

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB1  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

**FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* E LIBERAÇÃO  
DE O<sub>2</sub> EM DIFERENTES VARIEDADES DE FEIJÃO  
(*Phaseolus vulgaris*) E SOJA (*Glycine Max* (L.) Merr.)  
APÓS APLICAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO.**

**KELLY PEREIRA DA SILVA**

Orientador: Prof. Dr. Tomás de Aquino Portes e Castro

Goiânia (GO)

2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFMG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFMG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese

#### 2. Nome completo do autor

Kelly Pereira da Silva

#### 3. Título do trabalho

Fluorescência da Clorofila a e Liberação de O<sub>2</sub> em Diferentes Variedades de Feijão (*Phaseolus vulgaris*) e Soja (*Glycine Max* (L.) Merr.) após aplicação de Sulfato de Amônio

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Kelly Pereira da Silva, Usuário Externo**, em 05/10/2021, às 15:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique De Castro, Coordenador de Pós-graduação**, em 05/10/2021, às 15:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º

---

15/10/2021 09:19

SEI/UGF - 2390209 - Termo de Ciência e de Autorização (TECA)



do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



---

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2390209** e o código CRC **BFA2F624**.

---

Referência: Processo nº 23070.053106/2021-11

SEI nº 2390209

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB1  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

**FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* E LIBERAÇÃO  
DE O<sub>2</sub> EM DIFERENTES VARIEDADES DE FEIJÃO  
(*Phaseolus vulgaris*) E SOJA (*Glycine Max* (L.) Merr.)  
APÓS APLICAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO.**

**KELLY PEREIRA DA SILVA**

Orientador: Prof. Dr. Tomás de Aquino Portes e Castro

Dissertação de mestrado  
apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de Goiás, para obtenção  
do título de Mestre em Biologia, na área de  
concentração de Biologia Celular e Molecular.

Goiânia (GO)

2006

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Kelly Pereira da

Fluorescência da clorofila a e liberação de O<sub>2</sub> em diferentes variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e soja (*Glycine Max* (L.) Merr.) após aplicação de sulfato de amônio. [manuscrito] / Kelly Pereira da Silva. - 2006.

XLVI, 46 f.

Orientador: Prof. Dr. Tomás de Aquino Portes.

Trabalho de Conclusão de Curso Stricto Sensu (Stricto Sensu) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia, Goiânia, 2006.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas.

1. liberação de O<sub>2</sub>. 2. *Phaseolus vulgaris*. 3. *Glycine Max*. 4. Fluorescência. 5. Eficiência fotoquímica e de quencher. I. Portes, Tomás de Aquino, orient. II. Título.


CDU 57





SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
Nº 264

**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO DE AUTORIA DE KELLY PEREIRA DA SILVA** – Aos vinte e cinco dias do mês de novembro do ano de dois mil e seis (25/11/2006), às 09:30 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof. Dr. Tomás de Aquino Portes e Castro - Orientador; Prof. Dr. Agostinho Dirceu Didonet; Prof. Dr. Nand Kumar Fageria para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no Mini-auditório do Instituto de Ciências Biológicas IV, da Universidade Federal de Goiás, procederem à avaliação da defesa de Dissertação intitulada: “Fluorescência da Clorofila a e Liberação de O<sub>2</sub> em Diferentes Variedades de Feijão ( *Phaseolus vulgaris*) e Soja ( *Glycine Max* (L.) Merr.) após Aplicação de Sulfato de Amônio” em nível de mestrado, de autoria de Kelly Pereira da Silva, discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. Tomás de Aquino Portes e Castro que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida à autora da dissertação que, em 40 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 572/2002 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia e procedidas às correções recomendadas, a Dissertação foi APROVADA por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM BIOLOGIA, na área de concentração em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGB da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. A banca examinadora recomenda a publicação de artigo(s) científico(s) oriundo(s) dessa dissertação em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17:00 horas a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado e para constar eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, secretária do PPGB lavrei a presente Ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.

  
Prof. Dr. Tomás de Aquino Portes e Castro  
Presidente da Banca  
Universidade Federal de Goiás

  
Prof. Dr. Agostinho Dirceu Didonet  
Embrapa Arroz e Feijão

  
Prof. Dr. Nand Kumar Fageria  
Embrapa Arroz e Feijão

Ao meu companheiro, Luiz Otávio,  
Dedico  
A meus amados pais, Joaquim e Lena,  
Ofereço

## AGRADECIMENTOS

Á Deus pelas bênçãos e graças concedidas junto com Jesus e Nossa Senhora.

À Universidade Federal de Goiás pela oportunidade oferecida.

À Faculdade de Agronomia da UFG, pelas sementes cedidas.

Ao Prof. Tomás de Aquino Portes e Castro, pela orientação e paciência.

À Marielly Pereira pela colaboração.

À colega Darlene Ana de Paula Vieira, pelo apoio e companheirismo.

Ao Thiago, Eliana, Roney Jr., Cecília Hãarengl pela colaboração.

À todos que direta ou indiretamente ajudaram para conclusão dessa dissertação.



## SUMÁRIO

Resumo.....	03
Abstract.....	04
1. Introdução.....	06
2. Revisão de Literatura	
2.1. Fotoquímica.....	10
2.2. Fluorescência.....	11
2.3. Interação fotossíntese x respiração.....	15
2.4. Rendimento fotoquímico.....	17
3. Material e Métodos	
3.1. Análise do solo.....	18
3.2. Material Vegetal.....	19
3.3. Tratamentos com sulfato de amônio.....	19
3.4. Variáveis analisadas	
3.4.1. Análise de fluorescência da clorofila a .....	20
3.4.2. Análise da liberação de O <sub>2</sub> .....	21
3.4.2.1. Calibração do eletrodo.....	22
3.4.2.2. Medição do O <sub>2</sub> de um disco foliar.....	23
3.4.2.3. Preparo da câmara porta-amostra.....	23
4. Resultados e Discussões	
4.1. Emissão da fluorescência da clorofila a e eficiência fotoquímica.....	26
4.1.1. Emissão da fluorescência da clorofila a e eficiência fotoquímica entre as variedades de feijão.....	29
4.1.2. Fluorescência da clorofila a e eficiência fotoquímica antes e depois da aplicação de sulfato de amônio em feijão.....	31

4.1.3. Emissão da fluorescência da clorofila a e eficiência fotoquímica entre as variedades de soja.....	33
4.1.4. Fluorescência da clorofila a e eficiência fotoquímica antes e depois da aplicação de sulfato de amônio em soja.....	35
4.2. Liberação de O <sub>2</sub> .....	36
4.2.1. Liberação de O <sub>2</sub> entre as variedades de feijão.....	37
4.2.2. Liberação de O <sub>2</sub> antes e após aplicação de sulfato de amônio.....	39
4.2.3. Liberação de O <sub>2</sub> entre as variedades de soja.....	40
4.2.4. Liberação de O <sub>2</sub> antes e após aplicação de sulfato de amônio.....	42
5. Conclusões.....	43
6. Referências bibliográficas.....	44

## Resumo

A produtividade dos vegetais é influenciada pelo clima, fisiologia e pela genética associadas à fotossíntese, a partição de fotoassimilados e fixação de N. A análise da fluorescência das clorofilas permite o estudo de características relacionadas à capacidade de absorção e transferência da energia luminosa na cadeia de transporte de elétrons.

O objetivo desta pesquisa foi testar três variedades de feijão e três de soja sob a influência do nitrogênio nas trocas de  $O_2$  e eficiência fotoquímica ( $E_f$ ); utilizando-se técnicas de emissão de fluorescência e de liberação de  $O_2$  pelas plantas, comparando-as entre si.

Os parâmetros determinados foram: fluorescência mínima  $F_0$ , máxima  $F_m$ , terminal  $F_t$ , fluorescência variável  $F_v$ , eficiência de “quencher”  $E_q$  e eficiência fotoquímica  $E_f$ . Foi também avaliada a liberação de  $O_2$  pela fotossíntese. As plantas foram submetidas ao nível recomendado de N e as determinações dos parâmetros de emissão de fluorescência ( $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_t$ ,  $F_v$ ,  $F_v/F_m$ ) e liberação de  $O_2$  foram realizadas um dia após a aplicação de  $NH_4$  na forma de sulfato de amônio.

Em relação aos parâmetros da fluorescência, não houve diferença entre as variedades de feijão e entre as variedades de soja. Houve diferença estatística com a soja, quando se analisou antes e após a aplicação de  $NH_4^+$ .

Observou-se que a liberação de  $O_2$  foi maior entre o feijão na variedade *Pérola* ( $1,50 \mu\text{mol de } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), e entre a soja foi maior para variedade *Monsoy* ( $1,58 \mu\text{mol de } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

**Termos adicionais para indexação:** liberação de  $O_2$ , *Phaseolus vulgaris*, *Glycine Max*, fluorescência, eficiência fotoquímica, eficiência de quencher.

## Abstract

The productivity of vegetables is influenced by weather, physiology and genetics associated by photosynthesis, by the division of photoassimilated, and by the fixation of N. The analysis of fluorescence of chlorophyll allows the study of the characteristics related with the capability of absorption and transference of the luminous energy in the chain of electron transport.

The aim of the present research was to test three varieties of kidney bean and three varieties of soy bean influenced by nitrogen in the exchanges of  $O_2$  and the photochemical efficiency (Ef), using techniques of emission of fluorescence and  $O_2$  evolved during photosynthesis, comparing each other.

The determined variants were: minimum fluorescence ( $F_0$ ), maximum fluorescence ( $F_m$ ), terminal fluorescence ( $F_t$ ), variable fluorescence ( $F_v$ ), efficiency quencher (Eq) and photochemical efficiency (Ef). The  $O_2$  evolved during photosynthesis was evaluated. The plants were submitted to the recommended level of N and the determinations of fluorescence emission ( $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_t$ ,  $F_v$ ,  $F_v/F_m$ ) and the  $O_2$  evolved during photosynthesis were realized one day after the application of  $NH_4^+$  like ammonium sulfate.

Related to fluorescence there was not difference between the varieties of kidney bean and soy bean. When it was analysed the application of  $NH_4^+$  it was observed that there was difference in the statistic of soy bean.

It was observed the  $O_2$  evolved during photosynthesis in the variety of kidney bean Pérola (  $1,50 \mu\text{mol de } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) was greater than the other and in the variety of soy bean Monsoy (  $1,58 \mu\text{mol de } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) was greater than the other.

**Additional index terms:** O<sub>2</sub> evolution, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine Max*, fluorescence, fotochemical efficiency, quencher efficiency.

## 1. Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das mais importantes oleaginosas cultivadas no mundo, principalmente devido aos elevados teores de proteína (40%), óleo (20%) e pelo alto rendimento de grãos. No Brasil, ela é cultivada numa grande diversidade de ambientes, englobando altas e baixas latitudes. Devido a essa ampla variação, torna-se fundamental a seleção de genótipos com elevada produtividade e adaptabilidade a vários ambientes.

A soja foi introduzida no Brasil no século passado, e sua produção comercial despontou na década de cinqüenta, no Rio Grande do Sul obtendo importante papel na economia do país, principalmente a partir da década de setenta (Gomes, 1990). Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja.

O feijoeiro apresenta quase 70% de abortamento natural de flores e vagens pequenas, esta alta taxa de abortamento ocorre, possivelmente, pela limitada disponibilidade de fotossintatos requeridos para o enchimento das vagens, resultando no abortamento das flores ou na produção de vagens chochas.

Mesmo após a antese os feijoeiros continuam crescendo, produzindo folhas e ramos, além das flores, vagens e grãos, resultando numa elevada competição energética pelos seus diferentes órgãos. Nessa fase do desenvolvimento, ocorre desaparecimento dos nódulos fixadores de nitrogênio (N), pela limitação de fotossintatos que deixam de ser direcionados para as raízes.

A fotossíntese total tem como função a produtividade da planta na qual necessita da irradiação recebida e captada com eficiência pela superfície foliar.

Este trabalho analisa a influência da aplicação de  $\text{NH}_4^+$  em forma de sulfato de amônio na capacidade fotossintética de 3 variedades de feijão: Pérola,

Requinte e Pontal, comparado-as a 3 variedades de soja: Monsoy, DM – 118 e BRSGO Luziânia, através das medições da emissão de fluorescência da clorofila a e liberação de O<sub>2</sub>.

Nem sempre se encontra relação direta entre rendimento econômico e fotossíntese, mas, condições adequadas de clima devem favorecer a ocorrência dessa relação ( Moss, 1975).

Observa-se ainda, que os feijoeiros, como outras leguminosas, não possuem reserva estratégica de fotossintatos capaz de suprir uma eventual demanda. Os fotossintatos para a produção de grãos são produzidos durante o período de pós-florescimento não sendo translocados do caule ou das raízes ou de outros órgãos como reservas armazenadas durante o período vegetativo ( Lucas et ali 1976). Qualquer limitação na capacidade das folhas em produzir fotossintatos repercutirá imediatamente na habilidade da planta em reter flores e vagens, com baixos resultados na produtividade de grãos.

Ao contrário da soja, os feijoeiros não possuem boa estabilidade de produtividade. É possível que esta baixa estabilidade esteja relacionada ao metabolismo do nitrogênio, o que funciona em estreita associação ao metabolismo do carbono.

O nitrogênio tem sido bem estudado no solo e nas plantas, tanto do ponto de vista da resposta das plantas a fertilizantes nitrogenados, como a fixação biológica e assimilação ( Lea & Miflin, 1974; Miflin & Lea 1977, Runge, 1983; Fageria, *et al.* 1997; Fageria & Baligar, 1999; Fageria & Baligar, 1999; Morris *et al.* 2002; Fageria & Baligar, 2003). Mas, ainda existem muitos questionamentos sobre o nitrogênio nas plantas.

Resultados experimentais sugerem que de alguma forma, ainda não bem definida, a respiração está envolvida no processo de assimilação do nitrogênio, não apenas fornecendo esqueletos carbônicos, mas também quando o poder redutor gerado na fotossíntese não está sendo fornecido adequadamente para a redução do nitrato ( Aslam *et al.* 1979; Aslam & Huffaker, 1982; Rufty *et al.* 1984; Weger & Turpin, 1989).

Embora tenha sido constatado o efeito sobre a respiração, da aplicação de nitrogênio ( Weger & Turpin, 1989) e de que, de alguma forma, o metabolismo do nitrogênio pode depender de ATP, NADP(H) e ferredoxina reduzida, formados em certos passos respiratórios, não tem sido explorado adequadamente se há correlação entre a assimilação de nitrogênio, a intensidade respiratória e fotossintética, e se a aplicação de N parceladamente, em pequenas doses na água de irrigação, após e durante o florescimento, resulta em redução no abortamento de flores e vagens e aumento da estabilidade.

Foi buscando analisar a influência do sulfato de amônio na eficiência fotoquímica e liberação de O<sub>2</sub> que este trabalho usou técnica de determinação da fluorescência mínima ( F<sub>0</sub> ), máxima ( F<sub>m</sub> ), terminal ( F<sub>t</sub> ) e variável ( F<sub>v</sub> ) da clorofila a, além da eficiência fotoquímica ( E<sub>f</sub> ) e da liberação de O<sub>2</sub> pelo processo fotossintético.

Os trabalhos de trocas de O<sub>2</sub> foram acompanhados com medições da emissão de fluorescência da clorofila a.

Este trabalho avaliou a influência do sulfato de amônio no metabolismo de diferentes variedades de feijão ( Pérola, Requite, Pontal) e soja ( Monsoy, Luziânia, DM 118); utilizando o método de emissão da fluorescência da clorofila a, com técnica de determinação da F<sub>0</sub>, F<sub>m</sub>, F<sub>t</sub> e variável além da E<sub>f</sub> e da liberação de O<sub>2</sub>



pelo processo fotossintético, visando avaliar semelhanças e diferenças entre as variedades de feijão e soja, antes e depois da aplicação de sulfato de amônio em condições de casa de vegetação.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. Fotoquímica

Durante o processo de assimilação do carbono tomam parte processos fotoquímicos dirigidos pela luz, processos enzimáticos não dependentes da radiação ( as chamadas reações do escuro) e os processos de difusão, que são as trocas de dióxido de carbono e oxigênio entre o cloroplasto e a atmosfera( Lawlor, 1993).

Um espectro de ação para fotossíntese pode ser construído a partir de medições da liberação de oxigênio em diferentes comprimentos de onda, por exemplo. Com freqüência, um espectro de ação pode identificar o cromóforo (pigmento) responsável por um fenômeno particular induzido pela luz. ( Taiz, 2004).

Durante o processo de assimilação do carbono tomam parte processos fotoquímicos dirigidos pela luz, processos enzimáticos não dependentes da radiação (as chamadas reações do escuro) e os processos de difusão, que são as trocas de dióxido de carbono e oxigênio entre o cloroplasto e a atmosfera ( Larcher, 2000).

A matéria seca das plantas, em geral, é composta em mais de 90% por substâncias originadas ou sintetizadas a partir do CO<sub>2</sub> atmosférico, pelo processo fotossintético. No caso do feijão e da soja, espécies pertencentes ao grupo C<sub>3</sub>, o CO<sub>2</sub> é fixado pela ribulose bifosfato e mediado pela enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco), no ciclo de Calvin ou ciclo fotossintético de redução de CO<sub>2</sub>( Robinson & Walker, 1981). A energia em forma de ATP e o poder redutor NADPH, para a realização do ciclo, provém do estágio fotoquímico da fotossíntese, acionado pela energia luminosa em interação com pigmentos da folha (Nobel, 1974)

Como resultado da fixação do CO<sub>2</sub> há a produção de carboidratos; como sacarose. Este carboidrato é translocado e, subseqüentemente, transformado em amido. Da folha a sacarose pode translocar na planta indo suprir a demanda energética de outros órgãos(Wien *et al.* 1976; Tanaka & Fugita, 1979).

Na agricultura, o nitrogênio é determinante na produção das culturas, além de ser um dos fertilizantes que mais participam do sistema agrícola (Mae, 1997). Sua assimilação está diretamente relacionada com o metabolismo do carbono, que fornece energia na forma de esqueletos de carbono necessários para converter o nitrogênio inorgânico em compostos orgânicos (Peuke & Jeschke, 1993).

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram vários mecanismos para a utilização de diferentes formas de nitrogênio. O nitrato é considerado uma das fontes nitrogenadas mais importantes para os vegetais (Crawford, 1995).

## **2.2. Fluorescência**

O registro da fluorescência em folhas intactas e tecidos verdes (fluorescência da clorofila a *in vivo*), especialmente durante a fase de indução pela exposição à radiação após uma fase de escuro (efeito Kautsky), permite avaliar o estado do fotossistema, do transporte eletrônico e a preparação do gradiente protônico necessário à síntese do ATP. Dentro de um questionamento ecofisiológico, a fluorescência *in vivo* pode ser utilizado para a investigação da adaptação à radiação e para a detecção das mudanças do aparato fotossintético durante o desenvolvimento ou durante um estresse ( Larcher, 2000).

No estado de menor excitação, a clorofila excitada possui quatro alternativas de rotas para liberar a energia disponível. Uma delas é a reemissão de

um fóton pela clorofila e, assim, retornar ao seu estado-base – um processo conhecido como fluorescência. Quando isto acontece, o comprimento de onda da fluorescência é levemente mais longo ( e com menor energia) do que o comprimento de onda absorvido, pois uma parte da energia de excitação é convertida em calor antes da emissão do fóton fluorescente. A clorofila fluoresce na região vermelha do espectro( Taiz, 2004).

No processo fotossintético, a luz é absorvida por pigmentos do complexo-antena, que, excitados, transferem energia para os centros de reação dos fotossistemas I e II ( $P_{700}$  e  $P_{680}$ , respectivamente) (Young & Frank, 1996). Quando ocorre excesso de energia, esta pode ser dissipada na forma de fluorescência (Krause & Winter, 1996). Portanto, uma das formas de monitoramento da inibição ou redução na transferência de elétrons entre os fotossistemas da planta sob estresse, que pode ser observada ainda em folhas intactas, é a fluorescência da clorofila (Maxwell & Johnson, 2000), em que a redução na dissipação da energia pelo processo fotoquímico é refletida por incremento correspondente na fluorescência.

A análise da fluorescência da clorofila *a* vem sendo largamente utilizada no entendimento dos mecanismos da fotossíntese propriamente dito, bem como na avaliação da capacidade fotossintética alterada por estresses bióticos ou abióticos pelos quais as plantas possam passar, como temperatura (Oliveira *et al.*, 2002), radiação (Mazza *et al.*, 2000), deficiência hídrica (Roden & Ball, 1996), salinidade (Belkhdja *et al.*, 1994), presença de insetos (Bown *et al.*, 2002) ou fungos (Peterson & Aylor, 1995), herbicidas (Ireland *et al.*, 1986) e deficiência nutricional entre outros. Para esse tipo de avaliação são utilizados fluorômetros de luz modulada (Schreiber *et al.*, 1996), cujas aplicações variam desde a rápida identificação de injurias causadas ao aparelho fotossintético, mesmo quando o sintoma ainda não é visível,

até a análise detalhada da alteração da capacidade fotossintética da planta. Uma das grandes vantagens do uso deste método é o fato de a medição não ser destrutiva, sendo possível de se realizar tanto em laboratório quanto em campo.

A eficiência fotoquímica máxima ou rendimento quântico máximo do fotossistema II (PS II) das plantas é dada pela razão  $F_v/F_m$ , em que  $F_m$  é a fluorescência máxima e  $F_v$  é a fluorescência variável, sendo esta obtida através da equação  $(F_m - F_0)$ , em que  $F_0$  representa a fluorescência inicial, correspondendo à fração da energia absorvida pelo complexo-antena e não transmitida, ou seja, não absorvida pelos pigmentos fotossintéticos (Rascher *et al.*, 2000).

Em temperatura ambiente (temperatura fisiológica, 20 a 25°C), fluorescência é uma luz emitida e exibe um ponto máximo de emissão na faixa de 682 nm e outro ponto menos pronunciado em 740 nm (Krause & Weis, 1984). Quando um tecido fotossintetizante é iluminado, ele irá emitir fluorescência continuamente. Entretanto, fluorescência contínua por si só fornece poucas informações sobre os processos fisiológicos. A melhor maneira de obter informações é por meio de interpretações da cinética de emissão da fluorescência com o tempo. Os estudos com fluorescência têm-se relacionado com as respostas da fluorescência quando um tecido fotossintetizante é rapidamente iluminado, após ter sido mantido no escuro por minutos ou horas.

Cerca de 90% da fluorescência origina-se da clorofila *a* do fotossistema II (PSII), refletindo os processos primários da fotossíntese, como captação de luz, distribuição e transferência da energia de excitação (Krause & Weis, 1991). Parte dessa fluorescência emitida pode ser uma resposta às mudanças na atividade do PSII. Tendo em vista a relação funcional do PSII para com outros componentes do aparelho fotossintético, a emissão de fluorescência é usada como um indicador

indireto do processo fotossintético como um todo. Essas reações dependem do estado de oxi-redução da quinona *a* (Qa), do receptor primário do PSII, e do gradiente de prótons ( $H^+$ ) intermembrana. Portanto, não só os fatores relacionados com a etapa fotoquímica, mas também aqueles envolvidos com as reações de fixação do carbono, todos, direto ou indiretamente, refletem na fluorescência emitida pela clorofila *a* do centro de reação do PSII. É por isso que o estudo da cinética da fluorescência da clorofila *a* é um bom instrumento para se avaliar a atividade fotossintética, com a grande vantagem de ser um procedimento não invasivo. Desde 1937, a fluorescência da clorofila *a* tem sido usada como ferramenta sensível e não destrutiva para monitorar a fotossíntese (Krause & Weis, 1991; Govindjee, 1995).

Para a interpretação das variáveis do processo fotossintético existe uma extensa opção de sinais de fluorescência utilizados (Maxwell & Johnson, 2000; Rohacek, 2002; Baker & Rosenqvist, 2004). Alguns sinais são gerados diretamente enquanto outros são decorrentes de relações entre esses. Os sinais básicos, de maior emprego da fluorescência da clorofila *a* são:  $F_0$ ,  $F_v$ ,  $F_m$ ,  $F_v/F_m$  e  $F_t$ .

A fluorescência mínima ou inicial ( $F_0$ ) reflete o estado da clorofila *a* do complexo-antena. O complexo coletor de luz - antena – é formado por proteínas integrais associadas às clorofilas (*a* e *b*) e aos carotenóides; esse complexo é responsável pela captura de fótons e transferência da excitação até os pigmentos clorofila *a* associadas ao centro de reação do PSII. De acordo com Bolhar-Nordenkampf & Öquist (1993)  $F_0$  é uma medida para a distribuição inicial da energia, antes da excitação migrar para o centro de reação ( $P_{680}$ ) do PSII. O valor de  $F_0$  é uma referência para a determinação dos outros sinais da fluorescência (Hipkins & Baker, 1986).

Nos últimos anos medições da emissão de fluorescência pela clorofila *a* vem sendo intensamente utilizada em vários estudos de fisiologia vegetal.

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.

### **2.3. Interação fotossíntese x respiração**

Resultados experimentais sugerem que de alguma forma, ainda não bem definida, a respiração está envolvida no processo de assimilação do nitrogênio, não apenas fornecendo esqueletos carbônicos, mas também quando o poder redutor gerado na fotossíntese não está sendo fornecido adequadamente para a redução do nitrato (Aslam *et al.* 1979; Aslam & Huffaker, 1982; Rufty *et al.* 1984; Weger & Turpin, 1989)

Embora tenha sido constatado o efeito sobre a respiração, da aplicação de nitrogênio (Weger & Turpin, 1989) e de que, de alguma forma, o metabolismo do nitrogênio pode depender de ATP, NADP(H) e ferredoxina reduzida, formados em certos passos respiratórios, não tem sido explorado adequadamente se há correlação entre assimilação de nitrogênio e a intensidade respiratória e fotossintética, e ainda se a aplicação de nitrogênio parceladamente, em pequenas doses na água de irrigação, após e durante o florescimento, resulta em redução no abortamento de flores e vagens e aumento da estabilidade.

Com o aumento da temperatura, a concentração de CO<sub>2</sub> em uma solução em equilíbrio com o ar decresce mais rapidamente do que a concentração de O<sub>2</sub>.

Conseqüentemente, a razão das concentrações de  $\text{CO}_2$  para  $\text{O}_2$  decresce com o aumento da temperatura. Resultando em um incremento da fotorrespiração (oxigenação) . Tal efeito é acentuado pelas propriedades cinéticas da rubisco, o que também resulta em um aumento relativo da oxigenação em altas temperaturas. Em geral, então, o aumento progressivo da temperatura altera o balanço na direção oposta ao ciclo de Calvin e em direção do ciclo oxidativo fotossintético do carbono (Taiz, 2004).

Certos gases na atmosfera, em particular  $\text{CO}_2$  e metano, desempenham o mesmo papel do teto de vidro de uma estufa. O aumento da concentração de  $\text{CO}_2$  e da temperatura associada com o efeito estufa podem influenciar a fotossíntese. Nas concentrações de  $\text{CO}_2$  atmosférico atuais, a fotossíntese de plantas  $\text{C}_3$  está limitada, mas tal situação poderia mudar se a concentração do  $\text{CO}_2$  atmosférico continuasse a crescer. Em condições de laboratório, a maioria das plantas  $\text{C}_3$  cresce 30 a 60% mais rápido quando a concentração de  $\text{CO}_2$  é duplicada ( para 600 a 700 ppm) e a taxa de crescimento altera-se de acordo como o estado nutricional. Em algumas plantas o aumento é apenas temporário.

A parte aérea das plantas terrestres são bem abastecidas com oxigênio. Os plastídeos verdes fotossinteticamente ativos dos tecidos primários da parte aérea ( córtex e parênquima) e de frutos liberam o oxigênio para o sistema de espaços intercelulares. Talvez este fato tenha grande importância para órgãos maciços fotossintetizantes, apesar do baixo ganho de carbono que apresentam. Por outro lado, as raízes e caules subterrâneos estão sujeitos a um fraco abastecimento de oxigênio ( Larcher,2000)



## **2.4. Rendimento fotoquímico**

O quenching não fotoquímico, um dos principais processos que regulam a distribuição da energia de excitação para os centros de reação, regula o fluxo de excitações para o centro de reação do PSII em um nível aceitável (Taiz,2004).

O quenching não-fotoquímico é o quenching da fluorescência da clorofila por processos outros que não a fotoquímica. Como resultado do quenching não fotoquímico, uma grande fração da excitações no sistema de antena causadas pela iluminação intensa é eliminada por sua conversão em calor. Acredita-se que o quenching não-fotoquímico está envolvido na proteção do maquinário fotossintético contra a super-excitação e um possível e subsequente dano ( Krause e Weis, 1991).

### 3. Material e Métodos

O experimento foi executado no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação com variação de temperatura noturna/diurna entre 18° e 30° C. Foram utilizados 12 vasos com duas plantas por vaso após o desbaste, com 4 repetições, sendo três variedades de soja: DM-118, Monsoy e BRSGO Luziânia; e três variedades de feijão: Pérola, Requite e Pontal.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições para cada variedade de feijão e soja, totalizando 24 vasos.

#### 3.1. Análise do solo

A análise do solo foi realizada anteriormente à implantação do experimento. As amostras de solo foram coletadas na profundidade de 0-20cm, conforme metodologia descrita pela Comissão de Fertilidade do Solo (1995). Os atributos químicos e físicos do solo estão apresentados na figura 1. Solo utilizado é argiloso com baixo teor de matéria orgânica.

Tabela 1.

Argila %	Silte %	Areia %	M.O <sup>2</sup> %	pH (CaCl <sub>2</sub> )	P <sup>1</sup> (Mehlich) mg/dm <sup>3</sup>	K mg/dm <sup>3</sup>	Ca cmolc/dm <sup>3</sup>	Mg cmolc/dm <sup>3</sup>	H+Al cmolc/dm <sup>3</sup>	Al cmolc/dm <sup>3</sup>	CTC cmolc/dm <sup>3</sup>	V %
52,0	19,0	29,0	1,4	4,9	0,1	50,0	0,8	0,2	2,8	0,0	3,9	28,7

Análise foi realizada no laboratório de solo da Escola de Agronomia da UFG.

Extrator Mehlich 1

Matéria orgânica 2

**Tabela - 1. Resultado da análise química e granulométrica, entre 0-20cm de profundidade, realizada anteriormente à implantação do experimento.**

### **3.2. Material Vegetal**

As sementes de feijão e soja foram cedidas pela Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, Campus Universitário II. As sementes foram semeadas em vasos com 7 Kg de solo, sendo três variedades de soja: Monsoy, BRSGO Luziânia e DM - 118 e três variedades de feijão: Pérola, Requite e Pontal.

A adubação de manutenção do solo nos vasos foi na base de 3,7g de adubo na formulação 4 – 30 – 10 por vaso.



**Figura 1. Vasos com as plântulas de feijão ( A ) e soja ( B ) três dias após a imergência.**

### **3.3. Tratamentos com sulfato de amônio**

Após o estabelecimento das plantas foi feito o desbaste, deixando duas plantas por vaso. Antes da aplicação de N foram feitas medidas de fluorescência ( $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_v$ ,  $F_v/F_m$ ) e liberação de  $O_2$ .

Foram aplicadas, 0,35g de  $(NH_4)_2SO_4$  trinta dias após o desbaste.

### **3.4. Variáveis Analisadas**

#### **3.4.1. Análise de fluorescência da clorofila a**

A determinação das variáveis da cinética de emissão da fluorescência ( $F_0$ ,  $F_v$ ,  $F_t$ ,  $F_v/F_m$ ) foi realizada um dia após a aplicação de sulfato de amônio, utilizando-se o fluorômetro portátil (PEA – Plant Efficiency Analyser, Hansatech).

A partir do dia seguinte à aplicação de sulfato de amônio, as folhas trifolioladas destinadas às medições foram destacadas sempre do 3º nó da base para o ápice da haste principal, de modo a padronizar o material objeto de análise.

As pinças utilizadas na adaptação da folha ao escuro foram colocadas na região mediana da terceira folha do terceiro nó da base para o ápice. Foram utilizadas todas as repetições dos tratamentos. Após 30 minutos de adaptação da folha no escuro, a leitura foi feita com emissão de um pulso de luz saturante de 10 segundos sob frequência de 0,6 KHz, na face adaxial da folha por meio de fluorômetro portátil, onde foram registrados os valores das fluorescências:  $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_v$ ,  $F_t$  e  $F_v/F_m$ .

Em que:

$F_0$  = Fluorescência inicial

$F_m$  = Fluorescência máxima

$F_v$  = Fluorescência variável

$F_t$  = Fluorescência terminal

$F_v/F_m$  = Eficiência fotoquímica

**Tabela 2. Variedades de soja e feijão estudados e Datas do plantio, aplicação de sulfato de amônio e medição das variáveis nos três tratamentos de soja e feijão.**

Grupo	Variedade	Data do Plantio	Data da aplicação de sulfato de amônio	Data da Medição
1	Soja ( 011/DM-118) Soja( Monsoy) Soja(BRSGOLuziânia)	12/06/2006	21/07/2006	22/07/2006
2	Feijão ( Pérola ) Feijão ( Requite) Feijão ( Pontal )	12/06/2006	21/07/2006	22/07/2006

As medições de fluorescência da clorofila *a*, foram realizadas na casa de vegetação a temperatura média de 30°C. Para tal, a região da folha na qual realizou-se a leitura permaneceu no escuro por um período mínimo de 30 minutos.

Foram calculadas as eficiências fotoquímicas ( $E_f$ ) e do “quencher” ( $E_q$ ) do PSII, utilizando as equações:

$$E_f = (F_m - F_0) / F_m$$

Como  $F_m - F_0$  é igual a  $F_v$ , resulta que,

$$E_f = F_v / F_m$$

### 3.4.2. Análise de liberação de O<sub>2</sub>

A liberação de O<sub>2</sub> pela fotossíntese foi quantificada com o uso de um eletrodo de Clarke. 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).

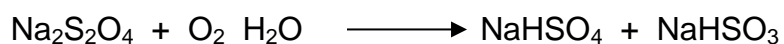
O sinal de saída do equipamento, em *mv*, foi lido diretamente no mostrador do aparelho. Posteriormente, usando fator de calibração, o sinal em *mv* foi convertido em concentração de O<sub>2</sub>.

Mesmo na ausência de O<sub>2</sub> as reações eletroquímicas geram uma pequena “corrente residual”; deste modo, para uma calibração exata, esta discrepância entre “O<sub>2</sub> zero” e o “zero elétrico”, foi eliminada.

#### 3.4.2.1. Calibração do eletrodo

A calibração consistiu, primeiramente, em reduzir a concentração de oxigênio na superfície do eletrodo par obter o zero. Para isto colocou-se sobre o eletrodo uma gota de água destilada contendo alguns grânulos de ditionito de sódio.

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 O<sub>2</sub> do ar ( 21% de O<sub>2</sub>). O eletrodo, assim preparado, foi colocado cuidadosamente na câmara.

#### **3.4.2.2. Medição do O<sub>2</sub> de um disco foliar**

Para a realização das medições de concentrações de O<sub>2</sub>, as folhas, totalmente expandidas, foram destacadas da planta, foi retirado o folíolo central da folha situada na haste do 3º nó da base para ápice. Para evitar o murchamento os tecidos foram introduzidos em água destilada e levadas ao laboratório, onde ficaram até a retirada dos discos, para assegurar equilíbrio com as novas condições de temperatura. Em seguida, foi retirado um disco de 10 cm<sup>2</sup>, e imediatamente introduzido na câmara, para proceder as leituras.

Após a aplicação do tratamento, sulfato de amônio (  $\text{NH}_4$ ) foram feitas diariamente medições da liberação de  $\text{O}_2$  pelo disco foliar, às 9:00h, totalizando cinco ( 5 ) medições ( Tabela - 3).

### **3.4.2.3. Preparo da câmara porta-amostra**

Como em um sistema fechado, a quantidade de  $\text{O}_2$  depende da sua pressão parcial e do volume da câmara, sendo necessário portanto, a sua determinação. Previamente à determinação do volume da câmara, é necessário prepara-la, introduzindo alguns dispositivos como disco metálico e esponja de náilon, com finalidades específicas citadas por Walker ( 1986). A esponja de náilon é saturada com um ( 1 ) mL ( mililitro) de solução tampão ( uma parte de solução 0,4 M de borato pH 9,0 e duas partes de solução de bicarbonato de sódio 1,0 M), previamente ajustada para pH 9,0 pela adição de carbonato de sódio equimolar, cuja finalidade é repor o  $\text{CO}_2$  absorvido pelo tecido, mantendo a sua concentração aproximadamente constante.

O disco foliar é introduzido e a câmara fechada. Nestas condições é feita a primeira leitura no mostrador do aparelho, a qual se denomina L1. Em seguida, com uma seringa, é injetado 1,0 mL de ar na câmara, com a parte oposta à seringa fechada 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).

$$V = L1 / ( L2 - L1 )$$

Como já visto anteriormente, com a remoção da solução de ditionito do eletrodo o sinal em *mv* gerado deverá corresponder ao conteúdo de O<sub>2</sub> do ar, ou seja, 21 % em volume. Assim, nas condições normais de temperatura e pressão, a quantidade de O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> será :

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

$$\text{Onde } k = 9,37 \times ( 273 / ( 273 + T ) ).$$

Desta quantidade ( Q<sub>O<sub>2</sub></sub> ) resulta o sinal L1 lido inicialmente, indicando que a relação Q<sub>O<sub>2</sub></sub>/L1 será o fator que, multiplicado pela diferença nas leituras, nos tempos t<sub>1</sub> e t<sub>2</sub> ( diferença entre duas leituras numa diferença de tempo t, ( 5 minutos, por exemplo), fornecerá a taxa de O<sub>2</sub> liberado ou consumido num determinado tempo.

Encontrada a taxa de O<sub>2</sub> liberado ou absorvido por um disco de 10 cm<sup>2</sup>, por hora, calcula-se a taxa corrigida, em µM de O<sub>2</sub>/ m<sup>2</sup>/ s, pela equação:

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

O eletrodo de Clarke 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.

As taxas fotossintéticas (liberação de O<sub>2</sub>) foram medidas com densidade de fluxo de fótons de  $50 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Emissão da fluorescência da clorofila a e eficiência fotoquímica entre as variedades de feijão

Visando calcular as eficiências dos processos fotoquímicos ( $E_f$ ) e do “Quencher” ( $E_q$ ), foi necessário obter  $F_m$  para o extintor no estado totalmente reduzido, 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 77 K (Krause e Weiss, 1984) ou, alternativamente, permitindo o tecido foliar se adaptar ao escuro por algum tempo.

Segundo Portes (1993), 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”. 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, de acordo com Portes (1993), no caso da folha do feijoeiro, o tempo de 30 minutos de escuro foi insuficiente, pois o sinal foi maior quando utilizados 60 minutos de adaptação. 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.

As variáveis mais importantes do sinal de fluorescência da clorofila a são a fluorescência inicial,  $F_0$ , fluorescência máxima,  $F_m$ , e fluorescência terminal,  $F_t$ . 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 inferior a um minuto, que é a capacidade de leitura do aparelho.

Na tabela 2 estão apresentados os valores médios de fluorescência mínima ( $F_0$ ), fluorescência variável ( $F_v$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ), eficiência fotoquímica ( $F_v/F_m$ ), fluorescência terminal ( $F_t$ ), e eficiência de “quencher” das diferentes variedades de feijão, na tabela 2.

**Tabela 3. Valores das variáveis Fluorescência encontrados para 3 variedades de feijão ( Pérola, Requite, Pontal), antes da aplicação do sulfato de amônio, A,B,C,D são as repetições.**

Tratamentos	$F_0$	$F_m$	$F_v$	$F_t$	$E_f$	$E_q$
Pérola	937	3871	2934	148	0,457	3,97
Pérola	1040	3835	2795	163	0,728	3,53
Pérola	1266	3853	2587	283	0,671	2,82
Pérola	1169	3402	2233	394	0,656	2,57
Média	1103	3740	2637	247	0,628	3,17
Requite	800	3702	2902	124	0,783	4,47
Requite	1063	3620	2557	380	0,706	3,05
Requite	971	3852	2881	267	0,747	3,69
Requite	1020	3622	2602	135	0,718	3,42
Média	963	3699	2735	226	0,739	3,61
Pontal	962	3434	2472	346	0,719	3,21
Pontal	1525	3607	2082	307	0,577	2,16
Pontal	1684	4012	2328	248	0,58	2,24
Pontal	722	4088	3366	146	0,823	5,46
Média	1223	3785	2562	261	0,675	2,88

Estatisticamente, não houve diferença entre as variedades de feijão, levando-se em consideração a eficiência fotoquímica ( $E_f$ ) em nível de significância de 5% pelo teste F. ( $p \geq 5$ )

As diferenças observadas nos valores de fluorescência mínima ( $F_0$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ), fluorescência variável ( $F_v$ ) e fluorescência terminal ( $F_t$ ) entre as variedades não alteraram os valores de Eficiência de quencher ( $E_q$ ) e Eficiência fotoquímica ( $E_f$ ), porque estes são obtidos pela relação entre valores de um mesmo sinal de fluorescência, portanto, independem da escala de ampliação.

As variáveis de Eficiência fotoquímica ( $E_f$ ) calculadas estão apresentadas na tabela 4, de análise de variância. Pela análise constata-se que não houve diferença na eficiência fotoquímica ( $E_f$ ) entre as variedades de feijão, pois o  $F_{\text{calculado}} = 1,00$  é menor que o  $F_{\text{tabelado}} = 4,26$  a 2 graus de liberdade no numerador e 9 graus de liberdade no denominador, ao nível de significância de 5%.

**Tabela 4. Análise de variância dos dados da tabela 3.**

<b>Causas de variação</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
<b>tratamentos</b>	<b>2</b>	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>	<b>1,00</b>
<b>resíduo</b>	<b>9</b>	<b>0,12</b>	<b>0,01</b>	
<b>total</b>	<b>11</b>			

O fato das variáveis associadas à emissão da fluorescência ( $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_v$ ,  $E_q$  e  $E_f$ ) não terem diferido entre as variedades de feijão pode indicar que os materiais testados são geneticamente muito próximos em relação à atividade fotoquímica dentro do processo fotossintético.

Bjorkman e Demming ( 1987 ) mediram a emissão de fluorescência a 77K de espécies dos grupos  $C_3$  e  $C_4$ , e encontraram diferenças na emissão de fluorescência entre as espécies dos diferentes grupos e entre folhas crescidas ao sol e à sombra da mesma espécie. Esses autores sugeriram que a determinação da relação  $F_v/F_m$  se constitui em excelente método para a avaliação da atividade fotoquímica do PSII.

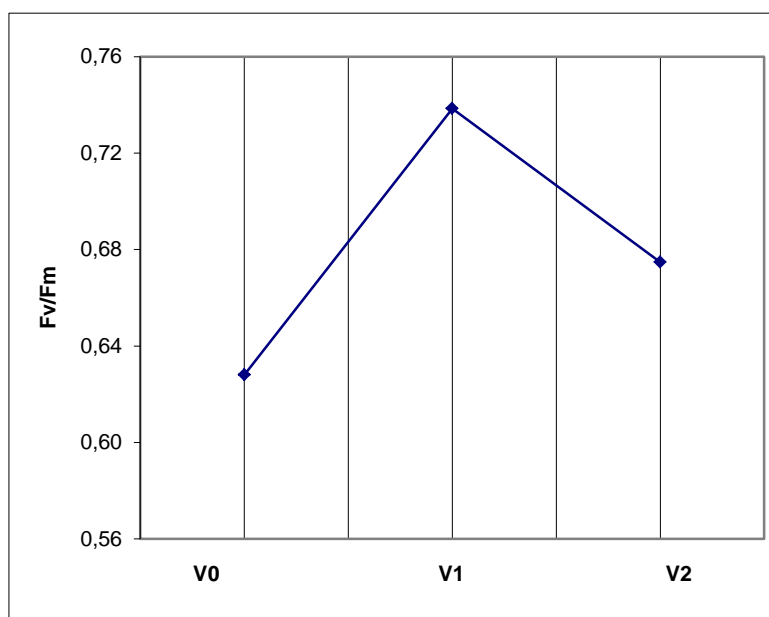


Figura 5. Eficiência fotoquímica (Fv/Fm) nas folhas de feijoeiro, das variedades de feijão: V0 (Pérola), V1 (Requinte), V2 (Pontal).

#### 4.1.1. Emissão da fluorescência da clorofila a e eficiência fotoquímica entre as variedades de soja

Valores de fluorescência mínima ( $F_0$ ), fluorescência variável ( $F_v$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ), eficiência fotoquímica ( $F_v/F_m$ ), fluorescência terminal ( $F_t$ ), das diferentes variedades de soja, estão apresentados na tabela 8.

Tabela 5. Valores de fluorescência da clorofila a encontrados para 3 variedades de soja (DM-118, Monsoy, BRSGOLuziânia) antes da aplicação do sulfato de amônio, sendo S – soja, 0,1,2 – respectivamente a variedade de soja: A,B,C,D são as repetições.

Tratamentos	$F_0$	$F_m$	$F_v$	$F_t$	$F_v/F_m$	Eq
S2B	1328	3880	2552	240	0,657	2,74
S2C	1454	3744	2290	237	0,611	2,41
S2D	1367	3712	2345	280	0,631	2,51
S2A	1416	3129	1713	210	0,547	2,06
Média	1391	3616	2225	242	0,612	2,43

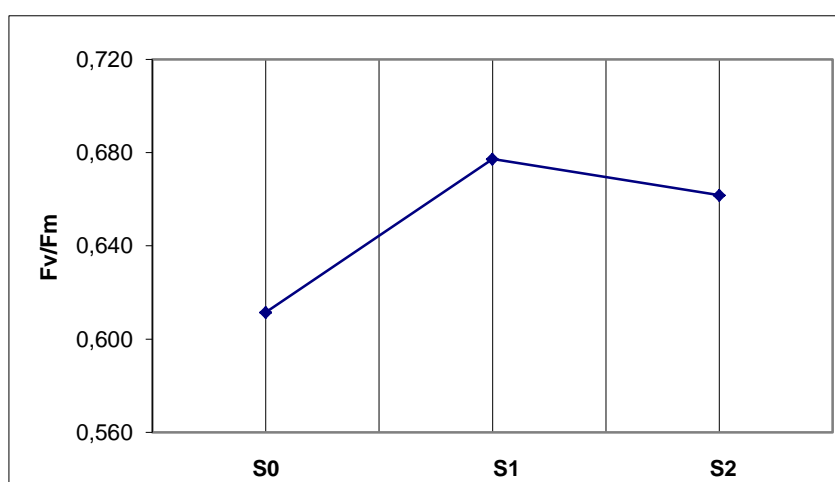
S1D	861	3700	2839	135	0,767	4,14
S1C	728	3776	3051	154	0,807	4,98
S1B	1592	3986	2394	362	0,6	2,28
S1A	1590	3425	1835	204	0,535	2,03
Média	1193	3722	2530	214	0,677	2,94
S0B	793	3866	3073	143	0,794	4,69
S0D	737	3998	3261	148	0,845	5,22
S0A	1430	2642	1212	176	0,458	1,72
S0C	1682	3738	2056	234	0,55	2,08
Média	1160	3561	2400	175	0,662	2,92

Estatisticamente, não houve diferença entre as variedades de soja, levando-se em consideração a eficiência fotoquímica, em nível de 5% pelo teste F.

Os resultados da análise de variância apresentados na tabela 10, mostram que entre as variedades de soja não existe diferenças significativas quanto a  $F_v/F_m$ . Queda nos valores da razão  $F_v/F_m$  indica decréscimo na eficiência fotoquímica, o que infere uma diminuição da eficiência do aparelho fotossintético na absorção e transferência de energia luminosa até os centros de reação e queda na reoxidação dos receptores de elétrons do PSII (plastoquininas) (Bacarin & Mosquim, 2002). Mecanismos compensatórios devem ocorrer para manter a eficiência fotoquímica do transporte de elétrons pelo PSII praticamente inalterado entre as variedades.

**Tabela 6. Análise de variância do dados da tabela 9.**

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
tratamentos	2	0,02	0,01	1,00
resíduo	9	0,05	0,01	
total	11			



**Figura 6. Eficiência fotoquímica ( $F_v/F_m$ ) das folhas de soja, as variedades de soja: S0 (BRSGOLuziânia), S1 ( Monsoy), S2 ( DM - 118).**

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

#### **4.1.2. Fluorescência da clorofila a e eficiência fotoquímica antes e após a aplicação de sulfato de amônio em soja**

Em se tratando das variedades de soja, a tabela , com as leituras de Eficiência fotoquímica (  $F_v/F_m$  ), mostra os valores médios da eficiência fotoquímica antes e depois da aplicação de sulfato de amônio.

**Tabela 7. Valores médios de Eficiência Fotoquímica ( $F_v/F_m$ ) antes e após a aplicação de sulfato de amônio.**

Repetições	Antes	Depois
S0	0,66	0,73
S1	0,68	0,72
S2	0,61	0,71

Estatisticamente, houve diferença entre as variedades de soja, levando-se em consideração a eficiência fotoquímica (  $E_f$  ), em nível de 5% pelo teste F, antes e depois da aplicação de sulfato de amônio.

As variáveis de Eficiência fotoquímica (Ef) calculadas antes da aplicação de sulfato de amônio e após a aplicação de sulfato de amônio estão apresentadas na tabela 12, de análise de variância. O resultado da análise de variância apresentada mostra que houve diferença na eficiência fotoquímica ( Ef ) entre as variedades de soja antes e após a aplicação de nitrogênio, ao nível de significância de 5%.

Porém, os resultados obtidos neste estudo, sugerem que a aplicação de  $\text{NH}_4^+$  proporciona uma melhor eficiência fotoquímica para a soja do que para o feijão, devido a sua melhor assimilação de nitrogênio.

**Tabela 8. Análise de variância dos dados da tabela 11.**

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
tratamentos	1	0,007	0,007	7,00
resíduo	4	0,002	0,001	
total	5			

Nota-se que apesar da variedade DM-118 apresentar uma acentuada elevação na taxa de Ef, como mostra a figura 6, estatisticamente essa elevação não é significativa.

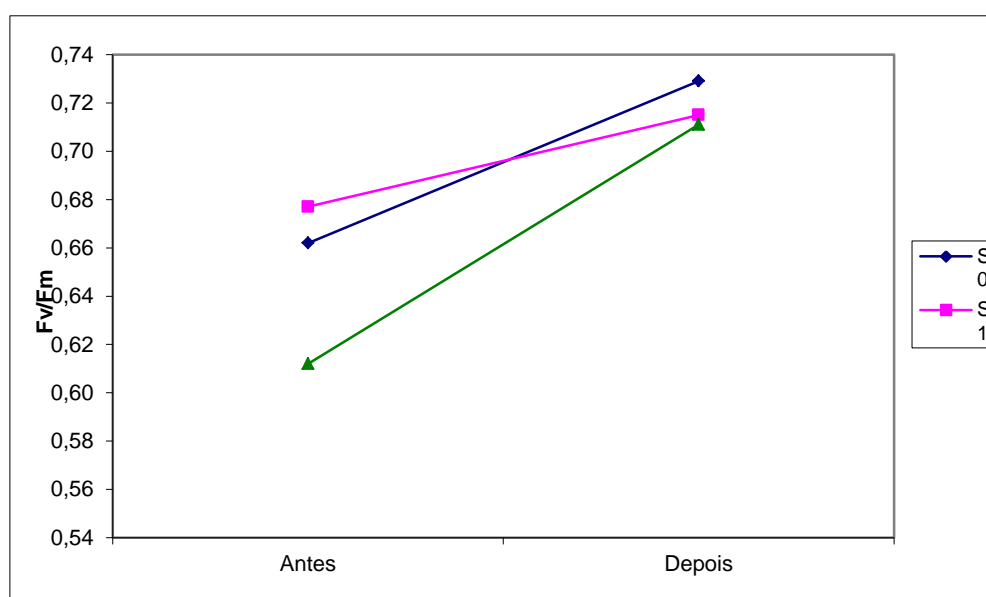




Figura 7. Eficiência fotoquímica (Fv/Fm) nas folhas de soja, antes e após a aplicação de sulfato de amônio.

#### 4.1.3. Comparação da cinética de fluorescência entre feijão e soja

Entre as variedades de feijão foi possível observar que a cinética de fluorescência não foi influenciada pela aplicação de sulfato de amônio. Já entre as variedades de soja houve influência do sulfato de amônio sobre a cinética de fluorescência, tendo em vista que a mesma apresentou uma eficiência fotoquímica melhor após a aplicação de nitrogênio, como apresentado na figura – 7, que mostra o aumento da Ef mais acentuado nas variedades de soja.

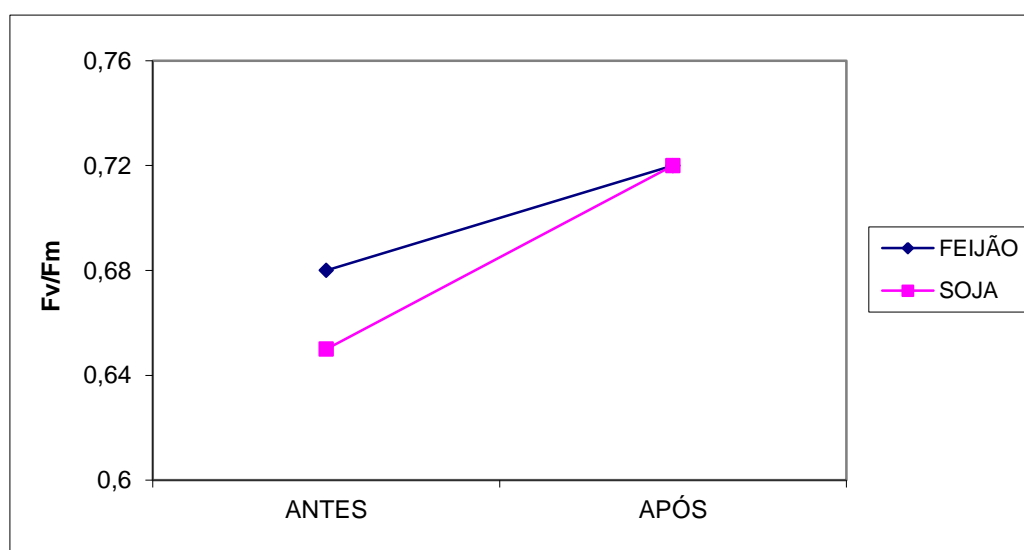


Figura 8. Eficiência fotoquímica (Fv/Fm) nas folhas de soja e feijão antes e após a aplicação de sulfato de amônio.

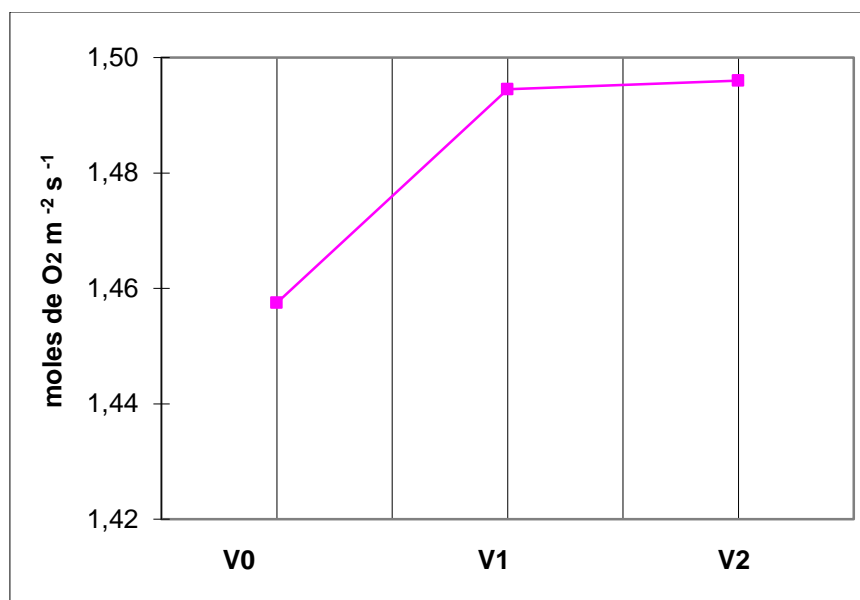
#### 4.2. Liberação de O<sub>2</sub> entre as variedades de feijão

O fato de um genótipo apresentar taxas de consumo de O<sub>2</sub> mais elevadas que a maioria dos demais, apesar da menor fotossíntese líquida em certos casos, poderá significar maior disponibilidade de esqueletos carbônicos, ATP, NADH, e ainda NADPH<sup>+</sup> e ferredoxina reduzida (Graham, 1980; Kow *et al*, 1982; Weger &

Turpin, 1989). Isto contribuiria à maior eficiência das reações de redução do nitrato, do nitrito e a assimilação da amônia ( Weger *et al*, 1988; Weger & Turpin, 1989).

**Tabela 9. Valores médios da Liberação de O<sub>2</sub> em  $\mu\text{moles de O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (fotossíntese) entre as variedades de feijão**

	F0	F1	F2
A	1,37	1,41	1,47
C	1,5	1,5	1,5
B	1,4	1,41	1,51
D	1,5	1,43	1,43



**Figura 9. Taxa de liberação de O<sub>2</sub> de folhas do folíolo central do 3º nó da haste principal.**

As variáveis de liberação de O<sub>2</sub> calculadas entre as diferentes variedades de feijão estão apresentadas na tabela 14, de análise de variância. Comprovando que não houve diferença na liberação de O<sub>2</sub> ( fotossíntese) entre as variedades de feijão, pois o  $F_{\text{calculado}} = 0,59$  foi menor que o  $F_{\text{tabelado}} = 4,26$  com 4 graus de liberdade no numerador e 10 graus de liberdade no denominador, ao nível de significância de 5%.

**Tabela 10. Análise de variância dos dados da tabela8.**

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
tratamentos	4	0,052	0,013	0,59
resíduo	10	0,218	0,022	
total	14			

#### 4.2.1. Liberação de O<sub>2</sub> antes e depois da aplicação de sulfato de amônio em feijão

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 fotoassimilados para a produção de grãos (produtividade econômica), mas sim para o crescimento vegetativo.

**Tabela 11. Valores médios de Liberação de O<sub>2</sub> em  $\mu\text{moles de O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , antes e após a aplicação de sulfato de amônio.**

	Antes	Depois
V0	1,38	1,570
V1	1,49	1,460
V2	1,46	1,500

As variáveis de liberação de O<sub>2</sub> calculadas entre as diferentes variedades de feijão estão apresentadas na tabela 16, de análise de variância. Comprovando que não houve diferença na liberação de O<sub>2</sub> (fotossíntese) entre as variedades de soja, ao nível de significância de 5%.

**Tabela 12. Análise de variância dos dados da tabela 9.**

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
tratamentos	1	0,006	0,006	1,87
resíduo	4	0,013	0,003	
total	5			

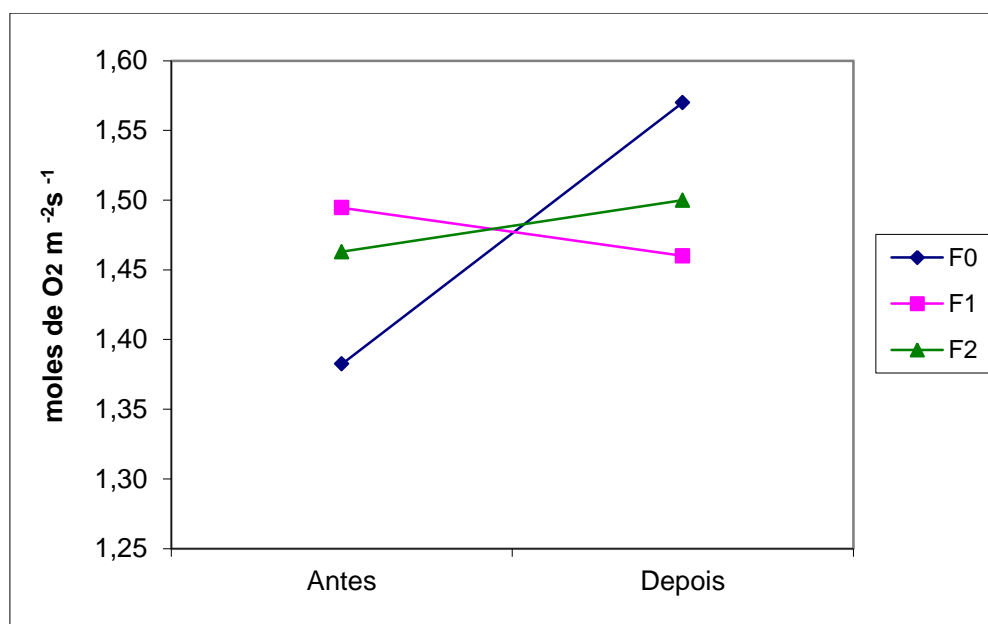


Figura 10. Mostra liberação de O<sub>2</sub> de três variedades de feijão

#### 4.2.2. Liberação de O<sub>2</sub> entre as variedades de soja

Em algumas espécies, reconhecidamente estável em termos de produtividade, a taxa respiratória superior às demais pode estar associada ao uso mais eficiente do nitrogênio.

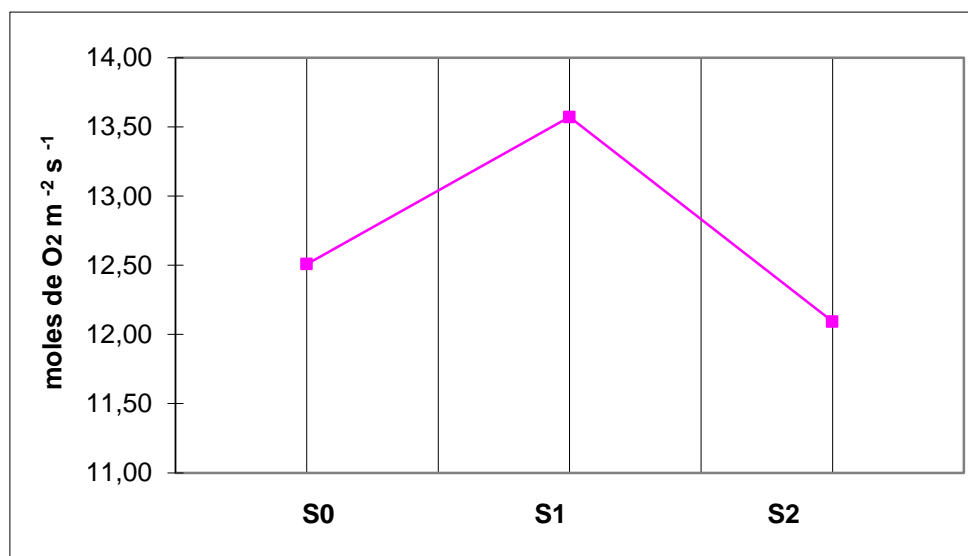
Tabela 13. Taxa de liberação de O<sub>2</sub> em  $\mu\text{moles de O}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de folhas do folíolo central do 3º nó da haste principal.

Repetições	S0	S1	S2
A	1,43	1,6	1,43
C	1,4	1,83	1,58
B	1,41	1,6	1,5
D	1,41	1,47	1,44

As variáveis de liberação de O<sub>2</sub> calculadas entre as diferentes variedades de soja estão apresentadas na tabela 18, de análise de variância. Comprovando que não houve diferença na liberação de O<sub>2</sub> ( fotossíntese) entre as variedades de soja, pois o  $F_{\text{calculado}} = 1,53$  foi menor que o  $F_{\text{tabelado}} = 4,26$  com 4 graus de liberdade no numerador e 10 graus de liberdade no denominador, ao nível de significância de 5%.

Tabela 14. Análise de variância dos dados da tabela 10.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
tratamentos	4	0,086	0,021	1,53
resíduo	10	0,141	0,014	
total	14			

Figura 11. Mostra a liberação de O<sub>2</sub> nas três variedades de soja.

#### 4.2.3. Liberação de O<sub>2</sub> antes e depois da aplicação de sulfato de amônio em soja

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).

Taxa de fotossíntese líquida menor, mas as taxas respiratórias maiores, assegura maior disponibilidade de esqueletos carbônicos em especial o  $\alpha$  -

cetoglutarato, 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 variedades.

**Tabela 15. Taxa de liberação de O<sub>2</sub> de folhas de soja antes e após a aplicação de sulfato de amônio.**

Repetições	Antes	Depois
S0	1,52	1,47
S1	1,42	1,59
S2	1,58	1,60

As quantidades calculadas entre as diferentes variedades de soja estão apresentadas na tabela 16., de análise de variância. Comprovando que não houve diferença na liberação de O<sub>2</sub> ( fotossíntese) entre as variedades de soja, ao nível de significância de 5%.

**Tabela 16. Análise de variância dos dados da tabela 11.**

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
tratamentos	1	0,003	0,003	0,57
resíduo	4	0,022	0,006	
total	5			

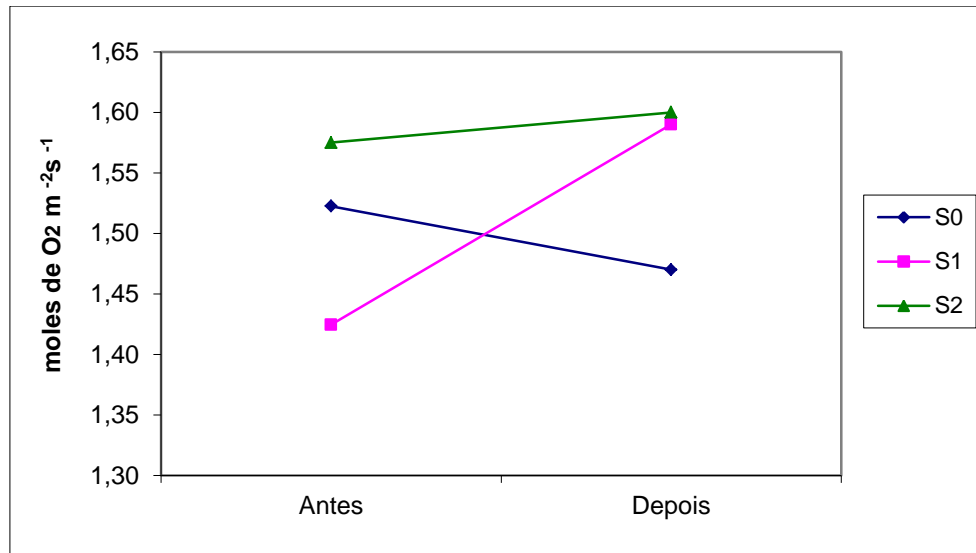


Figura 12. Mostra a liberação de  $O_2$  nas três variedades de soja antes e após aplicação de sulfato de amônio.

#### 4.2.4. Comparação da fotossíntese ( Liberação de $O_2$ ) entre feijão e soja após aplicação de sulfato de amônio.

Após observar que entre as variedades de feijão e soja não houve influencia na liberação de  $O_2$  após aplicação de sulfato de amônio. A figura 7, mostra como o aumento da liberação de  $O_2$  foi semelhante entre as plantas.

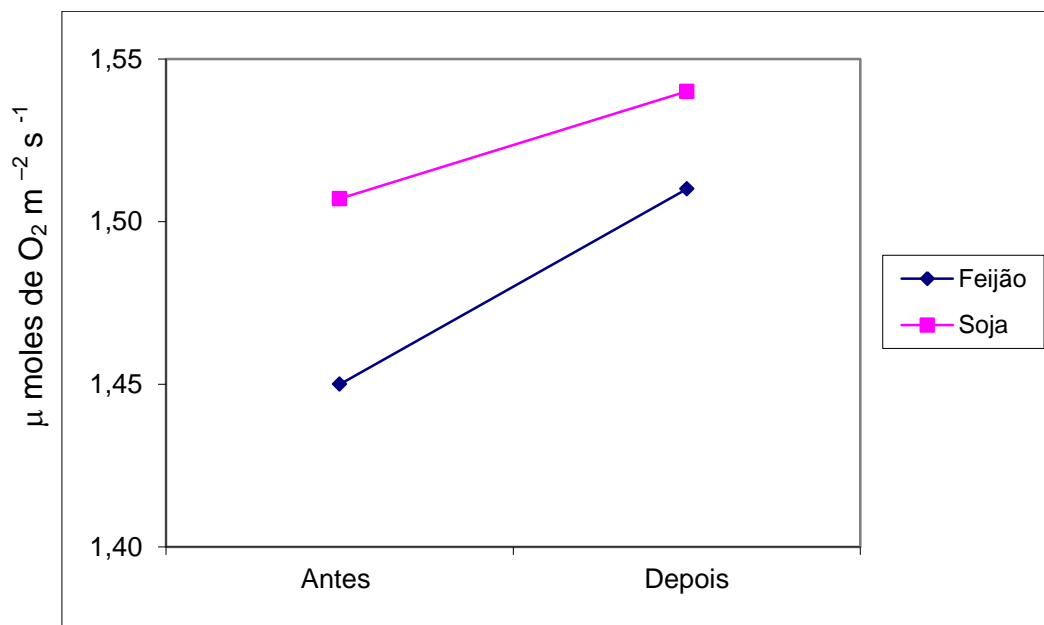


Figura 13. Liberação de  $O_2$  em  $\mu\text{moles de } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , nas folhas de soja e feijão antes e após a aplicação de sulfato de amônio.

## 5. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo da determinação da cinética da indução de fluorescência, sugerem que a aplicação de  $\text{NH}_4^+$  em forma de sulfato de amônio, não proporciona uma melhor eficiência fotoquímica entre as variedades de feijão e entre as variedades de soja estudada.

Não há diferença estatística pelo teste F ( $\alpha = 5\%$ ) entre as variedades de feijão e soja para fluorescência mínima ( $F_0$ ), máxima ( $F_m$ ), variável ( $F_v$ ) e eficiência do “quencher” ( $E_q$ ) e fotoquímica ( $E_f$ ). Embora não se tenha detectado diferenças entre as variedades pela utilização das variáveis descritas acima, acredita-se que o método merece consideração e deva ser melhor explorado em estudos de variabilidade genético-fisiológica. Entretanto, foi detectado uma tendência maior de assimilação de nitrogênio pela soja, que apresentou diferença estatística significativa após aplicação de sulfato de amônio.

Conclui-se que não há diferença com relação à liberação de  $\text{O}_2$  (fotossíntese), sugerindo que a aplicação de sulfato de amônio não influencia a fotossíntese entre as variedades de feijão e soja. A quantidade de sulfato de amônio aplicada nos tratamentos, também não indicou diferença significativa entre o feijão e soja, em se tratando de liberação de  $\text{O}_2$ . As variações na quantidade de  $\text{O}_2$  liberada não foi significativa para se afirmar qual das variedades de feijão e soja sofreram maior influência após aplicação de sulfato de amônio.



## 6. Referências Bibliográficas

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

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 Physiology**, 63: 1205 – 1209, 1979.

BACARIN, M. A.; MOSQUIM, P. R. *Cinética de emissão de fluorescência das clorofilas de dois genótipos de feijoeiro.* **Ciência Agrotécnica**, v. 26, n. 4, p. 705-710. 2002.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. *Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities.* **J. Exp. Bot.** Oxford, v. 55, p. 1607-1621, 2004.

BELKHODJA, R. *et al. Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley (Hordeum vulgare L.).* **Plant Physiol.**, v. 104, n. 2, p. 667-673, 1994.

BJÖRKMAN, O. & DEMMIG, B. *Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins.* **Planta**, 170: 487 – 504, 1987.

BOLHAR – NORDENKAMPF, H. R.; ÖQUIST, G. In: *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual.* (eds) Hall, D.O.; Scurlock, J. M. O.; Bolhar – Nordenkampf, H. R.; Leegood, R. C.; Long. S. P. Chapman & Hall, London, 193. 1993.

BOWN, A. W.; HALL, D. E.; MACGREGOR, K. B. *Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4-aminobutyrate and can be visualized through*

*increased chlorophyll fluorescence and superoxide production. Plant Physiol.*, v. 129, n. 4, p.1430-1434, 2002.

CRAWFORD, N.M. 1995. *Nitrate: nutrient and signal for plant growth. The Plant Cell*, v.7, p.859- 868.

DACEY, J.W.H. (1981) *Pressurized ventilation in the yellow waterlily. Ecology*. 62: 1137-1147.

FAGERIA, N.K., V.C. BALIGAR, and C.A. Jones Authored a book ( Second Edition ) “ *Growth and Mineral Nutrition of Field Crops.*” Marcel Dekker Inc., New York, NY 1997.

FAGERIA N.K. and V.C. BALIGAR. *Growth and nutrient concentrations of common bean, low land rice, corn, soybean, and wheat at diferent soil pH on an Inceptisol. J. Plant Nut.* 22: 1495 – 1507 . 1999.

FAGERIA, N.K. and V.C. BALIGAR. *Methodology for evaluation of lowland rice genotypes for nitrogen use efficiency. J. Plant Nut.* 26: 1315 – 1333. 2003.

GOVINDJEE. *Sixty- three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. J. Plant Physiol.* 22: 131-160. 1995.

GRAHAM, D. *Effects of light on dark espiration. In: Davies, D.D. The biochemistry of plants: A comprehensive treatise.* London, Academic Press, 1980. v.2, p.

GOMES, M.F.M. *Efeitos da expansão da produção de soja em duas regiões do Brasil.* Viçosa. 1990. 105p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

HIPKINS, M. F.; BAKER, N. R. In: *Photosynthesis-energy transduction: a practical approach.* (eds.) HIPKINS, M. F.; BAKER, N. R. IRL Press, Oxford, 51, 1986.

IRELAND, C. R.; PERCIVAL, M. P.; BAKER, N. R. *Modification of the induction of photosynthesis in wheat by glyphosate, an inhibitor of amino acid metabolism.* **J. Exp. Bot.**, v. 37, n. 176, p. 299-308, 1986.

KOW, Y.W.; ERBES, D.L.; GIBBS, M. *Chloroplast respiration. A means of supplying oxidized pyridine nucleotide for dark chloroplastic metabolism.* **Plant Physiology**, 69: 442-447, 1982.

KRAUSE, G. H. ,and WEIS, E. (1991) *Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics.* *Annu. Rev. Plant Physiol.* **Plant Mol. Biol.** 42:313-350.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. *Chlorophyll Fluorescence as a tool in plant physiology II. Interpretation of fluorescence signals.* **Photosynthesis Research.**v.5, n.2, p.139-157. 1984.

KRAUSE, G. H.; WINTER, K. *Photoinhibition of photosynthesis in plants growing in natural tropical forest gaps: a chlorophyll fluorescence study.* **Bot. Acta**, v. 109, n. 6, p. 456-462, 1996.

LARCHER, W. *Ecofisiologia Vegetal.* São Carlos, RiMa, 2004.

LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. *Alternative route for nitrogen assimilation in higher plant.* *Nature ( London )* 251: 614 – 616. 1974.

MAE, T. *Physiological nitrogen efficiency in rice: nitrogen utilization, Photosynthesis and yield potential.* **Plant and soil**, The Hague., v. 196, . 201-210, 1997.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. *Chlorophyll fluorescence: a practical guide.* **J. Exp. Bot.**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MAZZA, C. A. et al. *Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops.* **Plant physiol.**, v. 122, n. 1, p. 117-126,2000.

MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. *Amino acid metabolism.* **Ann. Rev. Plant Physiol.** 28: 299 – 329.

MORRIS, D. R., BALIGAR, T.M. SCHULER and P.J. HARMON. *Biological nitrogen fixation and habitat of running buffalo clover*. **J. Plant Nut.** 25: 735 – 746. 2002.

MOSS, D. N. *Studies on increasing photosynthesis in crop plants*. In: Burris, R.H. & BLACK, C. C. Eds. *CO<sub>2</sub> and plant productivity*. Baltimore, University Park Press, 1975. p. 31-41.

MOSS, D.N. *Photosynthesis, respiration, and photorespiration in higher plants*. In: Tesar, M.B. *Physiological basis of crop growth and development*. Madison, WI: Am. Soc. Agron. And Crop. Sci. Soc. Am. 1984. p. 131-151.

NOBEL, P.S. *Introduction to biophysical plant physiology*. San Francisco, W.H. Freeman, 1974. 488p.

OLIVEIRA, J. G.; ALVES, P. L. A.; MAGALHÃES, A. C. *The effect of chilling on the photosynthetic activity in coffee (Coffea arabica L.) seedlings. The protective action of chlorophyll pigments*. Braz. **J. Plant Physiol.** v. 14, n. 2, p. 95-104, 2002

PETERSON, R. B.; AYLOR, D. E. *Chlorophyll fluorescence induction in leaves of Phaseolus vulgaris infected with bean rust (Uromyces appendiculatus)*. **Plant Physiol.**, v. 108, n. 1, p. 163-171, 1995.

PEUKE, A. D.; JESCHKE, W. D. *The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in Racinus comunis L. – I: growth with ammonium and nitrate as nitrogen source*. **J. Exp. Bot., London**, v.44, p. 1167-1176, 1993.

PORTES, T. A. *A emissão de fluorescência pela clorofila a e o balaço de O<sub>2</sub> como parâmetros de determinação da variabilidade genética condicionante da produtividade em feijão (Phaseolus vulgaris L.)*. 1990. 82 f. Tese (Doutorado em Ciências, na área de Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

PORTES, T. A.; MAGALHÃES, A. C. N. *Análise comparativa de diferentes genótipos de feijão através da medição da fluorescência da clorofila a e do balanço de O<sub>2</sub>*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 5, n. 1, p. 17-23, jan. 1993.

RASCHER, U.; LIEBIG, M.; LÜTTGE, U. *Evaluation of instant light-responses curves of chlorophyll parameters obtained with a portable chlorophyll fluoremeter on site in the field*. **Plant Cell Environ.**, v. 23, n. 12, p. 1397-1405, 2000.

ROBINSON, S.P. & WALKER, D.A. *Photosynthetic carbon reduction cicly*. In: HATCH, M.D. & BOARDMAN, N.K. *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise*. Academic tress, 1981. p. 194 – 234.

RODEN, J. S.; BALL, M. C. *The effect of elevated [CO<sub>2</sub>] on growth and photosynthesis of two eucalyptus species exposed to high temperatures and water deficits*. **Plant Physiol.**, v. 111, n. 3, p. 909-919, 1996.

ROHACEK, K. *Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships*. **Photosynthetica**, 40(1): 13-29. 2002.

RUFTY, T.W.; ISRAEL, D.W. & WOLK, R.J. *Assimilation of 15 NO<sub>3</sub> – taken up by plants in the light and in the dark*. **Plant Physiol.** 76, 769 – 775. 1984.

RUNGE, M. *Physiology and ecology of nitrogen nutrition*. In: LANGE, O.L.; NOBEL, P.S.; OSMOND, C.B.; ZIEGLER, H. *Physiological plant ecology III. Response to the chemical and biological environment*. Berlin: Springer-Verlag, 1983, p. 163 – 200 ( *Encyclopedie of Plant Physiology. New Series, 12C*).

SCHREIBER, G.; BUSCH, M.; KLEINMN, S.; KORELITZ, J. *The risk of transfusion-transmitted viral infections*. *N Engl J Méd*, v. 334, p.1685-1690. 1996.

SCHRÖDER, P. ( 1989) *Characterization of a thermo-osmotic gas transport mechanism in *Alnus glutinosa*(L.) Gaertn*. *Trees*. 3: 38-44.

TAIZ, L. *Fisiologia Vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

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: 145-238, 1979.

YOUNG, A. J.; FRANK, H. A. *Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence*. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 36, n. 1, p. 3-15, 1996.

WALKER, D. *The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in sample measurements of photosynthesis*. Sheffield, University of Sheffield, Research institute for Photosynthesis, 1986. 145p.

WEGER, H.G. ; TURPIN, D.H. *Mitochondrial respiration can support NO<sub>3</sub> – and NO<sub>2</sub> – reduction during Photosynthesis*. **Plant Physiology**, 89: 409-415, 1989.

WEGER, H.G.; BIRCH, D.G.; EL RIFI, I.R.; TURPIN, D.H. *Ammonium assimilation requires mitochondrial respiration in the light*. **Plant Physiology**, 86: 688-692, 1988.

WIEN, H.C.; ALISCHULER, S.L.; OZBUN, J.L.; WALLACE, D.H. <sup>14</sup> C – *assimilate distribution in Phaseolus vulgaris L. During the reproductive period*. **Journal of American Society for Horticultural Science**, St. Joseph. 101 (5): 510-3. 1976.