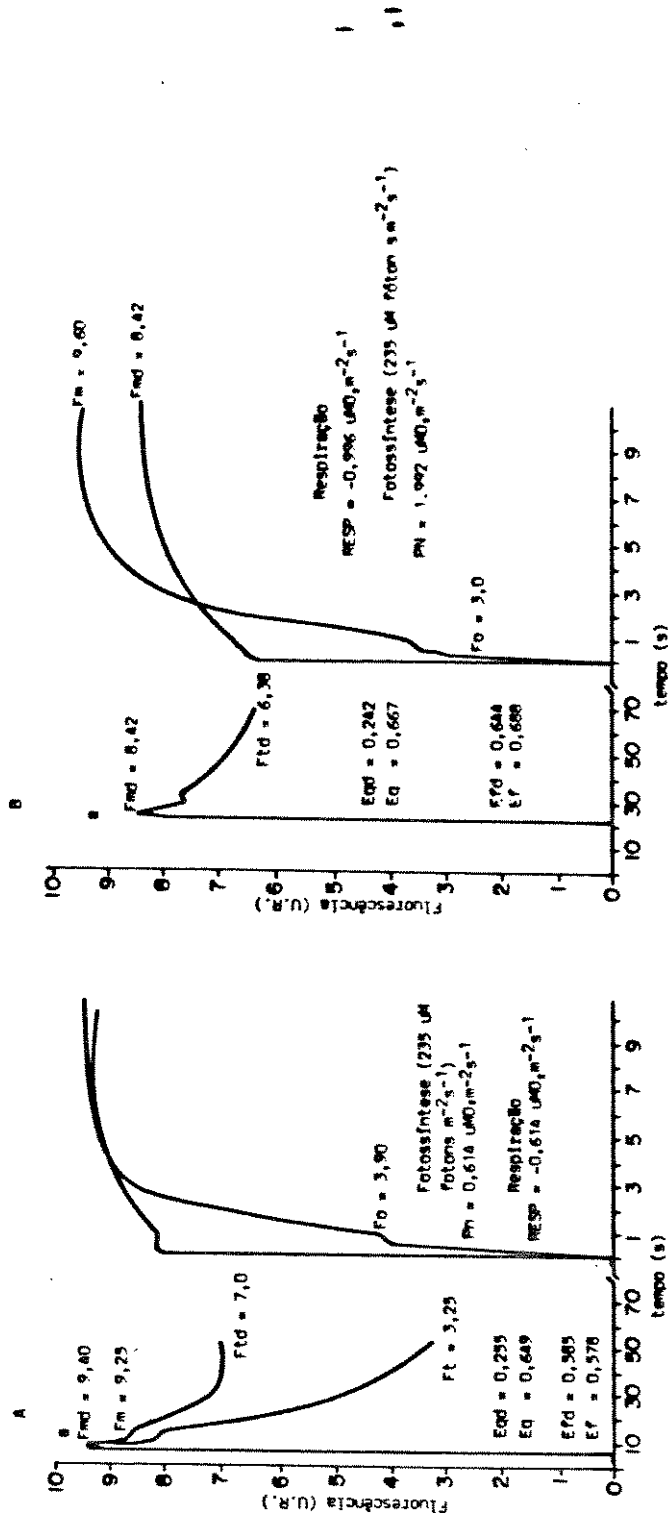


Fig. 14. Cinética de indução de fluorescência lenta (a) e rápida (b) dos rendilhos CNP 4844 (A) e CNP 4842 (B) de discos foliares tratados com DCMU (subíndice d) e não tratados. Os discos não tratados com DCMU, precisam necessitar no escuro durante 30 minutos antes de receberem a luz de excitação. São mostrados, também a fotossíntese e a respiração dos discos tratados com DCMU.

As diferenças nos valores de F_o , F_m , F_v e F_t entre os grupos foram devidas a utilização no registrados potenciométrico, de amplitudes diferentes para o sinal de fluorescência. Estas diferentes escalas de ampliação não alteram os valores de E_q e E_f entre os grupos, porque estes valores são obtidos pela relação entre valores de um mesmo sinal de fluorescência, portanto, independem da escala de ampliação.

Os coeficientes de variação encontrados foram relativamente baixos, indicando um baixo desvio entre as medidas. Variaram de 2,4 a 8,1% para E_g e de 5,8 a 14,9% para E_f , como mostra a tabela 3.

Embora os parâmetros da emissão da fluorescência obtidos não tenham apresentado diferenças entre genótipos, sua quantificação tem sido utilizada em vários estudos de fisiologia da fotossíntese. BJORKMAN & DEMMIG (1987) mediram a emissão de fluorescência a 77K de várias espécies C3 e C4, e encontraram diferenças na emissão de fluorescência entre as espécies e entre folhas de sol e de sombra da mesma espécie. Sugerem os autores que a determinação da emissão da fluorescência, ou mais especificamente, da relação F_v/F_m , é um excelente método para a avaliação da atividade fotoquímica do PSII. Mostraram, também, que os valores absolutos para a emissão da fluorescência, F_o e F_m , mostram uma considerável diferença entre as espécies, mesmo em se tratando de plantas C3 apenas. Porém, ao quantificar as relações F_v/F_m , BJORKMAN & DEMMING (1987) encontraram apenas pequenas diferenças entre as espécies.

Tabela 3. Fluorescência mínima (Fo), máxima (Fm), variável (Fv) e Terminal (Ft) e Eficiência do "Quencher" (Eq) e Fotoquímica (Ef) dos quatro grupos de Genótipos de Feijoeiros.

Grupo	Genotipo	Fo	Fm	Fv	Ft	Eq	Ef
1	Carioca	3,10	8,20	5,10	2,88	0,648	0,620
	CNF 0480	3,07	7,87	4,80	2,39	0,695	0,608
	CNF 5455	3,03	8,10	5,07	2,82	0,652	0,625
	CNF 4544	3,20	8,03	4,83	2,70	0,663	0,599
	C.V. (%)					4,2	8,2
2	Carioca-80	4,20	9,53	5,33	3,15	0,669	0,560
	CNF 4844	4,10	8,57	4,47	2,93	0,658	0,519
	CNF 4842	4,03	9,63	5,60	3,10	0,671	0,582
	CNF 4600	4,80	9,35	4,55	3,28	0,649	0,486
	C.V. (%)					2,4	14,9
3	Carioca-80	2,67	6,43	3,77	2,07	0,675	0,590
	CNF 4786	1,82	4,95	3,13	1,45	0,650	0,633
	CNF 5547	2,97	5,93	2,97	2,00	0,660	0,498
	CNF 5529	2,85	6,70	3,85	2,25	0,658	0,559
	C.V. (%)					8,1	10,4
4	Carioca-80	1,47	4,96	3,50	1,67	0,662	0,704
	CNF 5598	1,57	5,47	3,90	1,87	0,658	0,711
	CNF 5520	1,50	4,86	3,36	1,72	0,646	0,670
	CNF 5539	1,47	4,65	3,18	1,56	0,663	0,684
	C.V. (%)					5,5	5,8

Como F_m é proporcional a quantidade de moléculas de clorofila A contida no tecido (MIRANDA et alii, 1981), e devido a baixa variabilidade entre os valores de F_m nas amostras, pode-se deduzir que as diferenças nas quantidades de moléculas de clorofila entre os genótipos é muito baixa.

Uma outra alternativa para avaliação da variabilidade genética seria quantificar os tamanhos das unidades fotossintéticas (MALKIN & FORK, 1981). A unidade fotossintética representa o número mínimo de moléculas de clorofila envolvidas na absorção de 1 (um) quantum de luz. É possível que diferentes genótipos apresentem a mesma concentração de moléculas de clorofila, mas com número de Centros de Reação diferentes entre genótipos, refletindo a habilidade da planta para a transdução da energia luminosa. Esta hipótese não pôde ser testada no presente trabalho por problemas de instrumentação.

Segundo MALKIN et alii (1981) há uma boa correlação entre as taxas fotossintéticas e a quantidade de Centros de Reação do PSII (expresso como concentração de Centros de Reação por clorofila ou por unidade de área foliar).

4.6. Resultados das Medições das Trocas de O_2 em Genótipos de Feijoeiros

A tabela 4 mostra os resultados da determinação do consumo e da liberação do O_2 nos genótipos de feijão testados. Vale mencionar que em cada um dos 4 grupos o genótipo Carioca está presente como padrão de comparação.

Da mesma forma que para a emissão da

fluorescência, também neste caso não houve diferença estatística a 5% pelo teste F. Os coeficientes de variação (c.v.) foram altos, acima de 15%, para todos os tratamentos (genótipos), valores considerados de médio a alto segundo PIMENTEL GOMES (1987). Todos os coeficientes de variação para fotossíntese foram superiores a 20%, enquanto para respiração dois valores (grupos 3 e 4) ficaram abaixo deste nível. O maior cv para fotossíntese chegou a 26,3%, sugerindo que as medições de respiração tem uma variabilidade menor do que as da fotossíntese.

As taxas fotossintéticas (liberação de O_2) foram medidas somente até densidade de fluxo de fótons de $235 \mu M m^{-2} s^{-1}$, valor máximo fornecido pelo equipamento. Muito possivelmente, se medidas tivessem sido feitas em irradiâncias saturantes, em torno de $600-700 \mu M$ de fótons $m^{-2} s^{-1}$ para feijão (AUSTIN & McLEAN, 1972; WEISS et alii, 1987; TANAKA & FUGITA, 1979), o comportamento poderia ter sido diferente, especialmente para os grupos 1 e 2, que não apresentaram tendência de saturação no nível de luz de $235 \mu M m^{-2} s^{-1}$. Porém os grupos 3 e 4, mesmo nesta densidade relativamente baixa de fluxo de fótons ($235 \mu M m^{-2} s^{-1}$), já mostraram tendência a saturarem (ver figuras 17 e 18 para melhor visualização). Esta tendência à saturação é atribuída ao fato destes dois (2) grupos terem sido conduzidos numa época (maio e junho, ver tabela 1) em que a radiação que chegava às plantas na casa-de-vegetação era baixa. No dia 28/6, um dia nublado, medidas de irradiância mostraram que a radiação máxima foi de $113 w m^{-2}$ as 11:19 h. Num dia ensolarado (30/06/89) a energia radiante atingiu $495 w m^{-2}$ as 13:48 h. Quando as folhas crescidas neste ambiente de baixa luminosidade foram colocadas na

Tabela 4. Liberação de O_2 (μ Moles $m^{-2} s^{-1}$) de quatro genótipos de feijão em diferentes níveis de fluxo de fótons.

Grupo	Genótipo	245	205	130	50	10	0
1	Carioca-80	5,950	-	3,657	0,537	-0,780	-1,339
	CNF 0480	7,426	-	4,218	1,403	-0,185	-0,765
	CNF 5455	6,555	-	3,258	0,912	-0,527	-0,946
	CNF 4544	7,032	-	4,226	0,607	-0,531	-0,990
	CV (%)	21,2					25,9
2	Carioca-80	6,189	5,455	3,494	0,787	-0,585	-1,069
	CNF 4844	5,282	4,552	3,199	0,868	-0,471	-0,962
	CNF 4842	6,384	5,765	4,036	1,155	-0,432	-0,873
	CNF 4600	6,041	5,307	3,539	0,925	-0,388	-0,899
	cv (%)	27,3					26,5
3	Carioca-80	4,265	4,230	2,915	0,817	-0,458	-1,020
	CNF 5586	3,864	4,057	3,091	0,905	-0,194	-0,829
	CNF 5547	4,061	3,935	3,050	0,842	-0,597	-1,106
	CNF 5529	4,320	4,225	3,468	1,179	-0,279	-0,722
	CV (%)	29,3					18,6
4	Carioca-80	4,817	4,857	3,770	1,072	-0,564	-1,009
	CNF 5598	4,157	4,382	3,844	1,274	-0,312	-0,755
	CNF 5520	5,751	5,345	3,999	1,154	-0,330	-0,829
	CNF 5539	7,158	6,223	4,431	1,016	-0,516	-0,911
	CV (%)	26,3					18,4

câmara de medição, sob luz actínica de $235 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ocorreu, possivelmente, fotoinibição (CRITCHLEY, 1981; CRITCHLEY & SMILLE, 1981; POWLES, 1984).

A partir dos dados de liberação de O_2 apresentados na tabela 4, e incluídos nas figuras 16A a 19B, observa-se que os resultados situam-se numa faixa muito estreita, não mostrando significância entre os tratamentos (genótipos). Para o consumo de O_2 (respiração) também não houve diferença estatística pelo teste F a 5% de probabilidade.

Embora não se tenha encontrado diferença estatística entre os genótipos dentro de cada grupo, é importante considerar que o genótipo Carioca apresentou taxa respiratória sempre maior que os demais, com exceção do genótipo CNF 5547, que apresentou taxa ($-1,106 \mu\text{M O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) superior ao Carioca ($-1,020 \mu\text{M O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Na verdade, o importante para a atividade fisiológica é a taxa de fotossíntese líquida, e sua contribuição para o aumento do peso de matéria seca da planta. Por outro lado, deve-se levar em consideração a partição de assimilados dentro da planta. A planta pode apresentar ganho elevado em termos de fotossíntese líquida, mas não direciona os fotoassimilados para a produção de grãos (produtividade econômica), mas sim para o crescimento vegetativo.

No caso específico da cultivar Carioca, reconhecidamente estável em termos de produtividade, esta taxa respiratória superior as demais pode estar associada ao uso mais eficiente do nitrogênio.

Tem sido constatado que a aplicação de nitrogênio à planta induz um aumento na taxa respiratória tão logo o nutriente é absorvido (WEGER & TURPIN, 1989). Os resultados sugerem que, de alguma forma, a respiração está envolvida no processo de assimilação do nitrogênio, especialmente quando o poder redutor gerado na fotossíntese não está sendo fornecido adequadamente para redução do nitrato (WEGER & TURPIN, 1989), ou mesmo no escuro (ASLAM et alii, 1979; ASLAM & HUFFAKER, 1982; RUFTY et alii, 1984).

O genótipo Carioca, mesmo apresentando taxas de fotossíntese líquida em alguns casos menores ($P_n = P_g - \text{Resp}$), o fato de suas taxas respiratórias serem sempre maiores, comparados com todos os demais genótipos testados, exceto CNF 5547 (Tabela 4), assegura maior disponibilidade de esqueletos carbônicos em especial o α -cetogluturato, pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs), ATP, NADH e ainda NADPH e ferredoxina reduzida (GRAHAM, 1980; KOW et alii, 1982; WEGER & TURPIN, 1989), tornando mais eficiente as reações de redução do nitrato, do nitrito e a assimilação da amônia (WEGER et alii, 1988; WEGER & TURPIN, 1989) resultando, quase sempre, em maiores produtividades em relação aos demais genótipos.

Nas figuras 15B, 16B, 17B e 18B, são vistos os pontos de compensação por luz dos genótipos testados. Estes pontos, onde é nula a fotossíntese líquida, situaram-se na faixa aproximada de 13 a 33 μ fôtons $m^{-2} s^{-1}$.

Tomando a cultivar Carioca como referência, é possível verificar que o ponto de compensação obtido no grupo 1 (semeado no mês de novembro, conforme mostra a tabela 1), foi

maior do que os obtidos nos demais, havendo um decréscimo constante do 10. grupo para o 40. Como a disponibilidade de energia luminosa para as plantas, decresceu neste mesmo sentido (do mês de novembro para junho), torna-se muito provável que os pontos de compensação por luz foram influenciados pela disponibilidade de energia radiante. Isto é, plantas crescidas em ambiente com menor disponibilidade de energia, apresentam valores de pontos de compensação menores.

Apenas o genótipo CNF 5547 apresentou ponto de compensação superior àquele da Carioca. O do genótipo CNF 5539 foi aproximadamente igual e dos demais foram superiores.

4.7. Eficiências e Exigências Quânticas Apresentadas pelos Genótipos

De acordo com dados experimentais as determinações das eficiências quânticas devem ser calculadas a partir de valores acima do ponto de compensação, pois em muitos tecidos é observado um pronunciado efeito Kok. Este efeito se reflete na alteração da inclinação da reta de luz versus fotossíntese líquida em baixas irradiâncias. Acredita-se que este efeito reflita uma interação entre a respiração e a fotossíntese (KOK, 1949; SHARP et alii, 1984).

Os dados deste trabalho mostram que, possivelmente, ocorreu efeito Kok em maior ou menor intensidade em quase todos os genótipos testados. Apenas o último grupo de genótipos analisados (ver tabela 1) aparentemente não apresentou nenhum efeito. Este fato pode estar associado ao efeito de

fotoinibição, visto que as taxas fotossintéticas tenderam à saturação em baixas densidades de fluxo de fótons, possivelmente porque os genótipos deste grupo foram cultivados em época (maio, junho) com baixa irradiância, comportando-se como plantas de sombra.

Para evitar o efeito Kok em baixa luminosidade e a saturação fotossintética em luminosidade mais alta (figuras 15 a 18), foram utilizadas as taxas de fotossíntese bruta ($P_n + \text{Resp}$) em densidade de fluxo de fótons de $50 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para o cálculo da eficiência quântica e requerimento quântico.

Como mostrado na Tabela 5, não foi observada diferença estatística para eficiências e requerimentos quânticos (5% pelo teste F) entre os genótipos dentro dos grupos. Os coeficientes de variação calculados para requerimento quântico foram altos e muito diferentes entre os grupos. No grupo 2, por exemplo, o C.V. foi calculado em 20%, enquanto o grupo 1 mostrou valor 6,7%.

As eficiências quânticas encontradas na literatura variam em torno de 0,050 a 0,106 $\text{O}_2/\text{fóton}$, dependendo das concentrações de O_2 e de CO_2 utilizadas durante as medidas (EHLERINGER & PEARCY, 1983; EVANS, 1985; BJORKMAN & DEMMIG, 1987; EHLERINGER & BJORKMAN, 1977). Os resultados da literatura são ainda, em geral, baseados na luz realmente absorvida pela folha e não na luz incidente, como no presente trabalho.

Os resultados incluídos na tabela 5 mostram os valores de eficiências quânticas aparentes (ϕ) e de requerimento quântico ($1/\phi$), obtidos com feixe de luz de LEDS de comprimento

de onda máximo de 660 nm. As baixas eficiências quânticas obtidas foram devidas, provavelmente, a concentração não saturante de CO₂ na câmara porta-amostra, ocorrendo assim efeito da fotorrespiração (EVANS, 1985).

Os valores de requerimento quântico são elevados quando comparados com os valores teóricos de 8-12 quanta/O₂, encontrados na literatura (RAVEN, 1985; WALKER, 1986). Contudo, considerando que a literatura mostra que os valores dos teores de fotorrespiração em plantas C₃, como em soja, situam-se na faixa de 20-25% das taxas de fotossíntese aparente, podendo alcançar até 75% (ZELITCH, 1971; ZELITCH, 1979), os valores encontrados, após descontados possíveis perdas respiratórias, podem alcançar os valores teóricos citados.

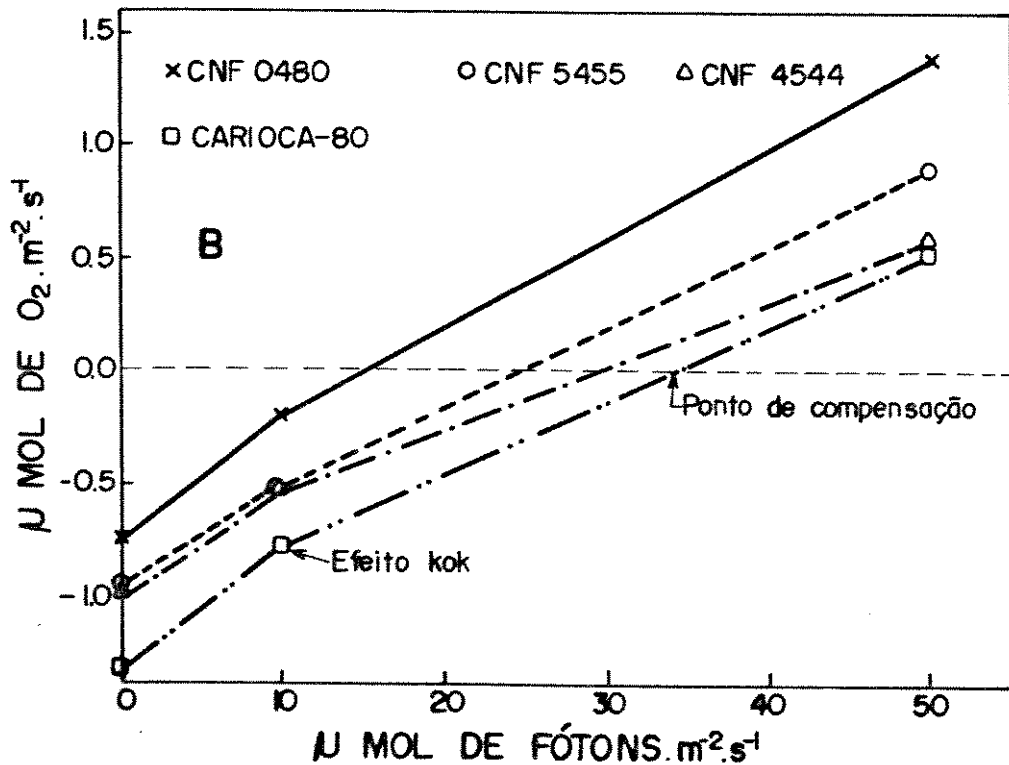
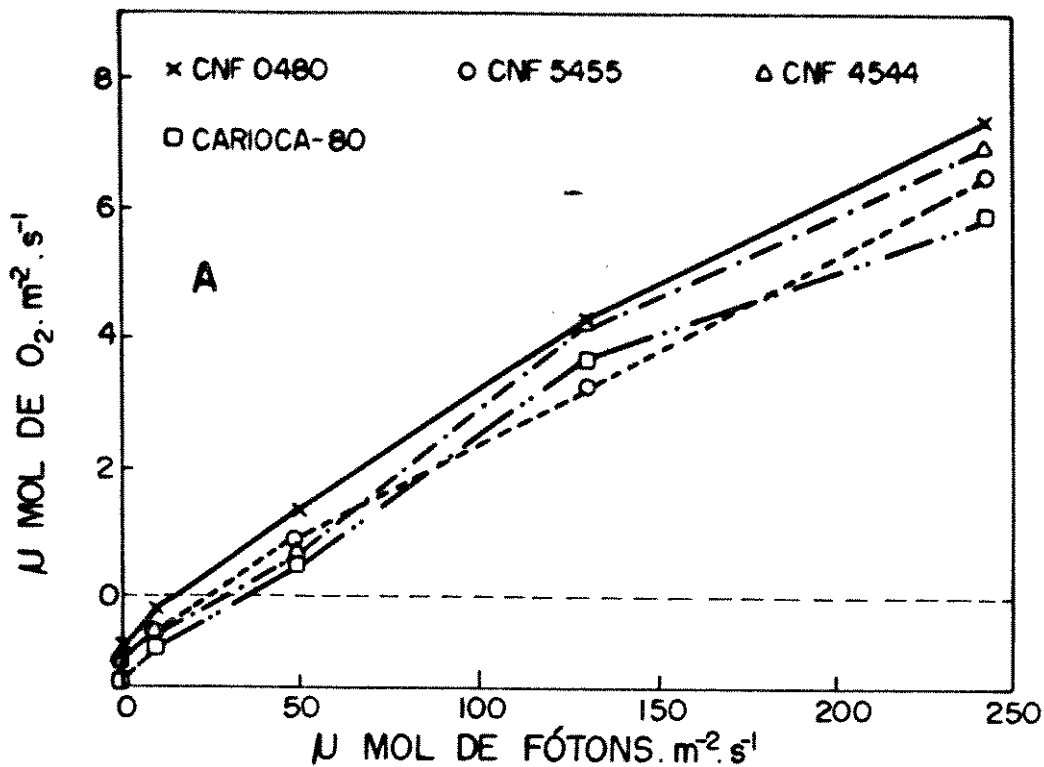


Fig. 15. Trocas de O_2 de quatro genótipos de feijão (grupo 1), em $\mu\text{Mm}^{-2}\text{S}^{-1}$, em diferentes densidades de fluxo de fótons (A). Pontos de compensação por luz e efeito Kok encontrados em escala expandida (B). Cada ponto na curva é média de três repetições.

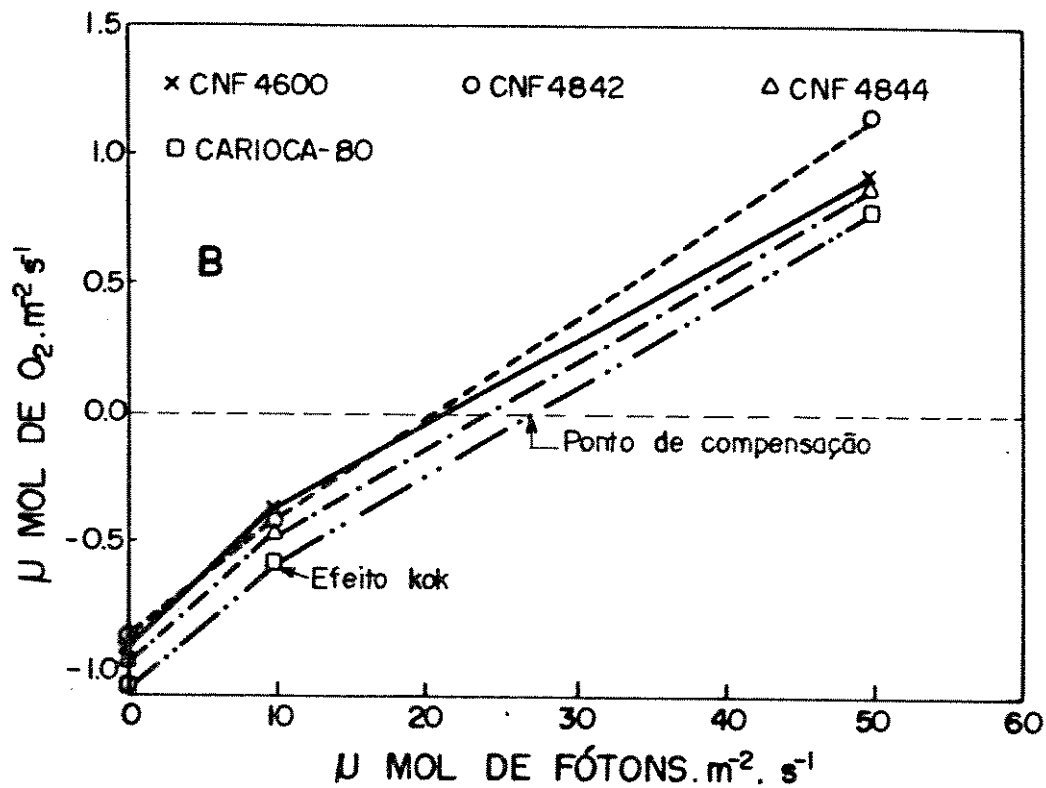
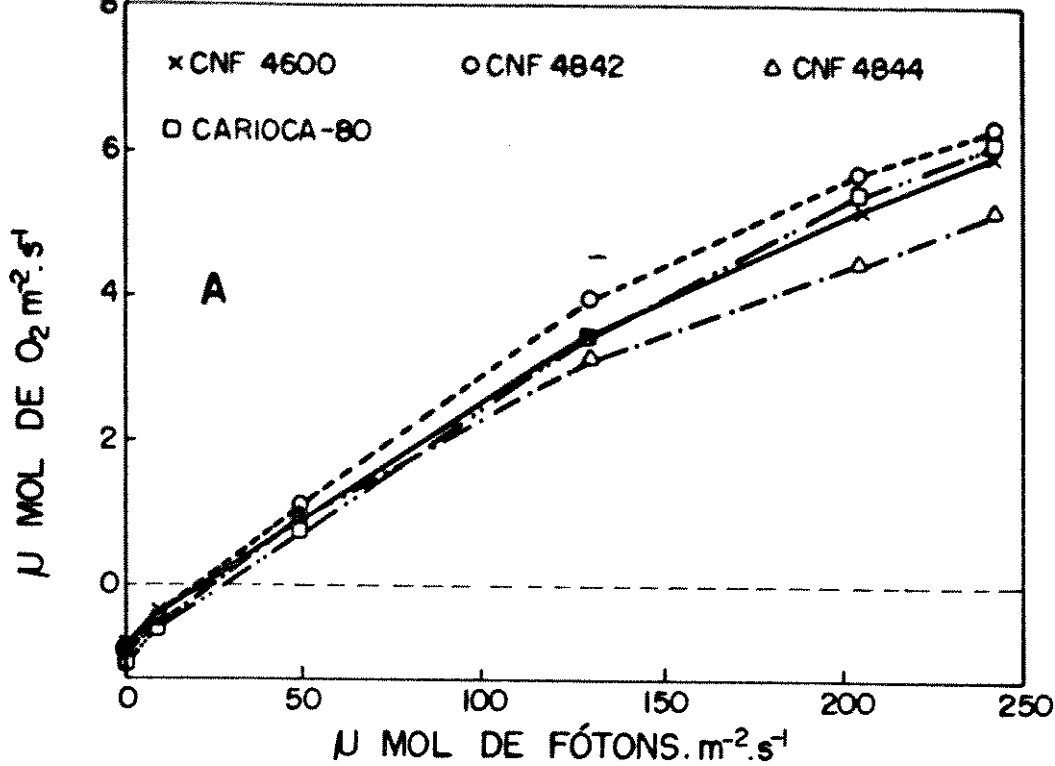


Fig. 16 - Trocas de O_2 de quatro genótipos de feijão (grupo 2) em $\mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$, em diferentes densidades de fluxo de fótons (A). Pontos de compensação por luz e efeito Kok encontrados em escala expandida (B). Cada ponto da curva é média de três repetições.

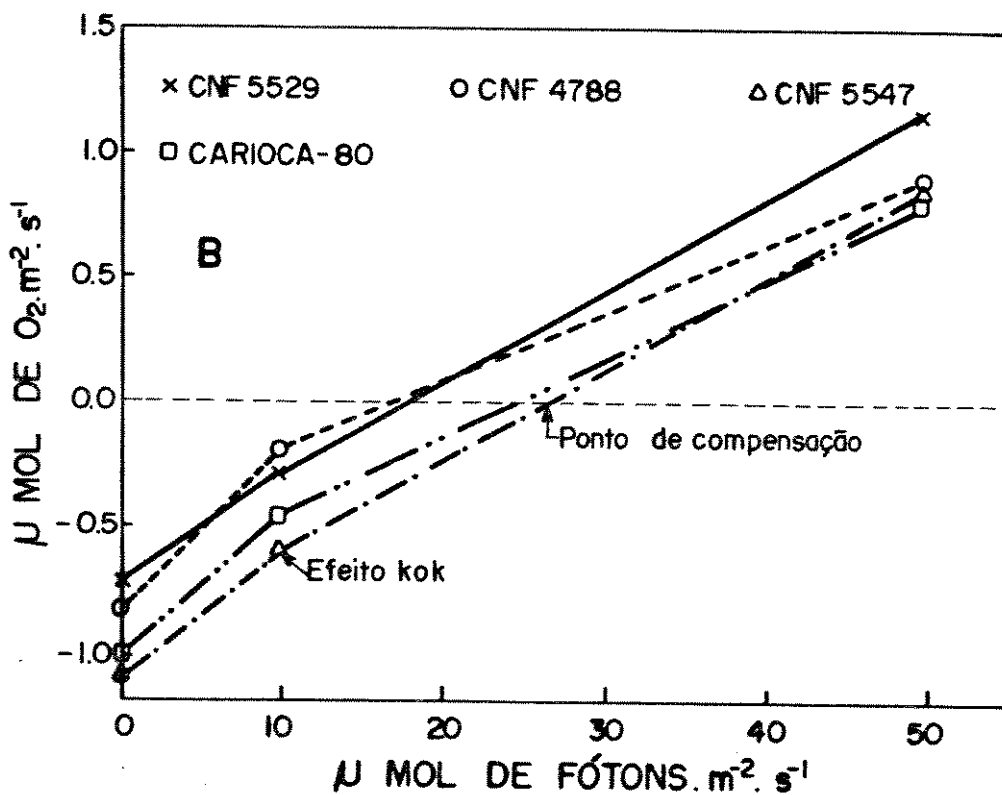
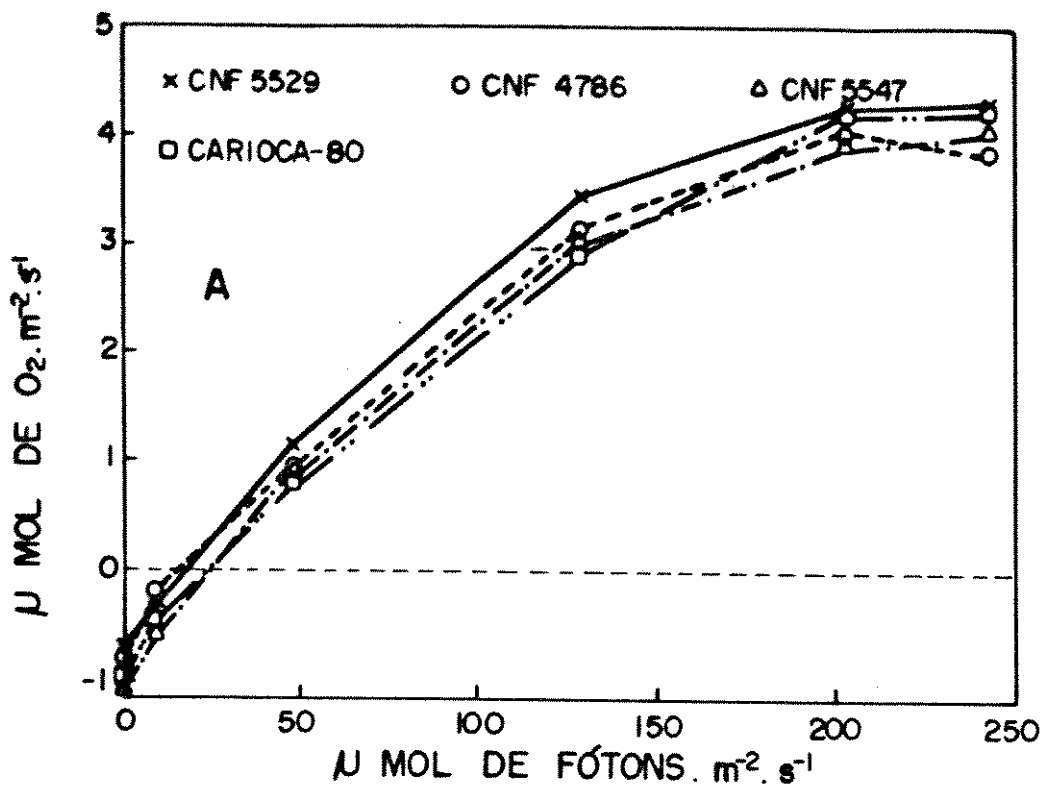


Fig. 17 - Trocas de O₂ de quatro genótipos de feijão (grupo 3), em $\mu\text{Mm}^{-2}\text{S}^{-1}$, em diferentes densidades de fluxo de fótons (A). Pontos de compensação por luz e efeito Kok mostrados em escala expandida (B). Cada ponto da curva é média de três repetições.

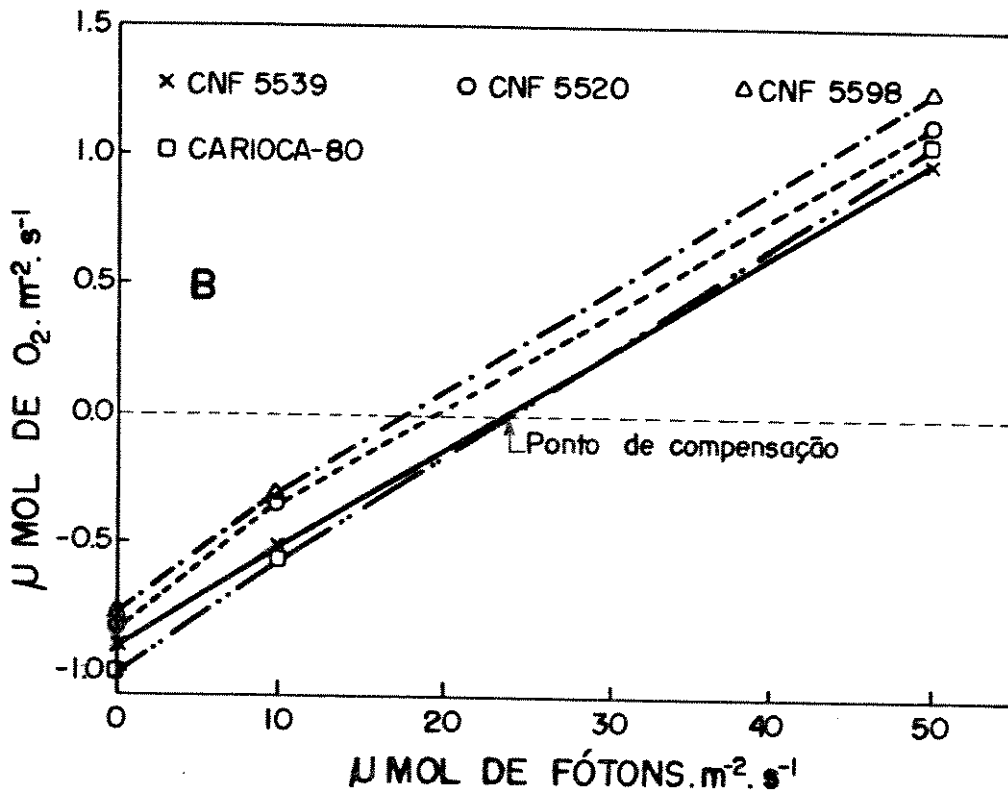
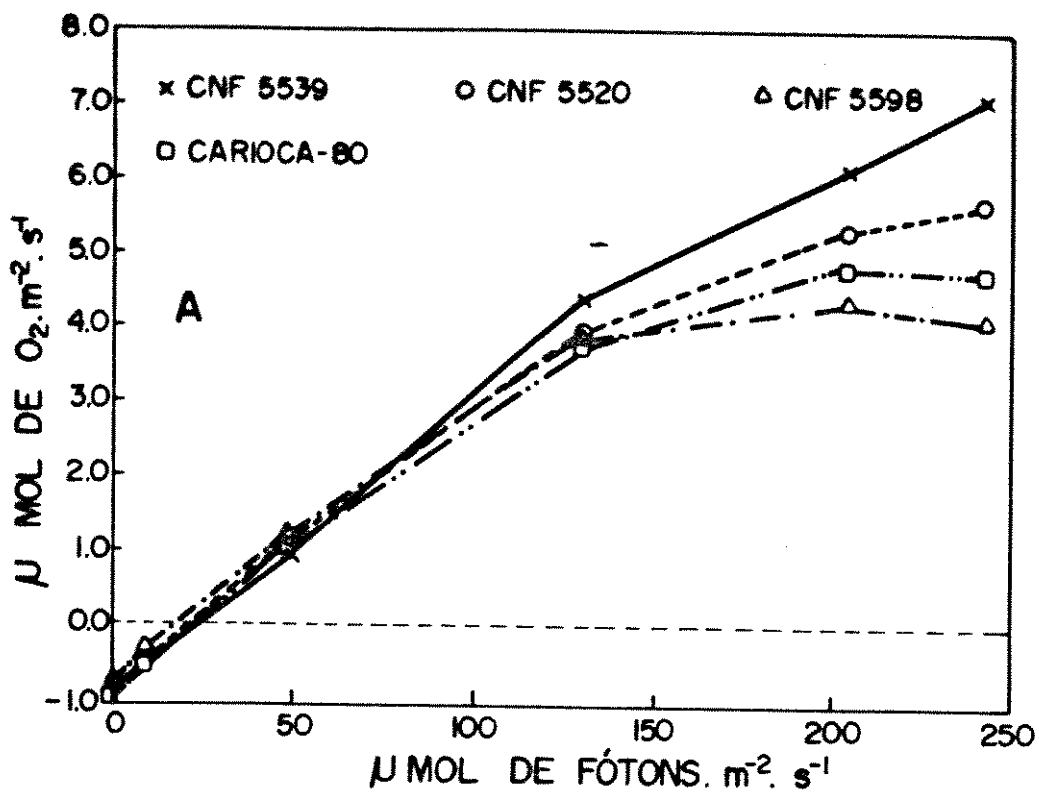


Fig. 18 - Trocas de O_2 de quatro genótipos de feijão (grupo 4), em $\mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$, em diferentes densidades de fluxo de fótons (A). Pontos de compensação por luz mostrados em escala expandida (B). Cada ponto da curva é média de três repetições.

Tabela 5. Eficiência quântica (ϕ) e requerimento quântico ($1/\phi$) dos genótipos de feijão.

Grupo	Genótipo	ϕ	$1/\phi$
1	Carioca-80	0,0426	23,49
	CNF 0480	0,0434	23,10
	CNF 5455	0,0372	26,97
	CNF 4544	0,0396	25,39
	CV (%)		6,7
2	Carioca-80	0,0365	27,80
	CNF 4844	0,0366	27,61
	CNF 4842	0,0405	25,75
	CNF 4600	0,0359	28,97
	CV (%)		20,0
3	Carioca-80	0,0367	27,25
	CNF 4786	0,0350	30,15
	CNF 5547	0,0390	26,77
	CNF 5529	0,0380	26,40
	CV (%)		17,4
4	Carioca-80	0,0416	24,08
	CNF 5598	0,0410	24,74
	CNF 5520	0,0397	25,24
	CNF 5539	0,0385	26,02
	CV (%)		8,8

5. CONCLUSOES

A utilização do DCMU como bloqueador da cadeia de transporte de elétrons não foi particularmente efetiva para a obtenção de valores de fluorescência máxima (F_m) em folhas dos genótipos de feijão testados. Por esta razão estabeleceu-se o tempo de 30 minutos de adaptação ao escuro para que os Centros de Reação do fotossistema 2 alcançassem o estado "aberto".

Os resultados da determinação da cinética da indução de fluorescência e das trocas de O_2 , indicam, aparentemente, que não houve eficiente infiltração do DCMU nos tecidos dos discos foliares.

Não houve diferença estatística pelo teste F ($p > 0,05$) entre os genótipos para fluorescência mínima (F_o), máxima (F_m), variável (F_v) e eficiências do "quencher" (E_q) e fotoquímica (E_f). Embora não se tenham detectado diferenças entre os genótipos pela utilização dos parâmetros descritos acima, acredita-se que o método merece consideração e deva ser melhor

explorado em estudos de variabilidade genético-fisiológica.

Os resultados obtidos não mostraram diferenças com relação a liberação (fotossíntese) e consumo de O_2 (respiração). Entretanto, foi detectado uma tendência de maior taxa de consumo de O_2 pelo genótipo Carioca-80 em comparação aos demais, exceto para o genótipo CNF 5547, que apresentou os maiores valores. É possível que esta maior taxa respiratória contribua para o fornecimento de compostos do metabolismo intermediário, necessárias aos processos de redução do nitrato e nitrito e assimilação da amônia, em especial sob luz, mas também no escuro (RUFTY et alii, 1984).

No último grupo de genótipos testados ocorreu saturação fotossintética em nível baixo de irradiância ($235 \mu M$ fotons $m^{-2}s^{-1}$). Atribui-se a isto o fato das plantas terem sido cultivadas numa época em que houve limitação de luz, tendo ocorrido fotoinibição quando submetidas ao nível de irradiância mencionado.

O efeito Kok foi evidente para quase todos os genótipos, com exceção do último grupo de genótipos testados. É possível que exista alguma relação entre irradiância e ausência do efeito Kok, impossível de ser explicado apenas com os dados apresentados.

As medidas das eficiências quânticas, e portanto as exigências quânticas, também não apresentaram diferenças significativas pelo teste F ($P > 0,05$), entre os genótipos testados.

Deve ser levado em consideração que o genótipo Carioca escolhido como padrão no presente trabalho apresenta uma

estabilidade ou plasticidade associada ao comportamento superior, comparado com os demais genótipos, quando cultivados em diferentes situações ambientais (época do ano, por exemplo), embora isto não signifique que ele é sempre mais produtivo em qualquer experimento de competição de genótipos (cultivares). Em experimentos de competição a cultivar Carioca situa-se quase sempre na média superior de produtividade.

6. RESUMO

O principal objetivo de praticamente todos os trabalhos de pesquisa com feijão, e mesmo com outras culturas, tem sido a busca de genótipos mais produtivos e com aceitação comercial além, evidentemente, de possuírem resistência ou tolerância a pragas e doenças.

O presente trabalho teve por objetivo testar 12 genótipos de feijão utilizando-se técnicas de emissão de fluorescência e de troca de O_2 pelas plantas, comparando-os com o genótipo Carioca, tido como o mais produtivo e estável dentre as variedades plantadas. Os parâmetros determinados foram: fluorescência mínima F_0 , máxima F_m e terminal F_t , fluorescência variável, F_v ($F_v = F_m - F_0$), eficiência do extintor (quencher) E_q , e eficiência fotoquímica E_f . Foi também avaliada a liberação de O_2 pela fotossíntese e o consumo pela respiração.

Os 12 genótipos foram divididos em 4 grupos, tendo sempre o Carioca como testemunha. Cada grupo foi estudado em

época diferente devido a impossibilidade de se trabalhar com todos simultaneamente.

Os resultados mostraram que, em relação aos parâmetros da fluorescência, não houve diferença entre os genótipos testados e nem entre eles e o Carioca.

Em se tratando das trocas de O_2 , também não foram detectadas diferenças estatísticas entre os genótipos. Entretanto, observou-se que o genótipo Carioca apresentou taxa respiratória sempre maior do que os demais, com exceção do genótipo CNF 5547 (também do grupo do Carioca), que apresentou taxa respiratória ($-1,106 \mu M O_{2m-2s-2}$) ligeiramente superior a do Carioca ($-1,020 \mu M O_{2m-2s-2}$).

É provável que a maior taxa respiratória determinada para o genótipo Carioca esteja associada ao uso eficiente do nitrogênio, através da maior disponibilidade de esqueletos carbônicos, ATP, NADH, NADPH ferredoxina reduzida, utilizados no processo de redução e incorporação do nitrato em compostos orgânicos.

As eficiências e as exigências quânticas foram determinadas nos diferentes genótipos e caracterizado o efeito Kok, que é a mudança na inclinação da reta de luz versus fotossíntese líquida em baixas intensidades de irradiação.

Não foram observadas diferenças estatísticas pelo teste F a 5% para eficiências e exigências quânticas entre os genótipos dentro dos grupos.

Os valores de requerimento quântico encontrados situaram-se entre 20 e 31 quanta/ O_2 liberado. Os resultados encontrados poderiam estar associados à metodologia empregada uma

vez que, dependendo das condições de concentração de CO_2 do ambiente, e a ocorrência da fotorrespiração, podem ser observados aumentos da exigência quântica em até 75%, em ambiente com baixa saturação de CO_2 .

O efeito Kok foi observado para quase todos os genótipos testados. Apenas o último grupo de genótipos, constituídos pelos materiais CNF 5598, CNF 5520, CNF 5539, e também o Carioca, aparentemente não apresentou nenhum efeito. Este fato pode estar associado ao fato de que este grupo recebeu baixa radiação solar durante o crescimento devido a época do ano em que foi cultivado (maio, junho), levando as plantas a se comportarem como plantas de sombra, com saturação fotossintética em baixas densidades de fluxo de fótons. Isto pode ter resultado em fotoinibição e desaparecimento do efeito Kok.

7. ABSTRACT

The principal objective in common beans as well as in crop research, has been the search for genotypes with better productivity and commercial acceptability. Other equally important targets have been tolerance or resistance to pests, diseases and drought.

The aim of the present research was to test twelve bean genotypes for productivity using techniques of fluorescence emission and oxygen exchange rate by plants, comparing them with the genotype Carioca that have large stability and most mean productivity among the varieties planted. The parameters determined were minimal fluorescence (F_0), maximal (F_m), and terminal (F_t), variable fluorescence, F_v ($F_v = F_m - F_0$), Quencher efficiency (E_q) and fotochemical efficiency (E_f). It was yet evaluated the O_2 evolved during photosynthesis and consumption during respiration.

The twelve genotypes were divided in 4 groups,

each with having the cv. Carioca as an internal check in a total of four genotypes each time with three replications. Each group was studied at a time by the impossibility to work with all genotypes simultaneously.

The results showed no differences among genotypes for the fluorescence parameter measured in the experiment.

Concerning O_2 changes, also no statistic difference was found among the genotypes. Nevertheless it was observed that the genotype Carioca always showed respiratory rates greater than the others, except for the genotype CNF 5547 (seed type looks like Carioca), which showed a respiratory rate ($1,106 \mu\text{M}O_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$) greater than that of the Carioca ($1,020 \mu\text{M}O_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

The greater respiration rate of the genotype Carioca been related to the efficient use of nitrogen through the greater disponibility of carbonic esqueletons, ATP, NADH, NADPH, and reduced ferredoxin, required in the processes of reduction and assimilation of the NH_4 in organic compounds.

The quanties efficiencies and quantic yields were determinated in the different genotypes and the Kok effect characterized, that is the change in the slope of the line of light versus net photosynthesis in low light intensity.

There was no statistic differences, by F test, at the level of 5%, to efficiencie and quantic yields among the genotypes within the groups.

The values found of quantic yield were in the range between 20-31 quanta/ O_2 evolved. The high values found in comparison with the literature is probably due to the methodology

employed since it depending on conditions of CO_2 concentrations the environment, the photorespiration would decrease the quantum yield up to 75% in an environment with low CO_2 saturation.

The Kok effect was observed for most genotypes tested. Only the group of genotypes formed by CNF 5598, CNF 5520, CNF 5539 and Carioca apparently showed no effect. This was probably due this group to growth under low light irradiance of the months of may through July, causing the plants to grow as it they were under shade. The latter condition results in photoinhibition and consequently fades the Kok effect.

LITERATURA CITADA

ALMEIDA, F. S. & RODRIGUES, B. N. Guia dos herbicidas. IAPAR, Londrina-PR. 1985. 468p.

ASLAM, M.; HUFFAKER, R.C. RAINS, D.W. & RAO, K.P. Influence of light and ambient carbon dioxide concentration on nitrite assimilation by intact barley seedlings. Plant physiol. 63, 1205 - 1209. 1979.

ASLAM, M. & HUFFAKER, R.C. In vivo nitrate reduction in roots and shoots of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings in light and darkness. Plant physiol. 70, 1009-1013. 1982.

AUSTIN, R.B. & MACLEAN, M.S.M. Some effects of temperature on the rates of photosynthesis and respiration of *Phaseolus vulgaris* L. Photosynthetica 6(1): 41-50, 1972.

BAKER, M.P. Effect of high cation concentrations on photosystem II activities. *Plant physiol.*, 62, 889-893, 1978.

-

BARBER, J. Photosynthetic electron transport in relation to thylakoid membrane composition and organization. *Plant, cell and environment*, 6, 311-322. 1983.

BARNES, J. D. & WILSON, J. M. Assessment of the frost sensitivity of *Trifolium* species by chlorophyll fluorescence analysis. *Ann. appl. Biol.* 105: 107-116. 1984.

BJÖRKMAN, O. & DEMMIG, B. Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77k among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170: 487 - 504. 1987.

BUSCHMANN, C., PREHN, H. & LICHTENTHALER, H. Photoacoustic spectroscopy (PAS) and its application in Photosynthesis research. *Photosynthesis Res.* 5, 29-46, 1984.

BUTLER, W. L. Energy distribution in the photochemical apparatus of Photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29, 345-78. 1978.

BUTT, V.S. Direct oxidases and related enzymes. In: *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise* (D.D.Davies, ed.), Vol. 2, pp. 81-117. Academic Press, London, 1980.

CLAYTON, R. Photosynthesis: Physical mechanisms and chemical patterns. Cambridge University Press, 1980. 281 p.

CRITCHLEY, C. Studies on the mechanism of photoinhibition in higher plants. 1. Effects of high light intensity on chloroplast activities in cucumber adapted to low light. Plant physiol. 67, 1161-1165. 1981.

CRITCHLEY, C. & SMILLIE, R. M. Leaf chlorophyll fluorescence as an indicator of high light stress (Photoinhibition) in *Cucumis sativus* L. Aust. J. Plant Physiol., 8, 133-141, 1981.

EHLERINGER, J. & BJÖRKMAN, O. Quantum yields for CO₂ uptake in C₃ and C₄ plants. Dependence on temperature, CO₂ and O₂ concentration. Plant physiol. 59, 86-90. 1977.

EHLERINGER, J. & PEARCY, R. W. Variation in quantum yield for CO₂ uptake among C₃ and C₄ plants. Plant Physiol., 555-559, 1983.

EVANS, J. R. The dependence of quantum yield on wavelength and growth irradiance. Aust. J. Plant physiol. 14, 69-79. 1987.

EVANS, J. R. The relationship between electron transport components and photosynthetic capacity in pea leaves grown at different irradiances Aust. J. Plant Physiol. 14, 157-70. 1985.

FARQUHAR, G.D. & CAEMMERER, S. VON. Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. In: Physiological Plant Ecology II. Water Relations and Carbon Assimilation. Lange, O.L. Nobel, P.S. Osmond, C.B. & Ziegler, H. (eds). Encyclopedia of plant physiology New Ser Vol 12B. Springer, Berlin Heidelberg York, pp. 549-587. 1982.

FEDTKE, C. Biochemistry and Physiology of Herbicide Action. Springer - Verlag Berlin Heidelberg. 1982. 202 p.

FRAZER, D.; COLBOW, K.; POPOVIC, R. & VIDAVER, W. Oxygen quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves at various irradiances. Photosynthetica 21 (1), 76-81, 1987.

GLAZER, A. N. Photosynthetic accessory proteins with bilin prosthetic groups. In: Hatch, M.D. & Boardman, N. K. (eds). The Biochemistry of Plants vol. 8 pp. 51-92, 1981. Academic Press, New York, London.

GRAHAM, D. Effects of light on dark respiration. In: The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise (D.D. Davies, ed.), vol. 2, pp. 525-579. Academic Press, London, 1980.

GRAHAM, D. & CHAPMAN, E.A. Interactions between photosynthesis and respiration in higher plants. In: Photosynthesis II. Photosynthetic Carbon Metabolism and Related Processes. Pirson, A. & Zimmermann, M.H. (eds) Vol 6. pp. 150-160. 1979.

- HALL, D.O. & RAO, K.K. Photosynthesis. The Camelot Press Ltd, Southampton. 84p. 1981. -
- HARRIS, M. & CAMLIN, M.S. Chlorophyll fluorescence as a rapid test for reaction to urea herbicides in winter wheat. J. Agric. Sci., 110, 627-632. 1988.
- HILLER, R. G. & GOODCHILD, D. J. Thylakoid membrane and pigment organization. In: Hatch, M. D. & Boardman, N. K. (eds). The Biochemistry of Plants vol. 8 pp. 02-46, 1981. Academic Press, New York, London.
- KOK, B. On the interrelation of respiration and photosynthesis in green plants. Biochim. Biophys. Acta 3, 625-631, 1949.
- KOW, Y. W.; ERBES, D. L. & GIBBS, M. Chloroplast respiration. A means of supplying oxidized pyridine nucleotide for dark chloroplastic metabolism. Plant physiol. 69, 442-447, 1982.
- KITAGIMA, M. & BUTLER, W. L. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. Biochim Biophys. Acta 376, 105-115, 1975.
- KRAUSE, G. H. & WEIS, E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology II. Interpretation of fluorescence signals. Photosynthesis Res. 5, 139-157, 1984.

- LONG, s.p. & HALLGREN, J. E. Photosynthesis. In: Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis. Coombs, J.; Hall, D.O.; LONG, S.P. & SCURLOCK, J. M. O. (eds). Pergamon Press, Oxford, England. 1985.
- MAGALHÃES, A. C. N. Fotossíntese, in: Fisiologia Vegetal 1. Editora Pedagógica e Universitária Ltda. São Paulo. 1985.
- MALKIN, S.; ARMOND, P. A.; MOONEY, H. A. & FORK, D. C. Photosystem II photosynthetic unit sizes from fluorescence induction in leaves. Correlation to photosynthetic capacity Plant Physiol. 67, 570-579, 1981.
- MALKIN, S. & FORK, D. C. Photosynthetic units of sun and shade plants. Plant physiol. 67, 580-583, 1981.
- MANGAT, B.S.; LEVIN, W.B. & BIDWELL, R.G.S. The extend of dark respiration in illuminated leaves and its control by ATP Levels. Can. J. Bot. 52, 673-681, 1974.
- MATHIS, P. & PAILLOTIN, G. Primary processes of photosynthesis. In: Hatch M.D. & Boardman N. K. (eds). The Biochemistry of Plants vol. 8 pp. 97-161, 1981. Academic Press, New York, London.

- MIRANDA, V.; BAKER, N. R. & LONG, S.P. Limitations of photosynthesis in different regions of the zeamays leaf. *New phytol.*, 89, 179 - 190. 1981.
- NOBEL, P. S. Introduction to Biophysical Plant Physiology. W. H. Freeman and Company. San Francisco. 1974. 488 p.
- ÖGREN, E. & ÖQUIST, G. Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves. *Planta*, 166, 380-388, 1985.
- ÖQUIST, G. & WASS, R. A portable, microprocessor operated instrument for measuring chlorophyll fluorescence kinetics in stress physiology. *Physiol. Plantarum* 73, 211-217. 1988.
- PIMENTEL GOMES, F. Curso de Estatística Experimental. Livraria Nobel, São Paulo. 1987. 467 p.
- POWLES, S. B. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 15 - 44. 1984.
- RAVEN, J. A. Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: A cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water. *New phytol.* 101: 25-77. 1985.

RUFTY, T. W.; ISRAEL, D. W. & VOLK, R. J. Assimilation of $^{15}\text{NO}_3$ taken up by plants in the light and in the dark. Plant Physiol. 76, 769-775. 1984 -

SCHMID, G. H. & GAFFRON, H. Photosynthetic units. J. Gen. Physiol., 52, 212-239, 1968.

SHARP, R. E.; MATTHEWS, M.A. & BOYER, J. S. KOK effect and the quantum yield of photosynthesis. Light partially inhibits dark respiration. Plant Physiol. 75, 95-101. 1984.

SUNDBOM, E. & ÖQUIST, G. Temperature-induced changes of variable fluorescence-yield in intact leaves. Plant, cell physiol. 23(7), 1161-1167, 1982.

TANAKA, A. & FUJITA, k. Growth, photosynthesis and yield components in relation to grain yield of the field bean. Journal of the Faculty of Agriculture of the Hokkaido University, Sapporo, 59(2): 145-238, 1979.

TOINOVEN, P. & VIDAVER, W. Variable chlorophyll a fluorescence and CO_2 uptake in water stressed white spruce seedlings. Plant Physiol. 86, 744-748, 1988.

- TOLBERT, N.E. Glycolate metabolism by higher plants and algae. In: Photosynthesis II. Photosynthetic carbon metabolism and related processes. Gibbs M. & Latzko, E. (eds). Encyclopedia of plant physiology New Ser Vol. 6. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 338-351. 1979.
- TOLBERT, N.E. Photorespiration. In: The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Davies, D.D. (eds). Vol. 2. Academic Press New York, London. pp. 487-523. 1980.
- WALKER, D. The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in sample measurements of photosynthesis. 145 p. Research Institute for photosynthesis, the University of Sheffield. Sheffield. 1986.
- WEGER, H. G.; BIRCH, D. G.; ELRIFI, I. R. & TURPIN, D. H. Ammonium assimilation requires mitochondrial respiration in the light. *Plant Physiol.* 86, 688-692. 1988.
- WEGER, H. G. & TURPIN, D. H. Mitochondrial respiration can support NO_3^- and NO_2^- reduction during photosynthesis. *Plant Physiol.* 89, 409-415. 1989.
- WEIS, E; TIMOTHY, J. B. & BERRY, S. Photosynthetic control of electron transport in leaves of Phaseolus vulgaris: Evidence for regulation of photosystem 2 by the proton gradient. *Progress in Photosynthesis Reser.* pp. 553-556. 1987.

ZELITCH, I. Photosynthesis, photorespiration, and plant productivity. Academic Press, New York, 1971.

ZELITCH, I. Photorespiration: studies with whole tissues. In: Gibbs, M. & Latzko, E. (ed): Photosynthesis II: Photosynthetic Carbon Metabolism and Related Processes. Pp. 353-365. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1979.