A 87

CHLOROFYLFLUORESCENTIE

ACHTERGRONDEN EN GEBRUIKSMOGELYKHEDEN

S.R. HAALSTRA

31 DECEMBER 1989 RAPPORT NR. 637

STICHTING VOOR PLANTENVEREDELING SVP
POSTBUS 117 6700 AC WAGENINGEN

Voorwoord

Voor u ligt een rapport dat het resultaat is van een uitgebreide literatuurstudie over chlorofylfluorescentie. Deze literatuurstudie vond plaats in het kader van het gezamenlijke project " Gebruiksmogelijkheden van de chlorofylfluorescentietechniek voor de selectie van koudetolerante maïsgenotypen " van de **Stichting voor Plantenveredeling (SVP)** en de **Stichting Nederlands Graan-Centrum (NGC).**
Door in dit rapport onderzoeksresultaten te ordenen en te bundelen hoop ik een bijdrage te leveren aan het verantwoord, kritisch en begripvol gebruik van de chlorofylfluorescentietechniek.
Ik wil O. Dolstra, O. van Kooten en A.H.C.M. Schapendonk bedanken voor het kritisch doornemen van het concept van dit rapport. Hierdoor is de uiteindelijke versie sterk toegenomen in leesbaarheid en kwaliteit.

S.R. Haalstra
01 - 01 -1990

INHOUDSOPGAVE

Inleiding

1. THEORETISCHE ACHTERGRONDEN VAN CHLOROFYLFLUORESCENTIE

1.1 Chlorofyl structuur/grootte/gewicht
1.2 Absorptie van licht door chlorofyl-a en andere pigmenten
1.3 De-excitatie van aangeslagen chorofyl
1.4 Fluorescentiespectrum van chlorofyl
1.5 Fluorescentiespectrum van een groen blad

2. BOUW EN FUNCTIONEREN VAN HET FOTOCHEMISCH APPARAAT VAN GROENE PLANTEN

2.1 Inleiding
2.2 Globale bouw en functie van het fotochemisch apparaat
2.3 Componenten van het fotochemisch apparaat
2.3.1 Fotosysteem II (PSII)
2.3.1.1 het fotochemisch reactiecentrum van PSII
2.3.1.2 het OEC
2.3.1.3 LHCII
2.3.1.4 plastoquinone
2.3.2 Het cytochroom b/f complex
2.3.3 Fotosysteem I (PSI)
2.3.4 Het ATP-synthetase complex
2.4 Verdeling van de verschillende complexen over de thylakoïdmembraan

3. OORSPRONG, METING EN INTERPRETATIE VAN IN-VIVO CHLOROFYL-FLUORESCENTIE SIGNALEN

3.1 Oorsprong van in-vivo chlorofylfluorescentie

3.2 "PAM" meettechniek
3.3 Analyse van de fluorescentie-inductiecurve
3.4 Quenching analyse
3.5 Rekenmodellen voor fluorescentie
3.5.1 model-1 "mono-partite model"
3.5.2 model-2 "bi-partite model"
3.6 Interpretatie van fluorescentie parameters
3.6.1 $(Fv)_m/Fm$
3.6.2 q_P
3.6.3 q_{NP}
3.6.3.1 q_E
3.6.3.2 q_T
3.6.3.3 q_I
3.7 Relatie tussen fluorescentie parameters en elektronen-transport
3.7.1 Methode " Weis en Berry "
3.7.2 Methode " Genty et al "

4. TOEPASSINGEN VAN CHLOROFYLFLUORESCENTIE IN STRESS-FYSIOLOGIE

4.1 Detectie van effecten van koude-stress op het fotochemisch apparaat m.b.v. chlorofylfluorescentie

Literatuur

Inleiding

De toepassing van het verschijnsel chlorofylfluorescentie in plantenfysiologisch onderzoek, is door de komst van een nieuwe meettechniek sterk toegenomen. Met name in het toegepast onderzoek ontbreekt het echter veelal aan de bij deze techniek behorende achtergrondinformatie. Achtergrondinformatie is van belang om op een verantwoorde wijze met de fluorescentietechniek om te gaan. Ook is zij van belang voor het kritisch en begripvol kunnen volgen van recente ontwikkelingen in deze, in stroomversnelling geraakte, onderzoekstechniek. Achtereenvolgens worden in dit rapport de volgende onderwerpen behandeld :

[1] Theoretische achtergronden van chlorofylfluorescentie
[2] Bouw en functioneren van het fotochemisch apparaat van groene planten
[3] Oorsprong, meting en interpretatie van in-vivo chlorofyl-fluorescentiesignalen
[4] Toepassing van chlorofylfluorescentie in stress-fysiologisch onderzoek

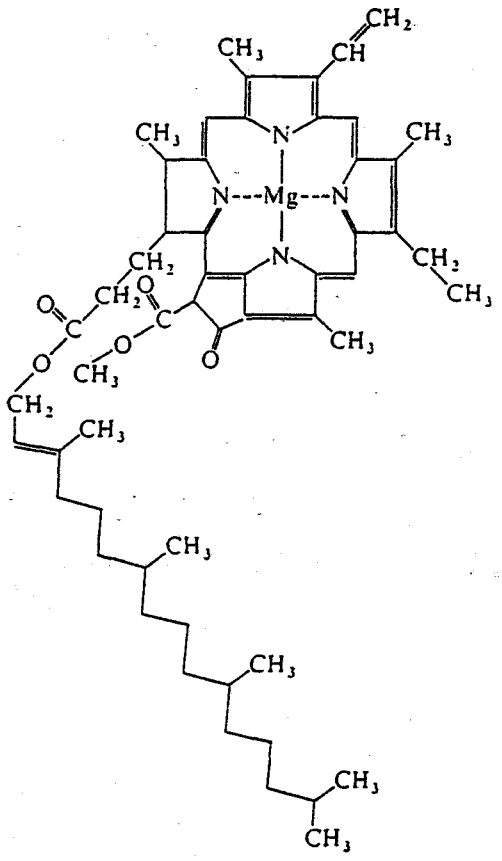


Figure 5–1. Structure of chlorophyll *a* indicating the highly conjugated porphyrin ring to which is attached a phytol tail.

Figuur 1. Stuctuur formule van chlorofyl-a. (uit: Nobel,1970)

1. THEORETISCHE ACHTERGRONDEN VAN CHLOROFYLFLUORESCENTIE

1.1.1 Chlorofyl structuur/grootte/gewicht

Het chlorofylmolecuul (figuur 1) is opgebouwd uit een relatief vlakke porphyrinering bestaande uit vier pyrroolkernen (tetra-pyrrool) met daaraan gebonden een terpeen alkohol (phytol-staart). De porphyrinering heeft een grootte van ca. 15*15 $Å^2$. In het centrum van de ring is een Mg^{2+} atoom covalent gebonden. De phytolstaart bevat 20 C-atomen en heeft een lengte van ca. 20 Å.

De meest voorkomende vorm van chlorofyl in hogere planten is chlorofyl-a. Het molecuulgewicht van chlorofyl-a bedraagt 893.5. Naast chlorofyl-a (Chl-a) komt in hogere planten chlorofyl-b (Chl-b) voor. Chl-b verschilt slechts van chl-a door het voorkomen van een aldehyde (CHO) groep op een plaats waar bij chl-a een methylgroep (CH_3) voorkomt. De mol-verhouding chl-a : chl-b varieert tussen de 2 á 3 . De vier pyrroolkernen vormen een systeem van negen geconjugeerde dubbele bindingen. Dit systeem levert gedelocaliseerde π-elektronen welke een rol spelen bij de absorptie van lichtenergie.

1.1.2 Carotenoïden

Andere belangrijke pigmenten in hogere planten zijn de carotenoïden. Carotenoïden zijn 40-C isoprenoïden opgebouwd uit 8 isopreen eenheden. Carotenoïden zijn ca. 30 Å lang en bevatten een systeem van negen of meer geconjugeerde dubbele bindingen. De mol-verhouding chlorofyl : carotenoïden bedraagt 5 á 6 (Maas en Dunlap,1989; Lichtenthaler en Rinderle,1988).

1.2 Absorptie van licht door chlorofyl-a en andere pigmenten

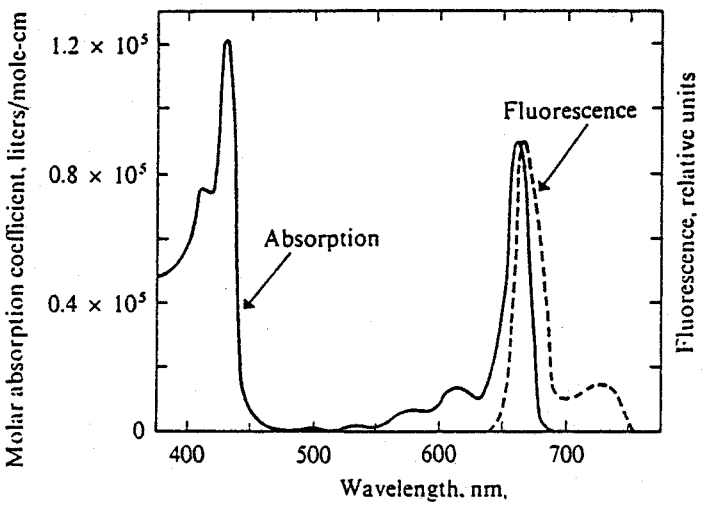


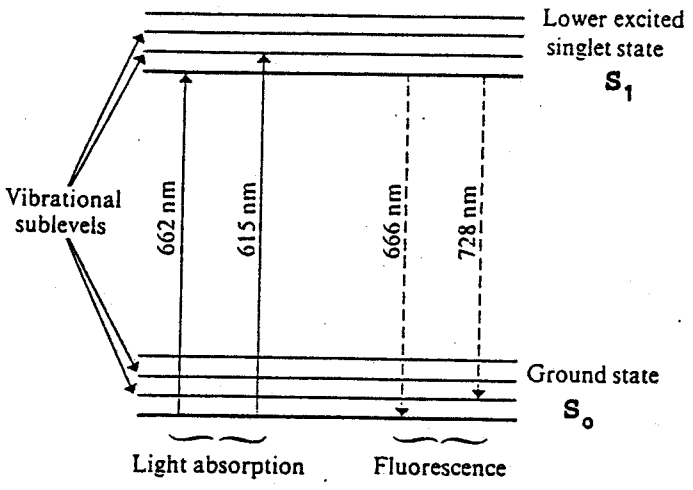
Figure 5–2. Absorption and fluorescence emission spectra of Chl *a* in ether. [Data are from A. S. Holt and E. E. Jacobs, *American Journal of Botany* **41**, 710–17 (1954); by permission.]

Figuur 2. Absorptie- en fluorescentie-emissiespectrum van chlorofyl-a in ether. (uit: Nobel,1970)

De gedelocaliseerde π-elektronen in de porphyrinering van chlorofyl kunnen lichtenergie absorberen. De tijdsduur benodigt voor de absorptie van een lichtkwant bedraagt ca. 10^{-15} sec. Dit komt overeen met de duur van één trillingsperiode van het licht. Door de absorptie van lichtenergie wordt een π-elektron aangeslagen (π^*-elektron) naar een hoger energieniveau. Chl-a absorbeert lichtenergie in het zichtbare (400-700 nm) spectrum (figuur 2). Dit absorptiespectrum van chl-a wordt veroorzaakt door de energie-overgang van een elektron in de grondtoestand (S_o) naar de 1^e (S_1) of naar de 2^e (S_2) aangeslagen toestand. De hiervoor benodigde energie komt overeen met de energie-inhoud van resp. rode en blauwe lichtkwanten.

S_o ----> S_1 (1.82 eV ; rood licht = 670nm)
S_o ----> S_2 (2.84 eV ; blauw licht = 435nm)

Energie-overgangen kunnen plaatsvinden door de absorptie van lichtkwanten. Voor iedere overgang is een specifieke hoeveelheid energie nodig. Deze specifieke hoeveelheid energie wordt aangeleverd door lichtkwanten. Een lichtkwant heeft een specifieke energie-inhoud welke afhankelijk is van zijn golflengte ($E=h*c/\lambda$). Iedere energie-overgang correspondeert daarom met de absorptie van lichtkwanten van een bepaalde golflengte.
De twee absorptiepieken (bij 435nm en 670 nm) in het spectrum zijn al verklaard. De twee hoofdpieken blijken echter een zekere bandbreedte te hebben en in de linker schouder van de pieken komen kleinere absorptiemaxima voor. De reden hiervoor is dat iedere energietoestand (S_o,S_1,S_2) verder onderverdeeld is in een aantal vibratie-energieniveau's. Het aantal mogelijke energie-overgangen neemt hierdoor aanzienlijk toe. De energie-afstand tussen opeënvolgende vibratie-niveau's bedraagt ±0.1 eV. Het golflengte verschil tussen de hoofd-piek en een kleiner maximum in de schouder bedraagt ca. 30 nm. In het zichtbare spectrum komt een golflengte verschil van 30 nm overeen met een energieverschil



Figuur 3. Energie-niveau diagram waarin verschillende energie-overgangen zijn weergegeven met de bijbehorende golflengte van het geabsorbeerde- (doorgetrokken lijnen) of fluorescentie- (gestippelde lijnen) lichtkwant. De energie-overgangen vinden plaats van en naar verschillende vibratieniveau's van de grondtoestand en van de 1^e aangeslagen toestand. (uit:Nobel,1970)

Tabel 1. Maximale absorptie coëfficiënt (ϵ) en bijbehorende golflengte (λ_{max}) in afhankelijkheid van het aantal geconjugeerde dubbele bindingen (n).

n	ϵ ($l.mol^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{max}
1	$1*10^4$	185 nm
3	$3*10^4$	265 nm
5	$5*10^4$	325 nm
7	$7*10^4$	375 nm
9	$9*10^4$	415 nm

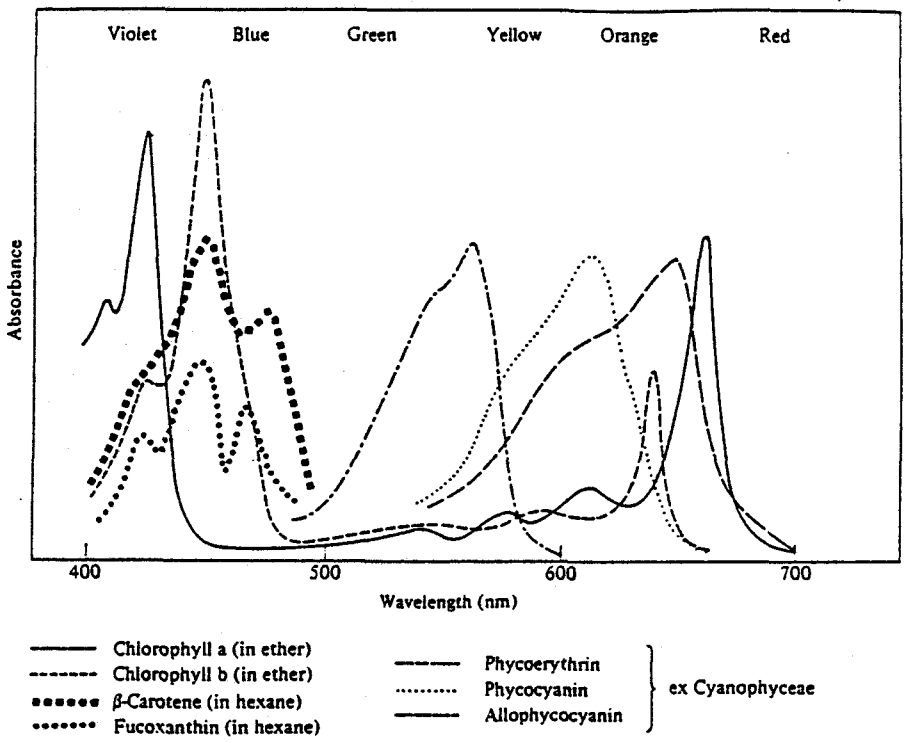
tussen lichtkwanten van ±0.1 eV. De kleinere maxima in de schouders van de hoofdpieken hangen dan ook samen met overgangen naar verschillende vibratie-niveau's (figuur 3). De bandbreedte van zowel de hoofdpieken als de kleinere maxima hangt samen met de absorptie van lichtkwanten voor overgangen naar verschillende rotatie- en translatie-energieniveau's waarin een vibratie-energieniveau nog weer verder is opgedeeld.

M.b.v. de formule van Boltzmann voor de kansverdeling over energieniveau's kan worden berekend dat bij 25°C 98% van de niet aangeslagen chlorofylmoleculen op het laagste en slechts 2% op het 1^e vibratieniveau van de grondtoestand (S_0) voorkomen. De kans op nog hogere energieniveau's is nihil. De absorptie-maxima in de schouders van de hoofd-pieken moeten dan ook worden toegeschreven aan energie-overgangen vanuit het laagste vibratieniveau van de grondtoestand (immers 98% bevindt zich op dit energieniveau) naar verschillende vibratieniveau's van de 1e en 2e aangeslagen toestand. Dat de opeénvolgende maxima in de schouders van de hoofdpieken sterk afnemen in amplitude komt door de dalende waarschijnlijkheid van de ermee samenhangende energie-overgangen (het zgn. Franck-Condon principe).

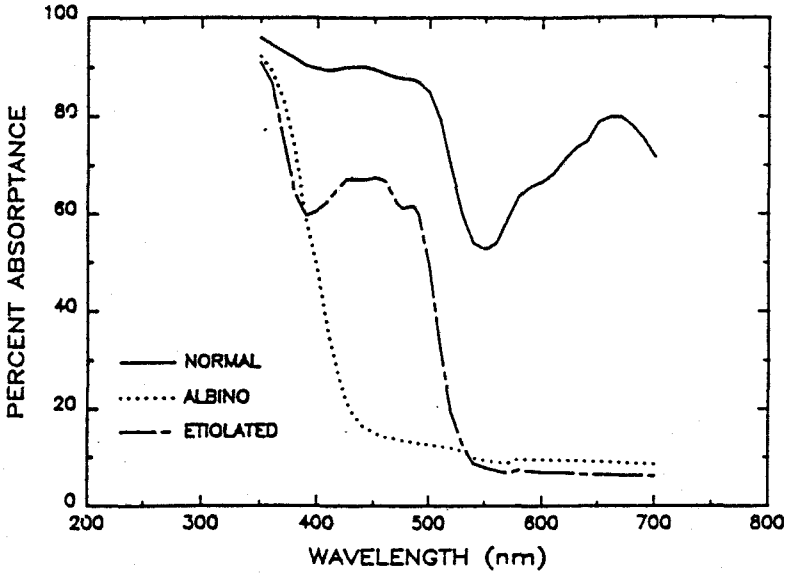
Een maat voor de lichtabsorptie van pigmenten is de molaire absorptiecoëfficiënt (ϵ). Volgens de wet van Lambert-Beer geldt voor de optische dichtheid (A) van een oplossing:

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon * c * b$$

waarin:
- I_0 = lichtintensiteit van inkomende lichtbundel
- I = lichtintensiteit van uittredende lichtbundel
- c = concentratie van de optische stof (mol.liter^{-1})
- b = afgelegde afstand door de oplossing (cm)
- ϵ = molaire absorptiecoëfficiënt van de stof (liter.mol^{-1}.cm^{-1})



Figuur 4. Absorptie spectra van verschillende pigmenten. (uit: Goodwin en Mercer,1983)



Figuur 5. Absorptie karakteristieken van groene, geëtioleerde, en albino maïsbladeren. (uit: Maas en Dunlap,1989)

De absorptiecoëfficiënt is afhankelijk van de golflengte van het te absorberen licht. De golflengte waarbij de molaire absorptiecoëfficiënt maximaal is (ϵ_{max}) noemt men λ_{max}. λ_{max} neemt toe bij een toenemend aantal geconjugeerde dubbele bindingen (tabel 1). Bij een groter aantal geconjugeerde bindingen neemt namelijk de energie-afstand tussen de grondtoestand en de aangeslagen toestand af, waardoor minder energierijke lichtkwanten worden geabsorbeerd. In figuur 2 is de absorptiecoëfficiënt van chlorofyl weergegeven als functie van de golflengte van het te absorberen licht. λ_{max} bedraagt voor chlorofyl ca. 430nm.

Naast chlorofyl-a zijn in hogere planten chlorofyl-b en ß-caroteen de belangrijkste lichtabsorberende pigmenten. De absorptiespectra van chl-a, chl-b en ß-caroteen zijn gezamenlijk weergegeven in figuur 4. Bij chl-b zijn de absorptiepieken t.o.v. chl-a beide richting het centrum van het zichtbare spectrum verschoven. ß-caroteen absorbeert vooral in het blauw/groene deel van het spectrum. Maas en Dunlap(1989) geven een absorptiespectrum voor maïsbladeren van groene (chlorofyl + ß-caroteen), geëtioleerde (ß-caroteen) en albino (geen pigmenten) planten (figuur 5).
Uit figuur 5 kan de bijdrage van chlorofyl en ß-caroteen aan het absorptiespectrum worden afgelezen. Het absorptieminimum rond 540 nm (groen) is duidelijk waarneembaar. Overigens wordt van dit groene licht nog ±45% door het blad geabsorbeerd. De lichtabsorptie door niet-pigmenten (celwanden) bedroeg in het zichtbare spectrum gemiddeld 10%. Maas en Dunlap(1989) vonden bij een chlorofyl concentratie van 0.61mmol.liter^{-1} en een bladdikte van 0.1mm bij 660nm een lichtabsorptie van 80%. Bij dikkere bladeren neemt de absorptie natuurlijk toe.

1.3 De-excitatie van aangeslagen chlorofyl

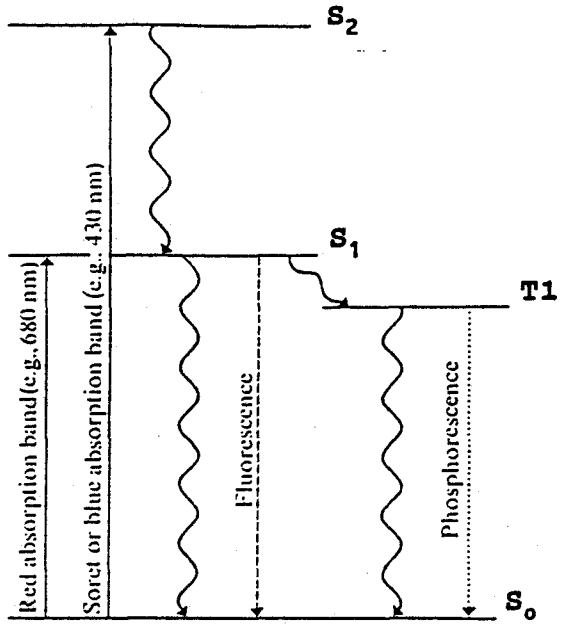
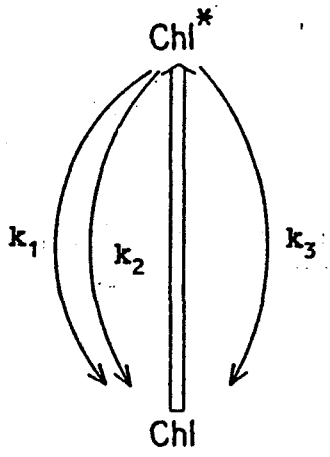


Figure 4–3. Energy level diagram indicating the principal electronic states and transitions of chlorophyll. Straight vertical lines represent the absorption of light while wavy lines indicate radiationless transitions and broken lines indicate those de-excitations that are accompanied by radiation.

Figuur 6. Weergave van de verschillende de-excitatie mogelijkheden van aangeslagen chlorofyl. (voor verdere details zie Engel bijschrift) (uit: Nobel,1970)



Figuur 7. Schematische weergave van de verschillende de-excitati mogelijkheden met bijbehorende reactieconstanten.

Aangeslagen chlorofyl is niet stabiel maar zal terugkeren naar de grondtoestand. De mogelijkheden (figuur 6) waarlangs dit kan gebeuren zijn :

1. omzetting in warmte (stralingloos verval)
2. omzetting in straling (fluorescentie)
3. omzetting in straling via een triplet tussentoestand (fosforescentie)

Deze verschillende de-excitatie mogelijkheden zijn elkaar beconcurrerende 1^e-orde reacties, ieder met een eigen reactieconstante (figuur 7). Dit kan wiskundig worden weergegeven door:

$$dS_1/dt = -(k1+k2+k3)*S1$$

waarin : S_1 = de hoeveelheid chlorofylmoleculen in de S_1-aangeslagen toestand.

k1 = reactieconstante voor stralingloosverval ($\pm 13*10^7$ in ether)

k2 = reactieconstante voor fluorescentieverval ($\pm 7*10^7$ in ether)

k3 = reactieconstante voor overgang naar de triplettoestand (k3<<k1,k2)

De omzetting in warmte gebeurt door overdracht van energie via botsingen. Omdat de S_2 aangeslagentoestand zeer snel ($\pm 10^{-14}$ - 10^{-12} sec.) stralingloos vervalt naar de S_1 toestand, speelt fluorescentie vanuit de S_2 toestand geen rol van betekenis. Evenzo is het stralingloos verval vanuit hogere vibratieniveau's van de S_1, naar het laagste vibratieniveau van de S_1, zeer snel. Het laagste vibratieniveau van de S_1 is relatief stabiel. De "lifetime" van deze toestand bedraagt $\pm 1,5*10^{-8}$ sec. "lifetime" is de tijdsduur benodigt voor het verval van 66% van de aange-

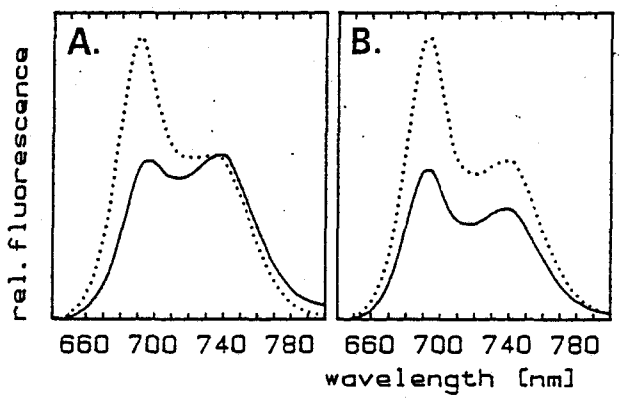


FIGURE 1. Chlorophyll fluorescence emission spectra of the upper (——) and lower leaf side (·····) A. of a C_3- plant (Nicotiana tabacum) and B. of a C_4-plant (Zea mays). The fluorescence was excited and sensed from the same leaf side (reflection measuring mode). Excitation light 470±30 nm.

Figuur 8. Fluorescentie-emissiespectra van een blad van **a.** een C_3- en **b.** een C_4- plant. Doorgetrokken lijnen: excitatie en meting aan de bovenkant van het blad. Gestippelde lijnen : excitatie en meting aan de onderkant van het blad.
(uit: Rinderle en Lichtenthaler,1988)

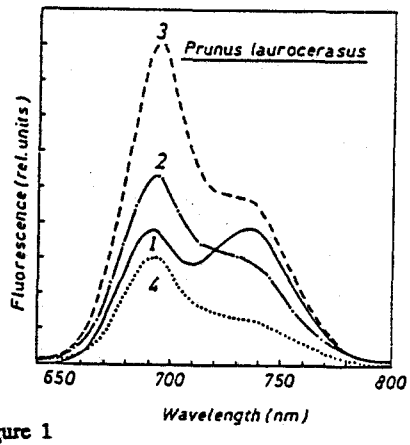
slagen moleculen. Vanuit deze S_1 toestand vervalt ca. 30% via fluorescentie. Het overige deel bereikt de grondtoestand (S_0) via stralingloos verval. Slechts een zeer klein deel vervalt via de triplet toestand d.m.v. fosforescentie. De "lifetime" van de triplet-toestand (T_1) is vele malen groter dan die van de S_1-toestand (T_1:10^{-3}-10 sec.; S_1:10^{-9}-10^{-6} sec.). Bij het beëindigen van de belichting van chlorofyl zal fluorescentie na 10^{-8} sec. nagenoeg gedoofd zijn, terwijl de fosforescentie nog veel langer doorgaat. Bij de meting van fluorescentie speelt fosforescentie geen rol van betekenis.

1.4 Fluorescentiespectrum van chlorofyl

Het fluorescentiespectrum van chlorofyl kent naast een piek bij 670 nm (rood) een tweede maximum bij 735 nm (verrood) (figuur 2). De piek bij 670 nm hangt samen met de terugval vanaf het laagste vibratieniveau van de S_1 naar het laagste vibratieniveau van de S_0. Het maximum bij 735 nm hangt samen met de terugval vanaf het laagste vibratieniveau van de S_1 naar het eerste vibratieniveau van de S_0. Het energieverschil tussen het laagste en eerste vibratieniveau van de S_0 bedraagt 0.15 eV, hetgeen overeenkomt met een verschuiving van de golflengte van het fluorescentielicht van 60 nm.

1.5 Fluorescentiespectrum van een groen blad

Het fluorescentiespectrum van een groen blad wordt bepaald door chlorofyl. Andere pigmenten zoals ß-caroteen fluoresceren nagenoeg niet. De fluorescentiespectra van bv. tabak en maïs vertonen dan ook twee pieken welke overeenkomen met die van chlorofyl (figuur 8). De intensiteit van de fluorescentiepieken en de onderlinge verhouding blijkt afhankelijk te zijn van de chlorofylconcentratie (Baret et al,1988), de plaats van meting



F690/F735 ranges between 0.8 and 1.2 for fully green leaves (Lichtenthaler and Buschmann, 1987a). With decreasing chlorophyll content the total fluorescence intensity increases (leaves 1, 2, 3 in Fig. 1) and reaches a maximum for a chlorophyll concentration per leaf area unit of about 2 µm.cm^{-2}. When the chlorophyll content is lower than 2 µg.cm^{-2} the fluorescence intensity decreases since the chlorophyll amounts are too low (leaf 4, in Fig. 1).

Figure 1
Chlorophyll fluorescence emission spectra of intact cherry-laurel leaves with decreasing chlorophyll content from leaf 1 to 4 (chlorophyll a + b, 1 : 52, 2 : 31, 3 : 2.9, 4 : 1.1 µg.cm^{-2}) (after Lichtenthaler and Buschmann, 1987)

Figuur 9. Chlorofylfluorescentiespectra in afhankelijkheid van de chlorofylconcentratie in het blad. (verdere details in Engelse tekst) (uit: Baret et al,1988)

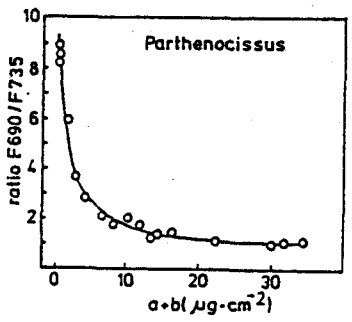


FIGURE 4. Dependence of the chlorophyll fluorescence ratio F690/F735 in Parthenocissus leaves on the chlorophyll content (a+b) per leaf area unit. Excitation light 470±30 nm (taken from Lichtenthaler, 1987a)

Figuur 10. De verhouding F690 : F735 in afhankelijkheid van de chlorofylconcentratie in een blad. (uit: Rinderle en Lichtenthaler,1988)

(Rinderle en Lichtenthaler,1988) en de golflengte van het licht waarmee het blad wordt belicht (Rinderle en Lichtenthaler,1988).

Bij een dalende chlorofylconcentratie in het blad neemt de intensiteit van de fluorescentie sterk toe. Pas bij zeer lage chlorofyl- concentraties (minder dan 4% v/d controle) neemt de intensiteit van de fluorescentie af (figuur 9). Dit schijnbaar onlogisch verband tussen chlorofylconcentratie en intensiteit van de fluorescentie wordt veroorzaakt door een toenemende reabsorptie van fluorescentielicht bij een hogere chlorofyl-concentratie.

Reabsorptie is tevens de oorzaak van verschuivingen in de verhouding tussen de intensiteit van de fluorescentie bij 690 (F690) en 735 (F735) nm. De reabsorptie bij 735 nm is geringer dan bij 690 nm. Bij hoge chlorofylconcentraties is de verhouding F690:F735 dan ook lager dan bij lage chlorofylconcentraties (figuur 10). Lichtenthaler(1987) gebruikt dit principe. Stress welke leidt tot een daling van de chlorofylconcentratie wordt door hem gekwantificeerd d.m.v. de verhouding F690:F735. De gevoeligheid van F690:F735 voor veranderingen in de chlorofyl-concentratie is bij de wat hogere concentraties laag (figuur 10). De verhouding F690:F735 geeft dan ook slechts een ruwe indicatie voor de chlorofylconcentratie.

De plaats van de belichting en meting (onder- of bovenkant van het blad) heeft eveneens invloed op de intensiteit en verhouding van de fluorescentiepieken. Zo is de verhouding F690:F735 bij belichting en meting aan de bovenkant van het blad lager dan bij belichting en meting aan de onderkant (figuur 8). De hogere chlorofylconcentratie aan de bovenkant van het blad is hiervan de oorzaak. Een uitzondering hierop wordt gevormd door de equi-faciale bladeren van Avena sativus.
Bij belichting aan de onderkant en meting aan de bovenkant

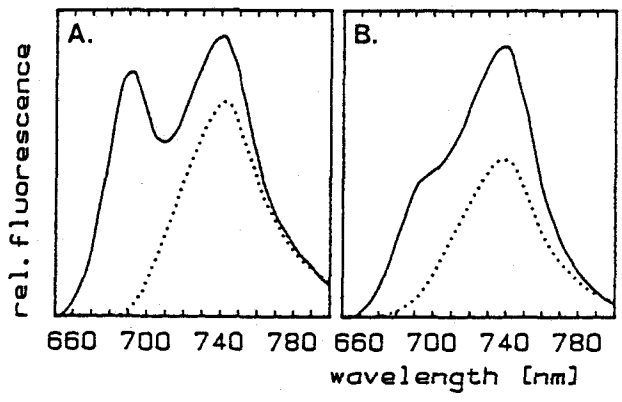
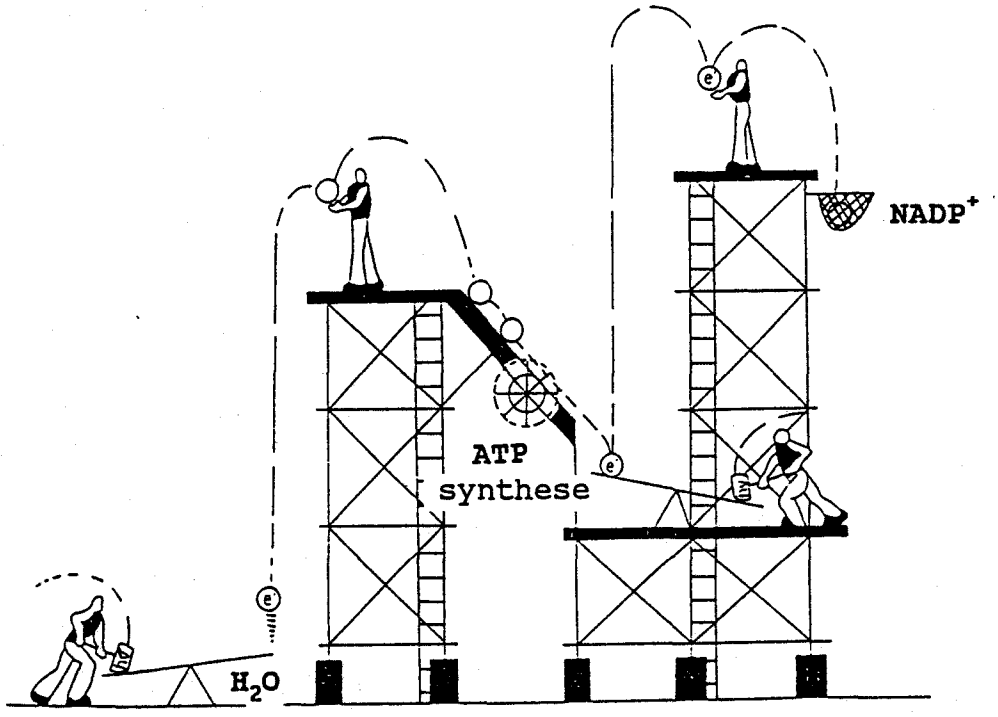


FIGURE 2. Chlorophyll fluorescence emission spectra of a dark-green Ficus leaf (Ficus benjamini), A. excited by a blue laser (442 nm) and B. by a red laser (632.8 nm). Solid lines: Fluorescence was excited and sensed at the upper leaf side (reflection measuring mode). Dotted lines: excitation was applied from the lower, but sensed from the upper leaf side (transmission measuring mode).

Figuur 11. Fluorescentiespectra in afhankelijkheid van de golflengte van de laser excitatiebundel. ([a]=blauw,442nm; [b]=rood,632.8nm) (uit: Rinderle en Lichtenthaler,1988)

verdwijnt de F690 nagenoeg volledig door reabsorptie.

De verhouding F690:F735 wordt ook beïnvloed door de kleur van het licht waarmee het blad wordt belicht. Blauw licht (400-500 nm) wordt geabsorbeerd door chl-a, chl-b en caroteen en penetreert daarom niet in diepere cellagen. De fluorescentie is dan oppervlakkig en de verhouding F690:F735 hoog. Licht met een golflengte tussen 525 en 633 nm wordt relatief slecht geabsorbeerd. Dit licht dringt door tot diepe cellagen waardoor fluorescentie onderhevig is aan veel reabsorptie. De verhouding F690:F735 is dan laag (figuur 11).



Figuur 12. Illustratie van het electronentransport van water naar $NADP^+$ in twee fotochemische stappen en van de daaraan gekoppelde synthese van ATP.

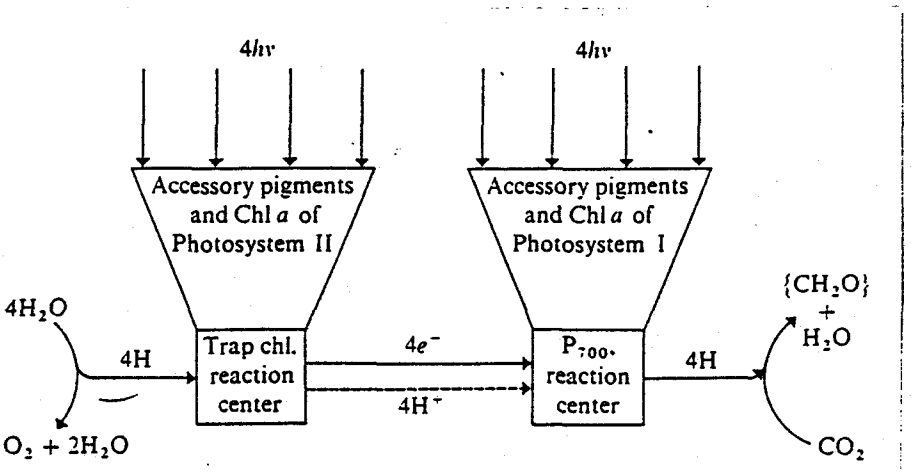


Figure 5-9. Schematic model for a series representation of the two photosystems of photosynthesis, indicating the stoichiometry of the various factors involved in the reduction of a CO_2 molecule to a carbohydrate ($\{CH_2O\}$).

Figuur 13. Schematische weergave van de wijze waarop lichtenergie wordt omgezet in chemische energie. (uit: Nobel,1970)

2. BOUW EN FUNCTIONEREN VAN HET FOTOCHEMISCH APPARAAT VAN GROENE PLANTEN

2.1 Inleiding

In de chloroplasten van groene planten wordt de door chlorofyl geabsorbeerde lichtenergie gebruikt voor de vorming van chemische energie (ATP, NADPH). Omzetting van lichtenergie in chemische energie vindt plaats in speciale reactiecentra (de zgn. fotosystemen) in de chloroplasten. Het hart van de fotosystemen wordt gevormd door twee speciale chlorofylmoleculen. Het gootste deel van het chlorofyl in de plant (99,5%) maakt echter deel uit van de antennepigmenten. Ieder fotosysteem beschikt over een antenne van ca. 250 chlorofylmoleculen voor de absorptie van lichtenergie. Het antennechlorofyl sluist de door haar geabsorbeerde lichtenergie door naar de reactiecentra. Zonder antennechlorofyl zouden de reactiecentra weinig lichtkwanten absorberen en een groot deel van de tijd (99%) inaktief zijn. De fotosystemen maken deel uit van het fotochemisch apparaat. Met fotochemisch apparaat worden al die componenten bedoeld welke noodzakelijk zijn voor de vorming van chemische energie (ATP en NADPH) uit lichtenergie. Overdracht van energie op de reactiecentra is competitief met het verval van aangeslagen chlorofylmoleculen via warmte en fluorescentie. De mate waarin lichtenergie wordt omgezet in chemische energie heeft daarom invloed op de intensiteit van de fluorescentie. Eenvoudig geredeneerd verwachten we bij slecht functionerende fotosystemen een hoge fluorescentie opbrengst. De werkelijkheid blijkt echter complexer te zijn. Er zijn een aantal mechanismen die de fluorescentie opbrengst beïnvloeden. Een nieuwe techniek voor de meting van fluorescentie maakt het mogelijk op eenvoudige wijze een aantal van deze mechanismen te ontrafelen. Voor een goed begrip van de werking van deze techniek en voor de interpretatie van de meetsignalen is het noodzakelijk kennis te hebben van de bouw van het fotochemisch apparaat.

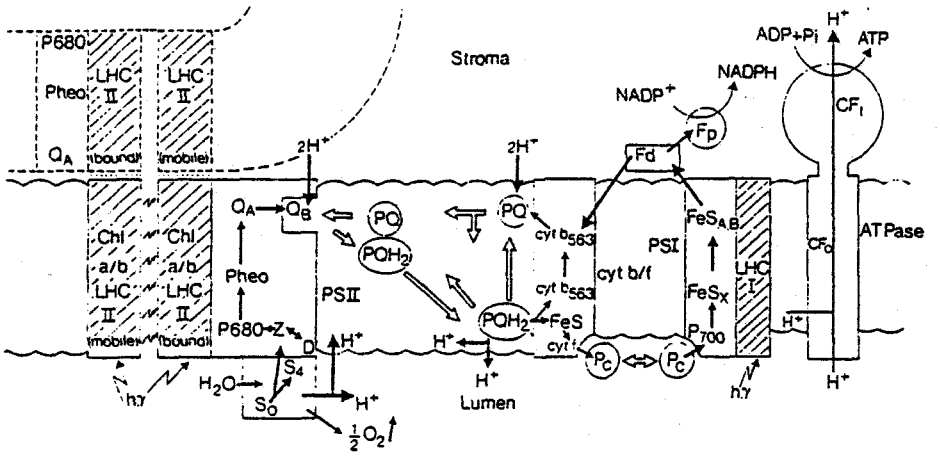


Figure 1.1. Electron transport and photosynthetic free energy transduction in the thylakoid membrane of plant chloroplasts. Light is absorbed by the pigment protein complexes LHC I and LHC II or directly by the antennae pigments of the reaction centers of PSII (P_{680}) or PSI (P_{700}). When the energy of the absorbed photon reaches the reaction centre a charge separation occurs leading to the oxidation of the reaction centre and a reduction of the acceptors of the two photosystems, i.e. Q_A in PSII and reduced ferredoxin (Fd) in PSI. The electron to reduce P_{680} comes from the oxidation of water. Water oxidation is a four step light-induced process $S_0 \Rightarrow S_4$. At the oxidation of two water molecules one oxygen molecule evolves and four protons are released either into the lumen or into a restricted areas of the membrane as proposed by Dilley (1986). The electron of Q_A^- is passed on to a two electron acceptor Q_B, which can take up two protons from the stroma when fully reduced. Q_BH_2 exchanges with the hydrogen carrying PQ pool and a hydrogen molecule is transferred from the stroma to the lumen and from the appressed to the non-appressed membrane regions. PQH_2 is oxidized at the cytochrome b/f complex. Protons are thereby released either into the lumen or within the membrane (see paragraph 6.3 of this thesis). One electron is transferred to P_{700} via plastocyanin, cytochrome f and the Rieske-FeS protein. Another electron is thought to reduce cytochrome b_6 and can cause a "secondary" charge separation by reducing PQ on the stroma side together with an electron from Fd. This type of cyclic electron transport is sometimes referred to as the Q-cycle (Hendler et al. 1985). Thus electrons are transferred from water to Fd and to $NADP^+$. In the process protons are transferred from the stroma to the lumen. This leads to an electrochemical proton potential $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$. The ATPase converts the energy of protons into bound energy (ATP).

Figuur 14. Illustratie van de onderlinge samenhang van de verschillende complexen in het thylakoïdmembraan van de chloroplast. De verschillende electronen- en protonen fluxen zijn tevens aangegeven. (voor verdere details zie Engels bijschrift) (uit: v. Kooten,1988)

De gegevens over de bouw van het fotochemisch apparaat zijn ontleend aan een aantal recente revieuw artikelen (Anderson,1986; Fork,1986; Glazer,1987; Vanngard,1988). Een deel van de illustraties is overgenomen uit het proefschrift van Olaf van Kooten (1988).

2.2 Globale bouw en functie van het fotochemisch apparaat

Het fotochemisch apparaat is gelocaliseerd in de thylakoïdmembramen van de chloroplast. Het fotochemisch apparaat bestaat in feite uit een elektronentransportketen (ETK) waarin twee typen fotosystemen zijn opgenomen. De fotosystemen leveren de drijvende kracht voor het transport van elektronen van water, tegen een potentiaal gradiënt in, naar $NADP^+$. De twee typen fotosystemen worden eenvoudig aangeduid met fotosysteem I (PSI) en fotosysteeem II (PSII). De noodzaak van twee fotosystemen in de keten komt voort uit de te kleine energie-inhoud van lichtkwanten om in één keer het potentiaalverschil tussen water en $NADP^+$ te overbruggen. Het gebruik van twee lichtkwanten door de in serie geschakelde fotosystemen wordt geïllustreerd in de figuren 12 en 13.

De meeste componenten van de ETK zijn georganiseerd in drie membraanoverbruggende complexen (PSI,PSII en het cyt b/f-complex). Ieder complex is opgebouwd uit verscheidene eiwitten, pigmenten en elektronencarriers. Lichtenergie wordt ingevangen door speciale eiwit-chlorofyl complexen. Deze Light-Harvesting-Complexen (LHC) sluizen geabsorbeerde lichtenergie door naar de fotochemische reactiecentra in fotosysteem I (PSI) en fotosysteem II (PSII). Het elektronentransport van water naar $NADP^+$ kan schematisch worden voorgesteld door :

H_2O --e^---> PSII --e^---> cytb/f --e^---> PSI --e^---> $NADP^+$

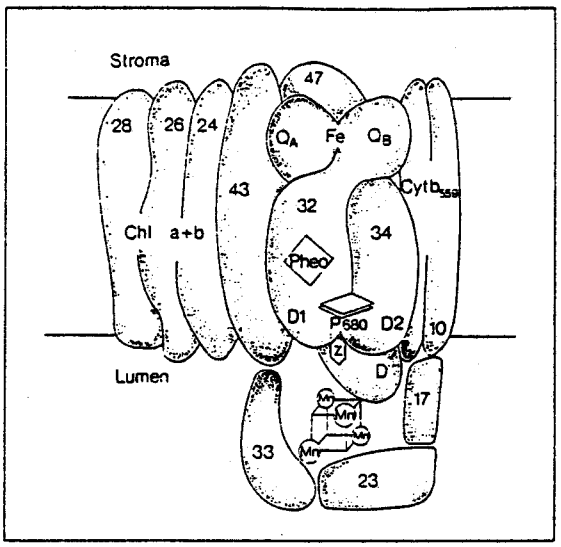


Figure 1.2. Photosystem 2 (PSII) together with the light harvesting complex (LHC II) proteins and the manganese containing oxygen evolving complex (OEC) depicted as one large complex in the thylakoid membrane. The D1-D2 proteins form a minimal configuration in which a charge separation can still occur. They contain the Chl a dimer known as P_{680}. One of the transitions of the primary acceptor (a pheophytin molecule) is perpendicular to the plane of the membrane. The D1-D2 complex also contains the two quinone acceptors Q_A and Q_B and a liganded iron atom, which probably mediates the electron transfer from the one electron acceptor Q_A to the two electron acceptor Q_B. Cytochrome b_{559} is thought to play a part in cyclic electron flow around PSII. The 47 kDa protein contains the primary (Z) and the secondary (D) donor for P_{680}. Together with the 43 kDa protein it is believed to bind the OEC (33, 23 and 17 kDa) to PSII. The OEC contains two tightly bound and two loosely bound manganese atoms. The LHC II is thought to consist of three different proteins (24, 26 and 28 kDa). One group is tightly bound to PSII, while three groups are believed to be mobile. The mobile units can be phosphorylated and then detach from PSII. The phosphorylated LHC II is thought to associate with LHC I, thereby changing the ratio of absorbtion between PSI and PSII in favour of PSI.

Figuur 15. Illustratie van PSII met bijbehorende LHCII-eiwitten en het mangaan houdende OEC. (voor verdere details zie Engels bijschrift) (uit: v. Kooten,1988)

$$P680 \cdot Ph \cdot Q_A \xrightarrow[\text{energy}]{\text{light}} P680^* \cdot Ph \cdot Q_A \xrightarrow{<10\ \text{ps}} P680^+ \cdot Ph^- \cdot Q_A,$$

$$P680^+ \cdot Ph^- \cdot Q_A \xrightarrow[\text{ps}]{\sim 100} P680^+ \cdot Ph \cdot Q_A^- \xrightarrow[\text{ns}]{50} P680 \cdot Ph \cdot Q_A^- \xrightarrow[\mu s]{200} P680 \cdot Ph^{\cdot} \cdot Q_A.$$

Schema 1. Verschillende ladingsscheidings-reacties rondom PSII met bijbehorende reactietijden.

Door het transport van elektronen worden protonen van de buitenzijde verplaatst naar de binnenzijde van het thylakoïdmembraan (figuur 14). De hierdoor opgebouwde protonengradiënt is de drijvende kracht voor de in het thylakoïdmembraan voorkomende ATP-synthetasen welke ADP en P_i binden tot het energierijke ATP. De drie complexen van de ETK, fotosysteem II, cytb/f-complex en en fotosysteem II zijn niet direkt maar via elektronencarriers met elkaar verbonden. Plastoquinone (PQ) verbindt fotosysteem II met het cytb/f-complex. Plastocyanine (Pc) verbindt het cytb/f-complex met fotosysteem I.

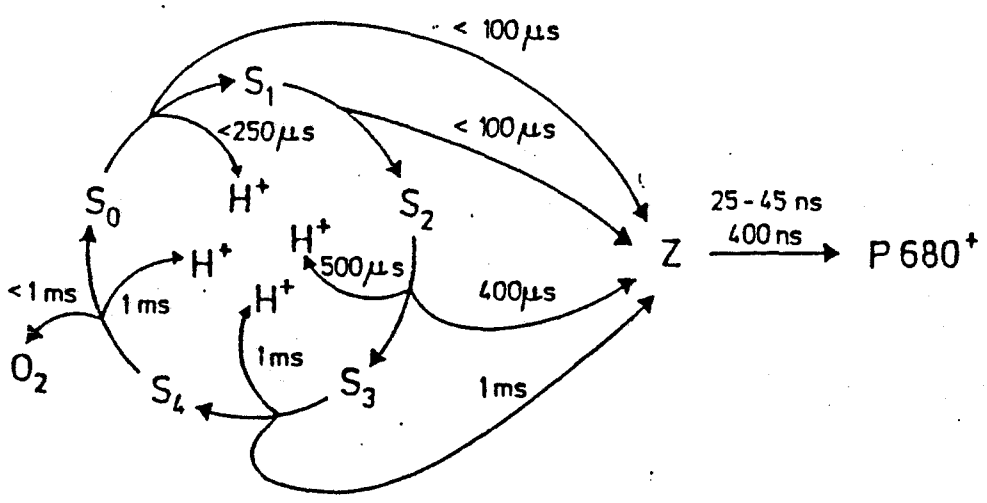
2.3 Componenten van het fotochemisch apparaat

De onderlinge samenhang van de verschillende componenten van het fotochemisch apparaat en de elektronen- en protonenfluxen zijn weergegeven in figuur 14.

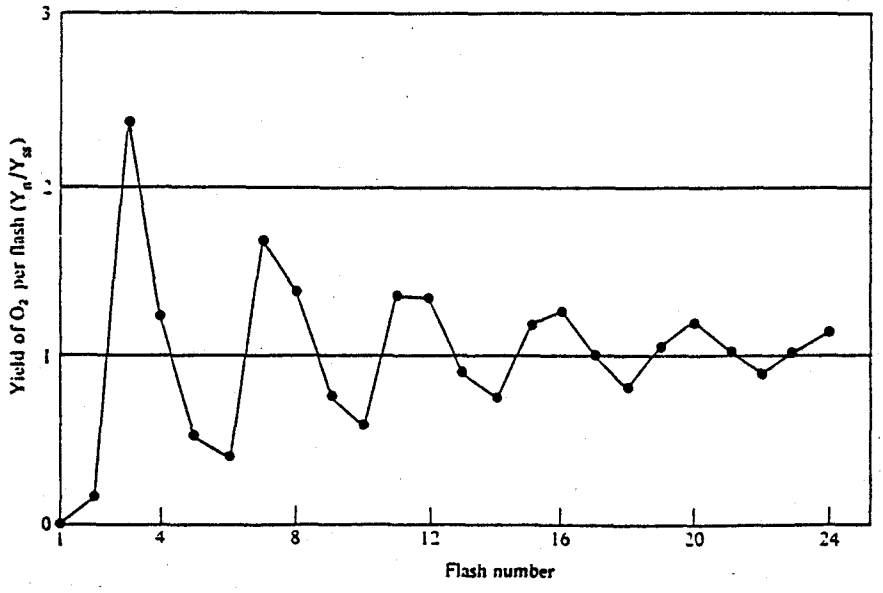
2.3.1 Fotosysteem II (PSII)

PSII (figuur 15) is in staat tot oxidatie van water aan de ene kant en reductie van PQ aan de andere kant. Het intrinsieke (in het membraan ingebedde) deel van PSII bestaat uit het fotochemisch reactiecentrumcomplex (D_1-eiwit of Q_B-bindend eiwit, P680, pheofytine en Qa), het D_2-eiwit, het cytochroom b_{559}, het chl-a "kern" antennecomplex en het chl-a/chl-b Light Harvesting Complex II (LHCII). Het extrinsieke deel van PSII wordt gevormd door drie eiwitten van het watersplitsend systeem wat ook wel oxygen evolving complex (OEC) wordt genoemd.

2.3.1.1 Het fotochemisch reactiecentrum van PSII bestaat uit een speciaal chlorofylmolecuul P680, genoemd naar de absorptieverandering rond 680 nm welke optreedt na haar fotooxidatie. Oxidatie van P680 kan plaatsvinden nadat lichtenergie bij het reactiecentrum is aangekomen. Na excitatie van P680 kan binnen



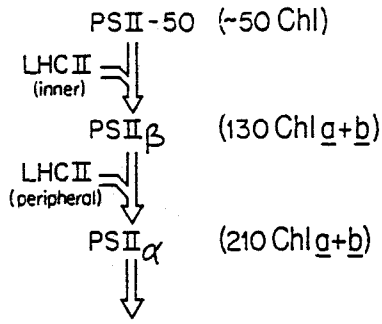
Schema 2. Turnover van het OEC via vijf toestanden met bijbehorende reactietijden.



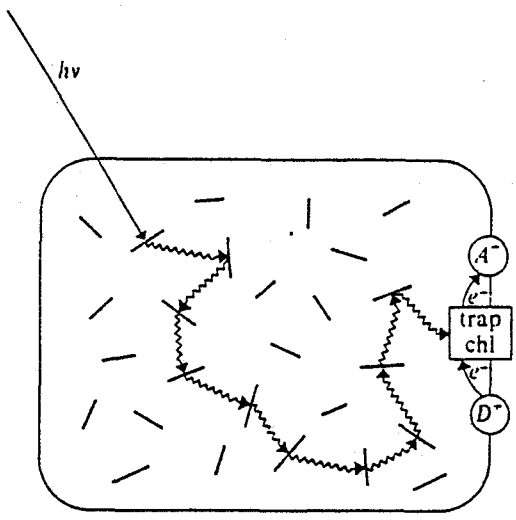
Figuur 16. O_2-productie per flits in afhankelijkheid van het flitsnummer na een donkeradaptatie van 40 minuten. (uit: Goodwin en Mercer,1983)

10 picosec. een ladingsscheiding optreden tussen P680 en de intermediaire acceptor pheofytine. Deze ladingsscheiding zal binnen enkele honderden picosec. worden gevolgd door een elektronoverdracht van pheofytine$^-$ naar de eerste stabiele acceptor Qa. Pheofytine is geen stabiele elektronenacceptor maar speelt slechts een rol als intermediair tussen P680 en Qa (schema 1). Wanneer Qa reeds is gereduceerd zal binnen 2-30 nanasec. een recombinatie optreden tussen pheofytine$^-$ en P680$^+$.

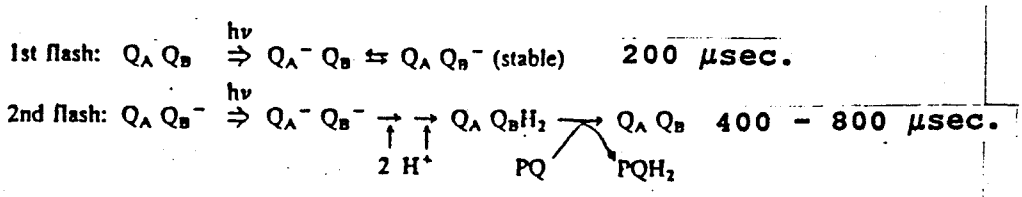
2.3.1.2 Het oxygen evolving complex (OEC) bevindt zich aan de binnenzijde van het thylakoïdmembraan. Het OEC zorgt voor de reductie van P680$^+$ met een elektron dat wordt ontrokken aan water waardoor O_2 vrij komt. Het elektronentransport van het OEC naar P680$^+$ verloopt via een intermediair Z. Recente gegevens wijzen erop dat dit een tyrosine eenheid van het D2-eiwit kan zijn. De overdracht van een elektron van Z naar P680$^+$ verloopt binnen 25-45 nanosec. (De 400 nanosec. welke ook in schema 2 wordt gegeven verwijst naar een andere donor D. De rol van deze donor is niet geheel duidelijk. Mogelijk speelt deze een rol bij een eventuele futiele cyclus rondom PSII (Schreiber,fluor. workshop Wag,1989).) Het OEC kent vijf toestanden, S_0 t/m S_4 (niet verwarren met aangeslagen toestanden). Bij iedere overgang van S_0 t/m S_4 wordt één elektron aan het OEC onttrokken (schema 2). Deze elektronen worden geleverd door 4 mangaan atomen in het OEC. De overgang van OEC^{4+}(S_4) naar OEC (S_0) gaat niet gepaard met de onttrekking van een elektron. Bij deze overgang komt O_2 vrij. In het donker worden de S_2 en S_3 toestanden gereduceerd tot S_1. De S_1 toestand in het donker en het vier elektronensysteem van het OEC kan door belichting van chloroplasten met korte intense flitsen worden aangetoond. Bij korte flitsen (<10μsec.) zal ieder PSII tijdens de flits slechts één elektron kunnen overdragen op Qa. Immers het opnieuw beschikbaar komen van Qa als acceptor duurt ca. 200μsec. Bij deze zgn. single-turnover flitsen zal na iedere flits één elektron uit het OEC worden gebruikt voor de reductie van P680$^+$.



Schema 3. Assemblage van $PSII_{\alpha}$ - centra.



Figuur 17. Illustratie van de functie van het antenne chlorofyl. (uit: Nobel,1970)



Schema 4. Reductie van plastoquinone (PQ) in twee stappen.

Als de OEC'en in het donker in de S_1 toestand verkeren, verwachten we pas na de 3^e flits het vrijkomen van O_2 en daarna een periodiciteit van vier. Figuur 16 geeft aan dat experimentele resultaten in overeenstemming zijn met deze verwachting. De doving in de oscillatie is een gevolg van bij een flits gemiste PSII centra. Hierdoor gaan de verschillende OEC'en uit fase lopen.

2.3.1.3 Het light harvesting complex LHCII van fotosysteem II neemt meer dan de helft van het totale chlorofyl en intrinsieke eiwit van het thylakoïdmembraan voor haar rekening. De antenne van PSII bestaat uit chl-a, chl-b (chl-a:chl-b≈1.1) en carotenoïden georganiseerd in verschillende LHC-eenheden. Het antenne chlorofyl van PSII kan dan ook onderverdeeld worden in:

- "kern"-chlorofyl : ca. 50 chl-a moleculen welke deel uitmaken van PSII
- "LHCII-intrinsic" : ca. 80 chl-(a+b) moleculen welke nauw verbonden zijn met PSII
- "LHCII-peripheral" : ca. 120 chl-(a+b) moleculen welke verbonden zijn met PSII maar onder bepaalde condities van PSII kunnen ontkoppelen.

Volgens Melis et al (1987) komen in chloroplasten van hogere planten twee typen PSII centra voor (PSIIα(75%) , $PSII_\beta$ (25%)). $PSII_\beta$ zou slechts omgeven zijn door LHCII-intrinsic. Melis et al (1987) geven ook aan dat niet alle PSII centra in staat zijn tot reductie van PQ. $PSII_\beta$ zou mogelijk overeenkomen met de PSII-PQ-nonreducing centra welke geen PQ kunnen reduceren. Melis et al (1987) geven aan dat $PSII_\beta$ en $PSII_\alpha$ mogelijke ontwikkelingsstadia van PSII zijn (zie schema 3). Ook zou $PSII_\beta$ uit $PSII_\alpha$ gevormd kunnen worden door loskoppeling van LHCII-peripheral. Deze loskoppeling kan optreden o.i.v. fosforylatie van het LHCII-peripheral. Dit wordt ook wel aangeduid met de zogenaamde state-

Rekenvoorbeeld 1.

chlorofyl concentratie = 0.61 $mol.l^{-1}$
bladdikte = 0.01 cm
lichtintensiteit = 150 $\mu E.m^{-2}.sec-1$ = ca. 30 $Watt.m^{-2}$
(1 E = 1 mol fotonen)

één m^2 blad bevat 0.061 mmol chlorofyl <=>

het aantal fotonen dat per sec. per chlorofylmolecuul geabsorbeerd kan worden volgt uit :

$(150 * 10^{-6}) / (0.061 * 10^{-3})$ = 2,5 foton per molecuul chlorofyl per sec.

<u>situatie 1</u> antenne grootte = 250 chlorofyl moleculen per PSII

Gemiddeld 250 * 2,5 ≈ 600 fotonen per PSII per sec. beschikbaar
Bij een maximale turnoversnelheid van PSII van ± 1 msec. is het fotonen aanbod dan in overeenstemming met de verwerkings-capaciteit. (de maximale turnoversnelheid volgt uit de maximale CO_2-assimilatie en het aantal PSII eenheden per bladoppervlakte eenheid ,zie rekenvoorbeeld 2)

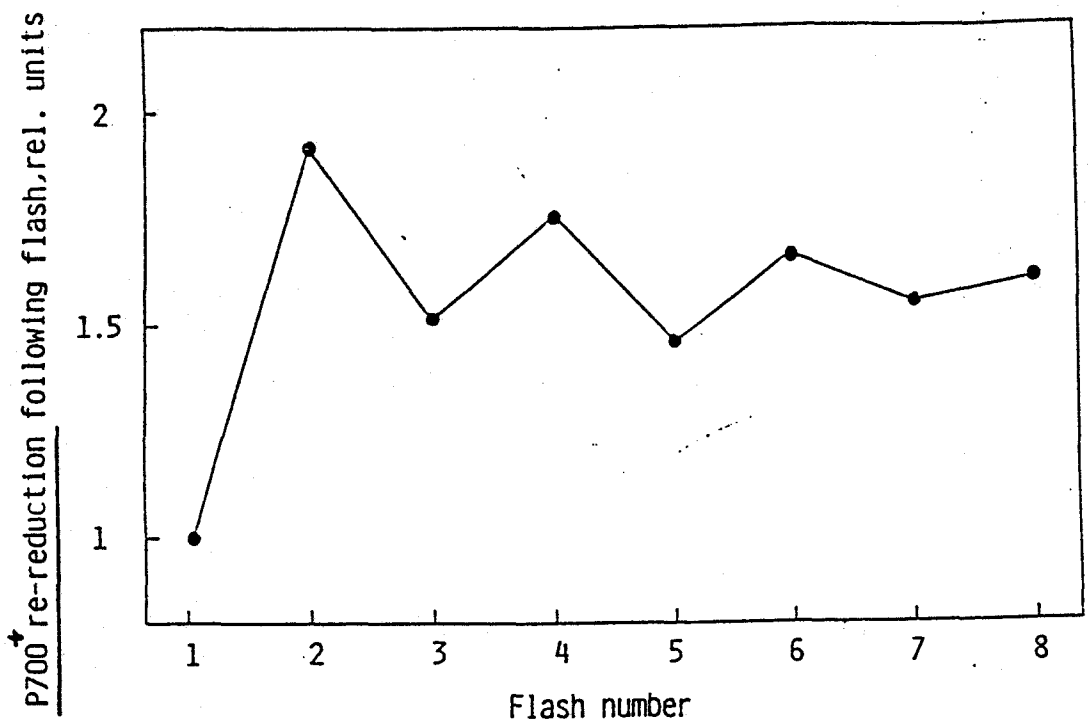
<u>situatie 2</u> antenne grootte = 1 chlorofyl molecuul per PSII

Gemiddeld 1 * 2,5 ≈ 2,5 fotonen per PSII per sec. beschikbaar
Bij een maximale turoversnelheid van PSII van ± 1 msec. zal slechts 1% van de capaciteit van PSII worden benut. Dit is een onvoordelige situatie voor de plant en komt derhalve ook niet voor.

transition. Matige hitte behandeling van thylakoïdmembramen kan ook leiden tot loskoppeling van LHCII-peripheral. De PSII-heterogeniteit en het fysiologisch belang ervan is nog niet opgehelderd.

De functie van het LHCII wordt in figuur 17 geïllustreerd. Zonder LHCII zal een fotosysteem inefficiënt worden gebruikt. De gemiddelde tijdsduur tussen de absorptie van twee fotonen zal dan veel groter zijn dan voor de verwerking van deze fotonen noodzakelijk is. De grootte van de antenne (≈250 chl-(a+b)) is zodanig dat bij een gemiddeld lichtniveau het aanbod van fotonen overeenstemt met de verwerkingscapaciteit in de fotosystemen (rekenvoorbeld 1).

2.3.1.4 Plastoquinone (PQ) is de uiteindelijke acceptor van PSII. De reductie van PQ vereist 2 elektronen en verloopt via Qb in twee stappen (schema 4). PQ bindt zich voor deze reductie aan het Q_B-eiwit van PSII. De remming van het elektronentransport via herbiciden als diuron (DCMU) en atrazine berust op een verdringing van PQ van de bindingplaats op het Q_B-eiwit. Een elegante illustratie van de noodzaak van 2 elektronen voor de reductie van PQ wordt geleverd door Schreiber et al (1989). Ook zij maken gebruik van korte (± 14μsec.) intense "single-turnover" flitsen voor PSII die naast een continue belichting met verrood licht naar chloroplasten worden gezonden. Verrood licht (>700nm) wordt wel door PSI maar nauwelijks door PSII geabsorbeerd. Het verrood licht zorgt ervoor dat fotosysteem I volledig wordt geoxideerd. Een geoxideerd en een niet-geoxideerd fotosysteem I vertonen een verschil in lichtabsorptie bij 820 nm. De mate van oxidatie van fotosysteem I kan dan ook worden gemeten via absorptie veranderingen rond 820 nm. Fotosysteem I is voor haar reductie afhankelijk van elektronen van PQH_2. Pas wanneer PQH_2 is gevormd kan het geoxideerde fotosysteem I worden gereduceerd. De vorming van PQH2 is afhankelijk van lichtabsorptie door PSII. Schreiber et al vonden dat om de twee single-turnoverflitsen (welke wel door PSII



Figuur 18. Re-reductie van $P700^+$ in afhankelijkheid van het flitsnummer. (door het vrijkomen van PQH_2 bij de 2^e, 4^e, 6^e en 8^e flits is de re-reductie dan het grootst; de re-reductie werd afgeleid uit veranderingen van de absorptie bij 820nm) (uit: Schreiber et al, 1989)

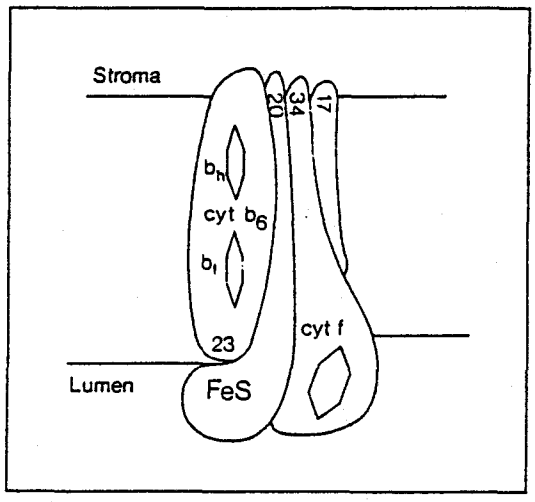


Figure 1.4. The cytochrome b/f (cyt b/f) complex containing two cyt b_{563} hemes aligned above each other perpendicular to the plane of the membrane. Both the FeS centre of the "Rieske" protein and the heme of the cytochrome f molecule are situated in the lumen. Both proteins, however have an alpha helix strand passing through the membrane (Hauska 1986). The function of the 17 kDa protein is unknown as yet.

Figuur 19. Illustratie van het cyt b/f complex. (voor verdere details zie Engels bijschrift) (uit: v. Kooten,1988)

worden geabsorbeerd) een sterke absorptie verandering bij 820 nm optrad, hetgeen bewijst dat er inderdaad 2 elektronen nodig zijn voor de reductie van PQ tot PQH_2 (figuur 18). Schreiber et al (1989) tonen met dezelfde techniek aan dat per PSII ca. 8 PQ moleculen voor reductie beschikbaar zijn. De verhouding PQ:PSII is echter geen constante maar is sterk afhankelijk van de licht-intensiteit tijdens de groei (Anderson en Osmond,1987).

2.3.2 Het cytochroom b/f complex

Het cytochroom b/f complex (figuur 19) bevat twee cytochroom b_{563} haemes, één cytochroom f, een Fe-S-Rieske eiwit en een nog niet nader geïdentificeerd eiwit. Het cyt b/f complex speelt zowel een rol bij het lineaire elektronentransport van PQH_2 naar PSI als bij het cyclisch elektronentransport (Q-cyclus).
In de Q-cyclus wordt PQ aan de buitenzijde van het thylakoïd-membraan gereduceerd en aan de binnenzijde weer geoxideerd (figuur 14). De Q-cyclus resulteert hierdoor in een extra protonen verplaatsing over het thylakoïdmembraan. PQ aan de buiten(stroma)zijde verkrijgt de elektronen rechtstreeks via cytochroom b_{563} (cyclisch elektronentransport via het cyt b/f complex) of via Pc ,PSI Fd en cytochroom b_{563} (cyclisch elektronentransport via PSI) (figuur 14).
De diffusie van PQH_2 van PSII naar het cyt b/f complex is de traagste stap in het lineaire elektronentransport. Haehnel (1984) noemt diffusietijden voor PQH_2 varierend tussen 2 en 15 milisec. Het transport van elektronen via cyt b/f naar Pc verloopt binnen één milisec. De overdracht van elektronen door Pc van het cyt b/f complex naar PSI vergt ca. 300μsec.

2.3.3 Fotosysteem I (PSI)

Fotosysteem I (figuur 20) is een chlorofylhoudend eiwitcomlex. Het reactiecentrum van PSI bestaat uit een speciaal chlorofyl-molecuul P700 welke is geassocieerd met een eiwitdimeer. De eiwitdimeer bindt naast P700 nog zo'n 130 chlorofyl-a en 16

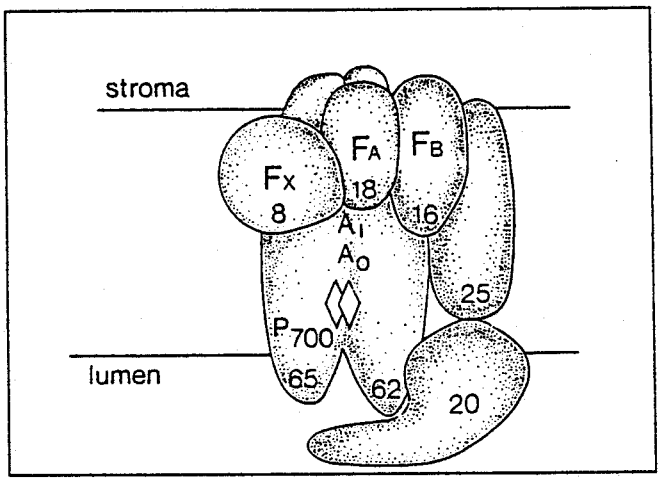
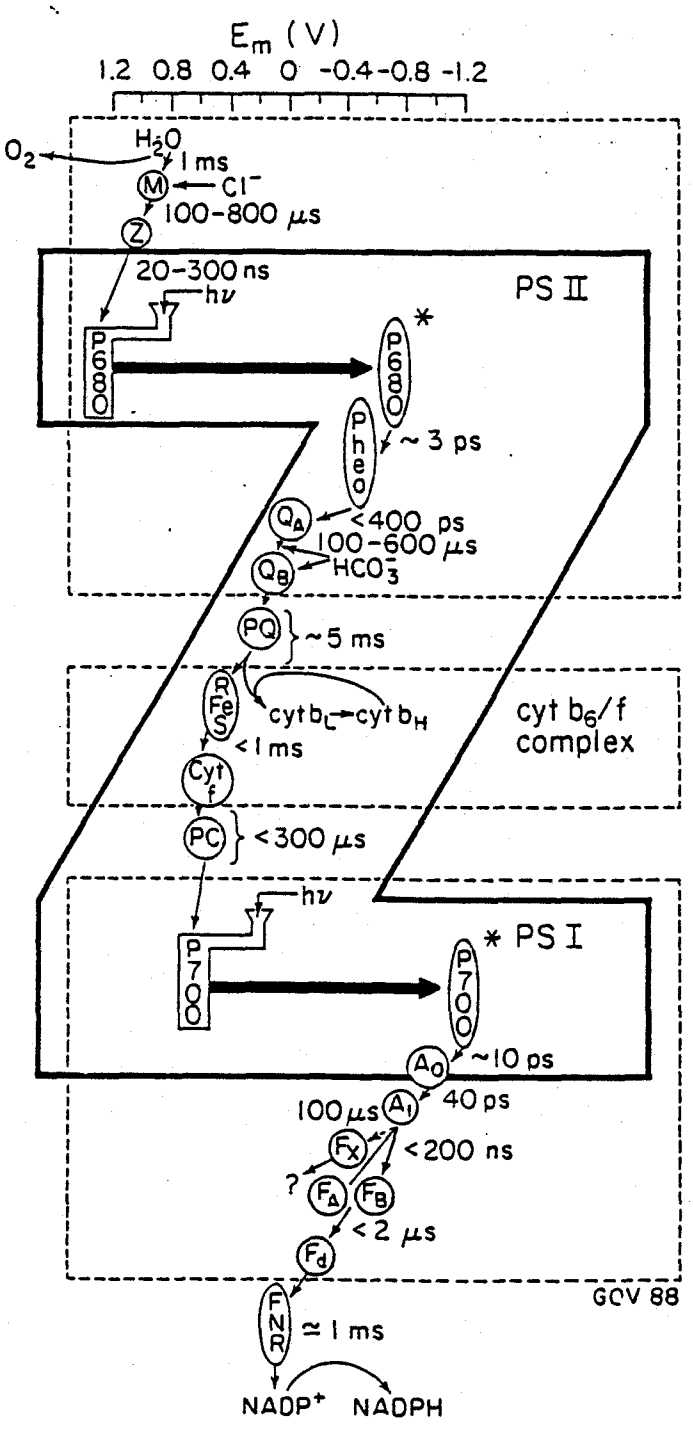


Figure 1.3. A hypothetical model of photosystem I (PSI) based on our present knowledge. The reaction centre complex consists of two large proteins (65 and 62 kDa) in which the primary charge separation between the special Chl a dimer P_{700} and the primary chlorophyll type acceptor A_0 takes place. The second acceptor A_1, a molecule with properties resembling vitamin K, also resides in the reaction centre complex. Three iron sulfur centers, thought to be 4Fe-4S centers and designated as F_X (8 kDa, $E_{m,7}$ = -730 mV), F_B (16 kDa, $E_{m,7}$ = -590 mV) and F_A (18 kDa, $E_{m,7}$ = -550 mV), appear to form a linear transport chain for the electron, which is finally donated to ferredoxin or lost to oxygen (Mehler reaction). The function of the other two proteins (25 and 20 kDa) is unknown as yet. Although it is speculated that the 20 kDa protein plays a role in the positioning of the Cu-protein plastocyanin, to facilitate electron transfer to P_{700}.

Figuur 20. Illustratie van het fotosysteem I. (voor verdere details zie Engels bijschrift) (uit: v. Kooten,1988)



Figuur 21. Overzicht van de verschillende stappen van het electronen-transport van water naar $NADP^+$ met bijbehorende reactietijden. (naar: Govindjee,1988)

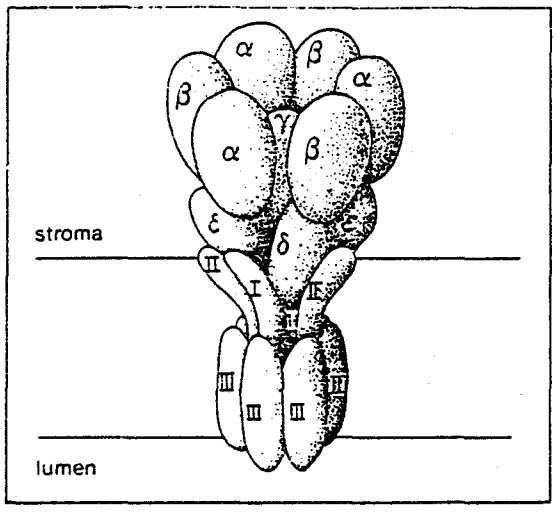


Figure 1.5. The proton ATP synthase (ATPase) complex consisting of an integral membrane part CF_0 (containing the subunits I, II and III) and a part protruding into the stroma CF_1 (containing the subunits α, β, γ, δ and ϵ). The CF_0 is considered to be the proton conductive part, in which subunit III (9 kDa) forms a hexamer with 6 $-COO^-$ residues in the centre of the membrane. This forms a hexacooperative buffer (Junge et al. 1984a). The enzymatic part of the complex (CF_1) contains a trimeric complex $\alpha_3\beta_3$, which is believed to be the catalytic site for ATP synthesis or hydrolysis. The other subunits appear to play a role in the interconnection of the two coupling factor parts CF_0 and CF_1.

Figuur 22. Illustratie van het ATP-synthase complex. (voor verdere details zie Engels bijschrift) (uit: v. Kooten,1988)

carotenoïd moleculen welke het chl-a "kern"-antenne complex van PSI vormen. Daarnaast heeft PSI een chl-(a+b) light-harvesting-complex (LHCI) bestaande uit 60-80 chl-(a+b) moleculen (chl-a:chl-b≈3). De totale antennegrootte van PSI komt daarmee op ca. 210 moleculen hetgeen vergelijkbaar is met de antennegrootte van PSII. Nadat P700 is aangeslagen zal een elektron worden overgedragen aan de primaire acceptor A_0. Deze zal het elektron overdragen aan A_1. A_0 en A_1 zijn net als P700 geassocieerd met de eiwitdimeer. Van A_1 gaat het elektron verder naar het membraan gebonden Fe-S-centrum (F_x, F_a, F_b). F_x is gelocaliseerd op de eiwitdimeer, F_a en Fb liggen op een kleiner eiwit. De uiteindelijke acceptor van PSI is ferredoxine (Fd). Ook zuurstof kan optreden als acceptor in de plaats van $NADP_+$ (Mehler-reactie). Gereduceerd Fd kan het elektron overdragen aan [1] het ferredoxin-NADP-reductase (FNR) of [2] aan PQ via het cyt b/f complex (cyclisch elektron transport)(zie figuur 14). Overdracht aan FNR leidt tot de reductie van $NADP^+$. Een samenvatting van alle stappen van het elektronen transport van water naar $NADP^+$ met bijbehorende reactietijden is gegeven in figuur 21.

2.3.4 Het ATP-synthetase complex

Het ATP-synthetase complex (figuur 22) bestaat uit een hydrofoob (CF_0) en een hydrofiel (CF_1) deel. Het CF_0 deel is in het thylakoïdmembraan ingebed en bestaat uit drie typen eiwit. Het hydrofiele deel bevindt zich aan de buitenzijde van het thylakoïdmembraan en is geassocieerd met CF_0. De chemi-osmotische theorie van Mitchell gaat er vanuit dat de protonengradiënt, opgebouwd via het elektronentransport, de drijvende kracht is voor de ATP-ase. Bij de reductie van PQ bij PSII worden twee protonen opgenomen uit de stroma van de chloroplast. Bij oxidatie van PQH_2 bij het cyt b/f-complex worden deze protonen afgegeven aan de binnen(lumen)zijde van het thylakoïdmembraan. Op deze wijze wordt een protonengradïent (of elektro-chemische potentiaal) opgebouwd. De synthese van ATP wordt mogelijk gemaakt door het terugtrans-

port van de protonen van de binnen naar de buitenzijde van het membraan via het ATP-ase complex (figuur 14).

2.4 Verdeling van de verschillende comlexen over het thylakoïdmembraan

In het thylakoïdmembraan van chloroplasten zijn twee verschillende gebieden te onderscheiden. [1] De gestapelde gebieden (grana) en [2] de niet-gestapelde gebieden (stroma-lamellen). Het huidige inzicht in de verdeling van de verschillende comlexen over deze twee gebieden geeft aan dat :

- 70 á 80 % van de PSII complexen ($PSII_{\alpha}$) zich bevinden in de grana.
- 20 á 30 % van de PSII complexen ($PSII_{\beta}$) zich bevinden in de stromalamellen.
- de ATP-ase complexen zich uitsluitend in de stromalamellen bevinden.
- PSI complexen voornamelijk voorkomen in de stromalamellen.
- cyt b/f-complexen gelijkelijk zijn verdeeld over stromalamellen en grana.

Wrischer (1989) toonde bij maïs (C_4-plant) aan dat de PSII-aktiviteit bijna uitsluitend voorkwam in de grana van de mesofyl-chloroplasten. In volledig gedifferentieerde chloroplasten van de bundelschede-cellen waren grana afwezig. De PSII aktiviteit van bundelschedecellen was ook nihil. Daarintegen werd wel een hoge PSI aktiviteit aangetoond in de chloroplasten van bundelschede- en die van mesofylcellen. In de chloroplasten van mesofylcellen bevond de PSI aktiviteit zich in de stroma-lamellen en in de periferie van de grana. In de chloroplasten van de bundelschede-cellen bevond de PSI aktiviteit zich in de stroma-lamellen. Ook Li en Nothnagel (1989) constateerden op basis van fluorescentie-

Rekenvoorbeeld 2

chlorofyl concentratie = 0.61 $mol.l^{-1}$
bladdikte = 0.01 cm

één m^2 blad bevat 0.061 mmol chlorofyl

De maximale fotosynthese-snelheid (P_{max}) van een maïsblad bedraagt ca. 7 gram $CO_2.uur^{-1}.m^{-2}$ blad.

<=> P_{max} = 44.19 μmol $CO_2.sec^{-1}.m^{-2}$ blad

<=> P_{max} = 176.76 μmol elektronen.$sec^{-1}.m^{-2}$ blad

Omdat de PSII concentratie ongeveer 2 mmol per mol chlorofyl bedraagt, volgt:

één m^2 blad bevat 0.061/500 = 0.122 μmol PSII

de maximale turnover snelheid van PSII volgt uit:

(0.122 μmol PSII.m^{-2} blad)/(176.76 μmol elektronen.$sec^{-1}.m^{-2}$ blad)

<=>

maximale turnover snelheid van PSII = 0.7 milisec.

metingen dat de PSII aktiviteit in maïs beperkt was tot de mesofylchloroplasten.
Anderson en Osmond (1987) geven concentraties en onderlinge verhoudingen van de verschillende complexen in het thylakoïd-membraan. Gemiddeld luiden deze:

PSII	: 2	mmol / mol chlorofyl
PSI	: 1.8	mmol / mol chlorofyl
cyt b/f	: 1.6	mmol / mol chlorofyl

De concentratie van het ATP-ase complex is vergelijkbaar met die van PSI (O.v. Kooten,pers. mededeling).

De verhoudingen zijn niet constant maar bv. afhankelijk van de lichtintensiteit tijdens de groei van planten. Lage licht-intensiteit resulteert in lagere verhoudingen tussen complexen en chlorofyl. Cyt b/f en ATP-ase zijn het meest gevoelig voor licht-intensiteit. De PSII reageert minder en PSI reageert nauwelijks op variatie in lichtintensiteit (Anderson en Osmond,1987). Op basis van deze gegevens kan bij een gegeven chlorofylconcentratie in het blad en gegeven bladdikte de hoeveelheid complexen per oppervlakte eenheid blad worden berekend. Wanneer van hetzelfde blad tevens de maximale CO_2-assimilatiesnelheid bekend is, kan de minimale turnover tijdsduur van een PSII worden geschat (= de tijdsduur nodig voor het verwerken van een lichtkwant) (reken-voorbeeld 2).

3. OORSPRONG, METING EN INTERPRETATIE VAN IN VIVO CHLOROFYL-FLUORESCENTIESIGNALEN

3.1 Oorsprong van in-vivo fluorescentie

Chlorofyl geassocieerd met PSI vertoont bij kamertemperatuur nagenoeg geen fluorescentie (Butler,1978). Slechts bij een lage temperatuur (-196°C) treedt een duidelijke fluorescentieband van PSI-chlorofyl naar voren. De fluorescentie-intensiteit van PSI-chlorofyl is onafhankelijk van de mogelijkheid voor het gebruik van lichtenergie voor fotochemie in PSI. Oxidatie van P700 tot $P700^+$ m.b.v. verrood licht resulteert daarom niet in een toename van de fluorescentie van PSI-chlorofyl (Butler,1978). Een $P700^+$ reactiecentrum is reeds geoxideerd en kan in deze toestand geen fotochemie meer bedrijven. Aangenomen wordt dat $P700^+$ ingevangen lichtenergie omzet in warmte.
De fluorescentie-intensiteit van PSII-chlorofyl is **wel** afhankelijk van de mogelijkheid voor het gebruik van lichtenergie voor fotochemie in PSII. Zo neemt de fluorescentie van PSII-chlorofyl toe wanneer de acceptor Qa van PSII wordt gereduceerd. Een $PSII^-$ ($P680.Qa^-$) kan geen fotochemie meer bedrijven door het gebrek aan een stabiele elektronenacceptor. Immers P680 kan dan zijn elektron niet kwijt. De kans dat geabsorbeerde lichtenergie weer wordt uitgestraald als fluorescentielicht neemt hierdoor toe. Een PSII met een gereduceerde Qa-acceptor ($PSII^-$) wordt veelal aangeduid met "gesloten", terwijl een niet-gereduceerd PSII centrum aangeduid wordt met "open". De termen "gesloten" en "open" slaan op het niet/wel kunnen verwerken van nieuwe lichtkwanten.
Er is nog geen volledige eenduidigheid over de wijze waarop fluorescentie in een "gesloten" PSII ontstaat. Algemeen wordt aangenomen dat de fluorescentie afkomstig is van het chl-a van de "kern-antenne" van PSII. Eén mogelijkheid is, dat de lichtenergie

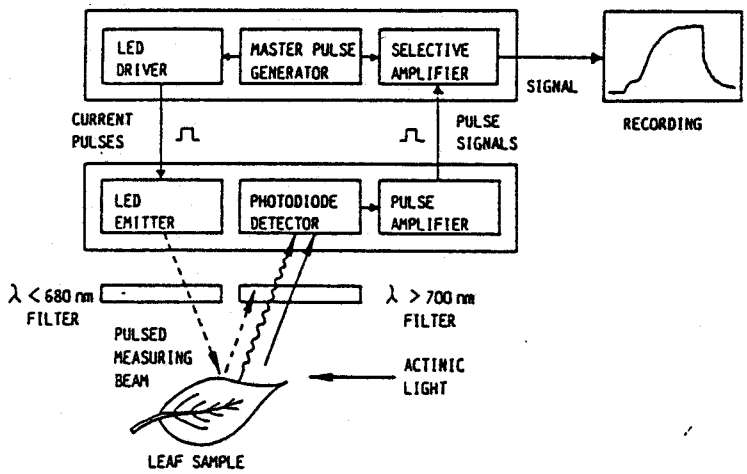


Figure 1. Schematic diagram of the pulse modulation chlorophyll fluorometer. A master pulse generator controls LED pulse emission and selective amplification of the pulse fluorescence signals. Optical short-pass and long-pass filters between the LED, sample and photodiode detector assure that no stray LED light can reach the detector. The modulated fluorescence yield is modified by the action of non-modulated actinic light, any direct signal of which is rejected by the combination of an AC-coupled pulse amplifier and the selective amplifier. In practice, the various light paths are connected via flexible, multibranched fiberoptics.

Figuur 23. Schematische weergave van de puls modulatie fluorometer. (PAM-fluorometer) (uit: Schreiber,1986)

na aankomst bij P680 van een "gesloten" PSII, direkt terugspoelt naar de antenne, waar vervolgens een deel van de lichtenergie verloren gaat als fluorescentie. Deze mogelijkheid wordt aangeduid met "prompt-fluorescence". Een andere mogelijkheid is dat er in eerste instantie wel een ladingscheiding optreedt tussen P680 en pheofytine. Door het reeds gereduceerd zijn van de stabiele acceptor Qa zou hierop snel (2-30 nanosec.) een recombinatie plaatsvinden tussen $P680^+$ en $pheofytine^-$. Pas na de recombinatie zou fluorescentielicht vrijkomen. Deze mogelijkheid wordt aangeduid met "recombinatie-luminescentie". Schreiber en Bilger (1987) veronderstellen dat in-vivo chlorofylfluorescentie bij kamertemperatuur voornamelijk prompt-fluorescence is, afkomstig van het chl-a van de kern-antenne van PSII.
Hoewel de oorsprong van de fluorescentie niet precies opgehelderd is, is wel duidelijk dat de intensiteit van de fluorescentie bij kamertemperatuur direkt gekoppeld is aan het functioneren van PSII.

3.2 Meettechniek

Hoewel de toepassing van fluorescentiemetingen in de plantenfysiologie niet nieuw is, heeft zij in de laatste paar jaar een enorme vlucht genomen. Dit is te danken aan de komst van een nieuw type fluorometer (Schreiber,1986). In deze paragraaf wordt een beknopte uitleg gegeven van het principe van deze nieuwe fluorometer. Voor een uitgebreidere uitleg wordt verwezen naar Schreiber (1986).

De nieuwe "PAM-fluorometer" is genoemd naar het meetprincipe. PAM staat voor pulse amplitude modulated. Zwakke lichtpulsjes (het zgn. meetlicht) met een duur van 1μsec. en een golflengte van 650 nm worden via een glasfiber naar het te meten blad gestuurd (figuur 23). Deze lichtpulsjes leiden tot het ontstaan van fluo-

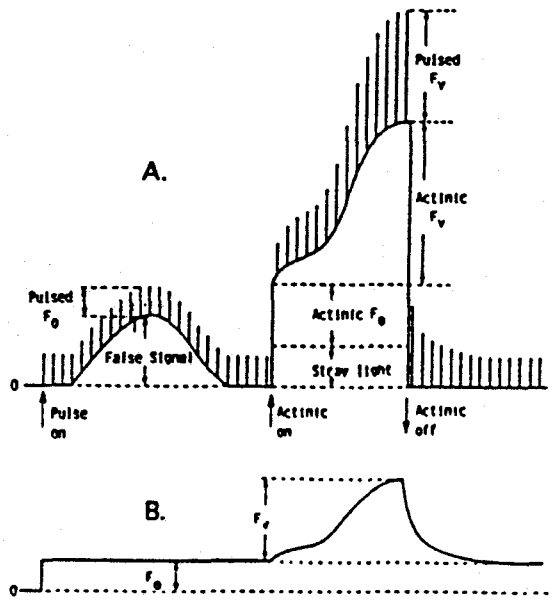


Fig. 3 Measuring principle of pulse modulation fluorometer.
A. Unprocessed signal at photodiode. B. Processed signal at output of selective amplifier system. Brief pulses of measuring light are applied repetitively. Signal changes induced by actinic illumination and upon redarkening are displayed schematically. In practice, the non-pulsed signal may exceed the pulsed signal by more than a factor 10^6. Only the pulsed fluorescence is amplified and recorded as a continuous signal.

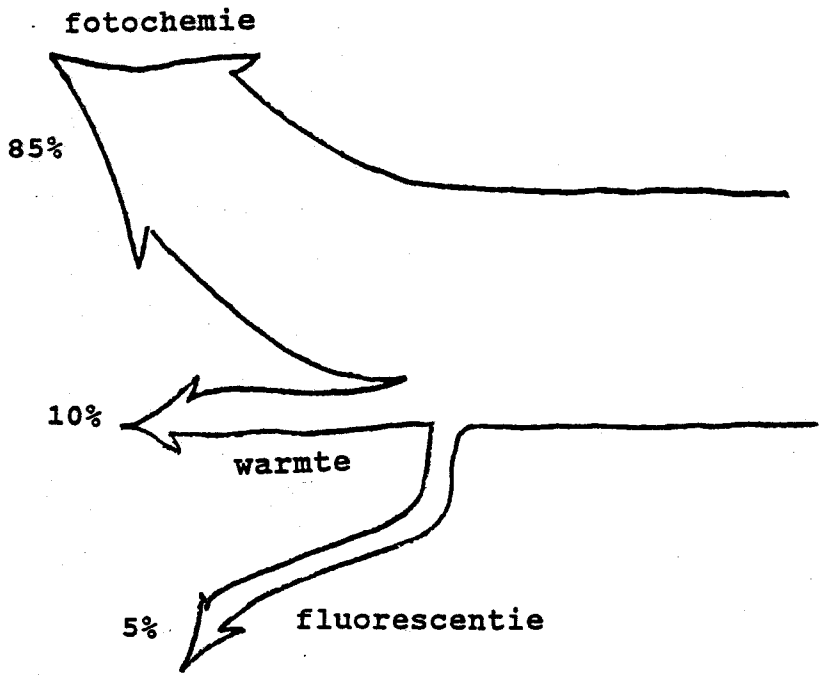
Figuur 24. Meetprincipe van de PAM-fluorometer.
[A] = onbewerkt fluorescentie signaal zoals dat de detector bereikt. [B] = bewerkt fluorescentie signaal als output van de selectieve puls versterker.
(actinic = nevenbelichting) (uit: Schreiber en Bilger,1987)

rescentiepulsjes. Door de korte halfwaardetijd voor fluorescentie (nanosec.) vallen de fluorescentiepulsjes samen met de lichtpulsjes (geen nagloei effect). De geïnduceerde fluorescentiepulsjes worden via een glasfiber naar de detector geleid. Door het meetlicht te filteren door een short-pass filter (laat golflengtes <680 nm door) en de detector af te schermen met een long-pass filter (laat golflengtes >700 nm door) wordt voorkomen dat gereflecteerd meetlicht aankomt bij de detector. Aan de detector is een pulsversterker gekoppeld. Deze puls-versterker versterkt uitsluitend de fluorescentiepulsjes (>700nm) die geïnduceerd worden door het meetlicht. Dankzij de selectieve pulsversterking is het mogelijk de fluorescentiepulsjes te meten bij een ongefilterde nevenbelichting waarvan de intensiteit tot 10^7 maal zo sterk is als die van het meetlicht. Het door de detector afgegeven signaal bestaat dan wel voor een groot deel uit een vals signaal (gereflecteerd nevenlicht of fluorescentie geïnduceerd door nevenlicht). Maar omdat dit valse signaal niet gemoduleerd is, is het mogelijk dit te scheiden van het zwakke pulserende fluorescentiesignaal geïnduceerd door het meetlicht. De signaal-output van de versterker geeft uitsluitend de intensiteit van de fluorescentiepulsjes weer (figuur 24).

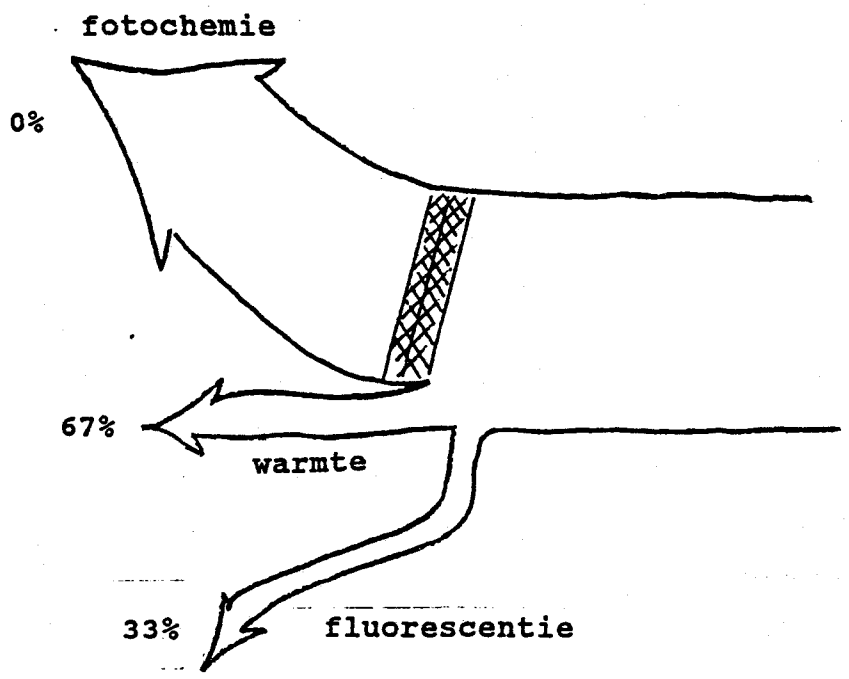
De byzondere eigenschappen van de PAM maken het mogelijk de fluorescentie-opbrengst van zwakke meetlichtpulsjes (10 mWatt/m^2) te bestuderen in afhankelijkheid van de intensiteit van de nevenbelichting. De zwakke meetpulsjes beïnvloeden de toestand van het fotosynthese apparaat nauwelijks. Ze geven echter wel informatie over de benutting van lichtenergie voor fotosynthese. Zo kan een schatting verkregen worden van :

[1] de efficiëntie waarmee lichtenergie wordt benut voor fotochemie bij een minimale belasting van de elektronen transport keten (ETK).

[2] de bezettingsgraad van de ETK in afhankelijkheid



Schema 5. Fluxen van het geabsorbeerde meetlicht bij een donker geadapteerd blad (vóór regulering) bij geen of lage intensiteit nevenbelichting.



(Fmax-Fo)/Fmax = (33-5)/33 = 85%

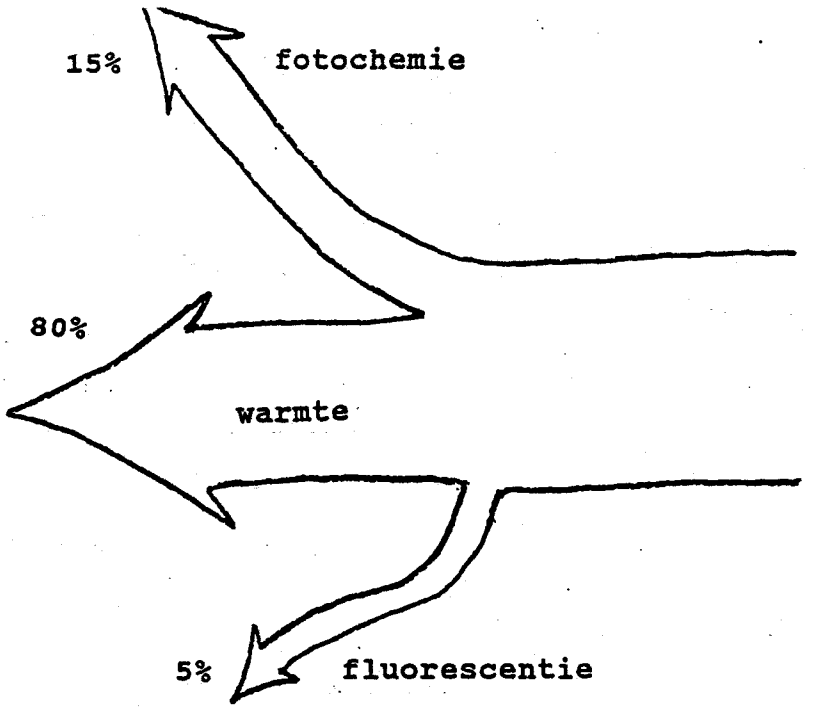
Schema 6. Fluxen van het geabsorbeerde meetlicht bij een donkergeadapteerd blad (vóór regulering) na een plotselinge verhoging van de intensiteit van de nevenbelichting tot 2000 Watt/m^2.

van de intensiteit van de nevenbelichting.

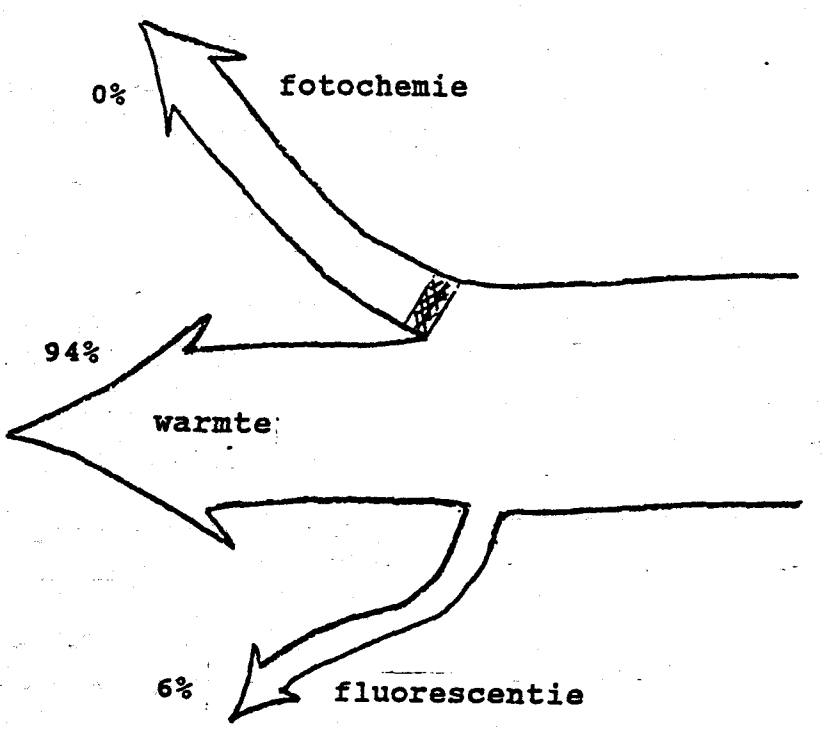
ad 1. Schatting van de lichtbenuttingsefficiëntie.

Bij een minimale belasting (lage lichtintensiteit), zal een lichtkwant na absorptie door de antenne van PSII centra, praktisch altijd in een "open" PSII reactiecentrum terecht komen. Toch treden ook dan kleine verliezen op en is de lichtbenutting geen 100%. Onder lichtbenuttingsefficiëntie verstaan we hier de kans dat een lichtkwant, na absorptie door de antenne van een "open" reactiecentrum, daadwerkelijk gebruikt wordt voor fotochemie. Wanneer de fluorescentie-opbrengst van het meetlicht wordt bepaald in afwezigheid van nevenbelichting zal de fluorescentie minimaal zijn (Fo). Dit komt omdat de benutting van het meetlicht voor fotochemie dan maximaal is omdat alle PSII centra "open" staan (schema 5). Wanneer vervolgens plotseling een verzadigende nevenbelichting aangeschakeld wordt (± 1 sec. 2000 Watt / m^2) worden alle PSII centra tijdelijk "gesloten". Het fotonen aanbod aan de PSII centra ligt dan beduidend boven de verwerkingscapaciteit. Het meetlicht wordt dan geabsorbeerd door het antennechlorofyl van "gesloten" PSII centra waardoor het niet gebruikt kan worden voor fotochemie (schema 6). De fluorescentie opbrengst van het meetlicht zal nu maximaal (Fmax) zijn. De relatieve toename van Fo naar Fmax is een maat voor de efficiëntie waarmee lichtkwanten in "open" PSII centra benut worden voor fotochemie (zie getallen voorbeeld bij schema 5 en 6). De maximale lichtbenuttingsefficiëntie bedraagt ca. 85% (Bjorkmann, 1987). Ongeveer 15% gaat verloren als warmte of fluorescentie tijdens de energie-overdracht van antennechlorofyl op de PSII centra. Deze verliezen zijn fysisch bepaald en derhalve onvermijdelijk.

De lichtbenuttingsefficiëntie is niet constant. Bij belichting van een blad treedt veelal een reguleringsmechanisme in werking welke leidt tot een toename van de omzetting van lichtenergie in warmte (schema 7). De plaats waar deze omzetting in warmte plaats



Schema 7. Fluxen van het geabsorbeerde meetlicht bij geen of lage intensiteit van de nevenbelichting, nadat o.i.v. een tijdelijke belichting het reguleringsmechanisme in werking is getreden.



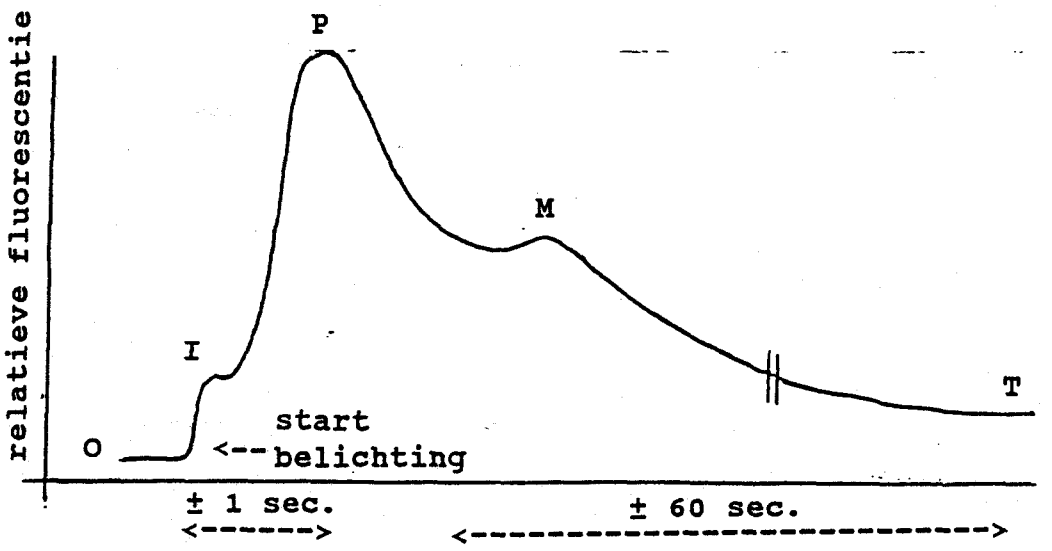
$(Fs-Fo')/Fs = (6-5)/6 = 15\%$

Schema 8. Fluxen van het geabsorbeerde meetlicht bij een plotselinge verhoging van de intensiteit van de nevenbelichting tot 2000 Watt/m^2 nadat het reguleringsmechanisme (zie schema 7) in werking is getreden.

vindt is niet geheel duidelijk. Volgens Weis en Berry (1986) zou dit plaats vinden in getransformeerde PSII centra ($PSII_e$). Getransformeerde PSII centra zouden een groot deel van de lichtenergie omzetten in warmte. Demmig, Bjorkmann en Rees (workshop fluor. Wageningen 1989) wijzen echter op een toename van de omzetting van lichtenergie in warmte in de antennepigmenten van PSII. Hoe het ook zij de toename van de omzetting van lichtenergie in warmte leidt tot een lagere lichtbenuttingsefficiëntie en tot een lagere fluorescentie-intensiteit. Evenals vóór de regulering geldt ook na regulering dat de relatieve toename van Fo naar Fmax een schatting geeft van de efficiëntie voor de benutting van lichtkwanten voor fotochemie in "open" PSII centra (zie getallen voorbeeld bij schema 7 en 8). Om de nieuwe Fo en Fmax te onderscheiden van die van vóór de regulering, worden deze aangeduid met Fo' en Fs. Fs staat voor de fluorescentie-intensiteit bij verzadigende (saturating) nevenbelichting. Fmax is een term voorbehouden aan de fluorescentie-intensiteit bij lichtverzadiging van een donkergeadapteerd blad. Bij een donkergeadapteerd blad is het reguleringsmechanisme, dat leidt tot een verhoogd verlies van lichtenergie naar warmte, uitgeschakeld. Tijdens de korte verzadigende lichtflits is de fluorescentie-intensiteit dan maximaal (Fmax). Door de lichtflits kort te houden (± 1 sec.) wordt voorkomen dat de flits zelf leidt tot verschuivingen in de regulering. Wanneer door enige tijd nevenbelichting het reguleringsmechanisme wel in werking getreden is, zal tijdens een korte verzadigende lichtflits de fluorescentie-intensiteit lager zijn dan Fmax (Fs < Fmax) (vergelijk schema 6 en 8).

ad 2. schatting van de bezettingsgraad van de ETK

Onder bezettingsgraad van de ETK wordt verstaan de gemiddelde fractie "gesloten" PSII centra. De bezettingsgraad geeft een maat voor de kans dat een lichtkwant geabsorbeerd wordt door de antenne van een "gesloten" PSII centrum. Om bij een bepaalde



Figuur 25. Fluorescentie-inductiepatroon (Kautsky-effect) bij belichting van een blad na enige tijd donkeradaptatie.

lichtintensiteit de bezettingsgraad van de ETK te bepalen wordt de fluorescentie (van het meetlicht) gemeten in drie belichtingstoestanden.

(1). in afwezigheid van nevenbelichting
(2). bij de intensiteit van nevenbelichting waarbij de bezettingsgraad van de ETK moet worden bepaald
(3). bij een zeer hoge verzadigende lichtintensiteit

In toestand (1) zal de bezettingsgraad 0% zijn en de fluorescentie-intensiteit derhalve minimaal (Fo'). In toestand (3) zal de bezettingsgraad 100% zijn en de fluorescentie-intensiteit derhalve maximaal (Fs). De bezettingsgraad in toestand (2) volgt uit het relatieve niveau van de fluorescentie (F) in toestand (2) in vergelijking tot de niveau's Fo' en Fs.

$$\text{bezettingsgraad} = (F-Fo') / (Fs-Fo')$$

3.3 Analyse van de fluorescentie inductiecurve

Wanneer een groen blad na enige tijd in het donker te zijn geplaatst (donkeradaptatie) opnieuw wordt belicht vertoont de fluorescentie opbrengst een karakteristiek inductiepatroon (figuur 25). Dit patroon, ook wel het Kautsky-effect genoemd (Kautsky en Hirsch,1931), is het gevolg van verschillende overlappende processen.
De O-I-P overgang wordt vooral beheerst door de verhouding tussen "open" (P680.Qa) en "gesloten" ($P680.Qa^-$) PSII reactiecentra. Het O-niveau komt overeen met 100% "open" PSII centra. Doordat de acceptor van PSI in het donker gedeactiveerd wordt (Schreiber en Bilger,1987) zal bij aanvang van de belichting het lineaire elektronentransport in eerste instantie stagneren. Hierdoor accumuleert de gereduceerde acceptor Qa^-. Het intermediaire plateau I

wordt verklaard door het vollopen van de plastoquinone-"pool" waardoor een tijdelijk een evenwicht kan bestaan tussen Qa^- en Qb^- :

$$Qa^-.Qb \longleftrightarrow Qa.Qb^-$$

Dit evenwicht kan bestaan zolang de plastoquinone-pool (PQ) niet volledig is gereduceerd en via Qb elektronen blijft ontrekken aan Qa^- (Schreiber en Bilger,1987). Schreiber en Bilger (1987) laten zien dat bij toevoeging van DCMU het percentage gesloten PSII centra snel toeneemt tot 100%. DCMU bindt aan de acceptorplaats van het Q_B-eiwit van PSII. Hierdoor kan PQ niet meer als elektronenacceptor optreden en accumuleert Qa^- snel zonder tijdelijk evenwicht tussen Qa^- en Qb^-. Krause en Weis (1988) laten zien dat de snelheid waarmee de PSII centra worden gesloten afhankelijk is van de lichtintensiteit. In aanwezigheid van DCMU werden bij 2.2 Watt/m^2 alle PSII centra binnen een halve seconde gesloten. Het P-niveau is afhankelijk van de lichtintensiteit. Wanneer de belichting wordt gestart met een tamelijk hoge lichtintensiteit (>100 Watt/m^2) ligt het P-niveau dicht bij het Fmax niveau.

Walker (1988) maakt duidelijk dat vanaf P t/m de steady-state-fluorescentie (T), twee fluorescentiedovingsprocessen een rol spelen. Het eerste proces hangt samen met het "open" gaan van "gesloten" PSII centra. Het opgang komen van het lineaire elektronentransport, na de aktivering van de acceptor van PSI, leidt tot de oxidatie van de PQH_2-pool en vervolgens van Qa^-. Hierdoor worden de PSII centra wederom geopend en daalt de fluorescentie. Het tweede proces welke tevens leidt tot een daling van de fluorescentie, is gerelateerd aan de ophoping van ATP en de opbouw van een sterke protonengradiënt over het thylakoïdmembraan. ATP accumuleert in eerste instantie doordat ook bepaalde enzymen van de Calvin-cyclus in het donker zijn gedeactiveerd. Het gebruik van ATP in de Calvin-cyclus loopt hierdoor

in eerste instantie achter bij de productie van ATP door de ATP-ase in het thylakoïdmembraan. Wanneer ATP accumuleert onstaat een gebrek aan ADP en P_i. De ATP-ase in het thylakoïdmembraan komt hierdoor stil te liggen waardoor geen protonen meer worden terugverplaatst van de binnen- naar de buitenkant van het membraan. Als gevolg hiervan wordt een sterke protonengradiënt over het membraan opgebouwd. De precieze oorzaak van de fluorescentiedaling door dit tweede proces is nog niet eenduidig opgehelderd. Momenteel (workshop fluor. Wag.,1989) wordt vooral gedacht aan een toename van de kans dat lichtenergie al in de antenne van PSII wordt omgezet in warmte, waardoor naast de lichtbenuttingsefficiëntie ook de fluorescentie daalt. Algemeen wordt aangenomen dat het tweede fluorescentiedovings-proces een weerspiegeling geeft van een lichtenergie-reguleringsproces in het thylakoïdmembraan. Om beschadiging van PSII centra door overtollige lichtenergie te voorkomen, wordt de omzetting lichtenergie in warmte gestimuleerd.
Tijdens de overgang van het P-niveau naar de steady-state T kunnen één of meerdere oscilaties optreden (M-pieken). De oscilaties treden op als gevolg van het complexe evenwicht dat moet worden gevonden tussen fotochemische en enzymatische reacties. Zo zal het opgang komen van de Calvin-cyclus leiden tot het verbruik van geaccumuleerde ATP, de vorming van nieuwe ATP door de ATP-ase en de afbraak van de protonengradiënt. Het reguleringsmechanisme wordt dan bijgesteld wat leidt tot een hogere lichtbenuttingsefficiëntie en een hogere fluorescentie. De hogere lichtbenuttingsefficiëntie leidt tot meer fotochemische reacties, meer protonenverplaatsing, meer ATP-productie, een grotere fractie "gesloten" PSII centra en een hogere fluorescentie. Dit kan opnieuw aanleiding zijn voor het bijstellen van het reguleringsmechanisme waardoor de fluorescentie weer daalt, etc...

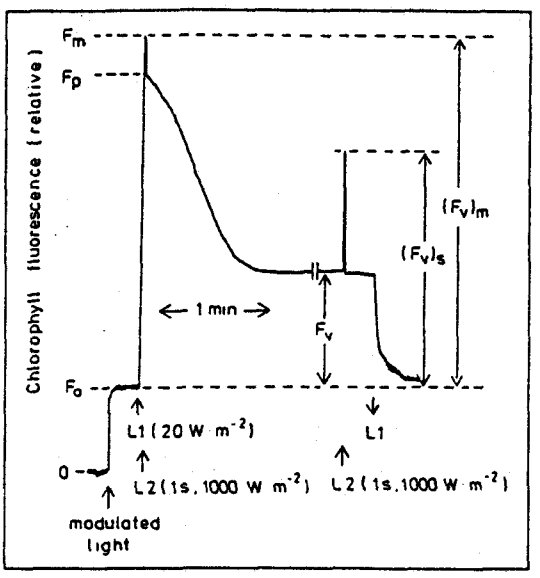


Fig. 1. Chlorophyll fluorescence recording ($\lambda > 700$ nm) of intact spinach chloroplasts excited by a weak modulated light. Non-modulated actinic light (L 1) causes a rise from initial fluorescence emission (F_o) to the peak (F_p), which is followed by slow quenching. Pulses (1 s) of saturating white light (L 2) cause full reduction of Q_A (electron acceptor of PS II) and reverse photochemical quenching (q_Q). When chloroplasts are dark-adapted, L 2 induces maximal fluorescence (F_m). The difference between F_m and the emission in L 2 after prolonged illumination with L 1 indicates non-photochemical quenching (q_N), most of which consists of energy-dependent quenching (q_E). The components of quenching are calculated as $q_E \approx q_N = [(F_v)_m - (F_v)_s]/(F_v)_m$; $q_Q = [(F_v)_s - F_v]/(F_v)_s$.

Figuur 26. Illustratie van enkele centrale begrippen bij de quenching analyse van chlorofyl fluorescentie signalen. (voor verdere details zie Engels bijschrift)

3.4 Quenching-analyse

Quenching-analyse werd geïntroduceerd door Schreiber (zie bv. Schreiber en Bilger,1987). In de quenching (doving)-analyse worden verschuivingen in de intensiteit van de fluorescentie nader geanalyseerd. Het gaat daarbij om de fluorescentie die wordt geïnduceerd door het meetlicht. Een centraal begrip bij de quenching-analyse is de variabele fluorescentie (Fv). Variabele fluorescentie is de aktuele fluorescentie (F) verminderd met Fo (Fv = F-Fo). Schreiber veronderstelde dat Fo een constante achtergrondfluorescentie is: "dead fluorescence". Het begrip variabele fluorescentie is gebaseerd op een constante Fo-waarde en geeft de fluorescentiemeeropbrengst t.o.v. Fo. Deze veronderstelling bleek niet juist, omdat ook Fo variabel is. Desondanks is de term variabele fluorescentie een basisbegrip in de quenching-analyse gebleven. Schreiber en Bilger (1987) maken onderscheid tussen Fv , $(Fv)_m$ en $(Fv)_s$ (figuur 26).

- Fv = fluorescentie bij niet verzadigend nevenbelichting verminderd met Fo.
- $(Fv)_m$ = fluorescentie bij verzadigende nevenbelichting vermindert met Fo gemeten direkt na een donkeradaptatie (vóór regulering)
- $(Fv)_s$ = fluorescentie bij verzadigende nevenbelichting vermindert met Fo na enige tijd belichting (na regulering)

Er geldt : $(Fv)_m > (Fv)_s > Fv$

De daling van $(Fv)_m$ naar $(Fv)_s$ wordt veroorzaakt door het opgang komen van reguleringsprocessen in het thylakoïdmembraan. Bij belichting treden deze processen in werking om een (tijdelijk) overschot aan lichtenergie bij PSII om te zetten in warmte. De snelheid waarmee dergelijke reguleringsprocessen optreden is

relatief laag ($T_{½}$ ≈ minuten) zodat er tijdens de korte verzadigende flitsen (≈ 1sec.) geen veranderingen plaats vinden. De doving van $(Fv)_m$ naar $(Fv)_s$ hangt niet samen met verschillen in de fractie "open" PSII centra ; immers in beide gevallen zijn alle PSII centra "gesloten" door het verzadigende flitslicht en is de kans dat lichtkwanten worden gebruikt voor fotochemische reacties nagenoeg nul. Deze vorm van fluorescentie-doving wordt daarom "non-photochemical quenching" genoemd (q_{NP}). q_{NP} is een maat voor de doving van $(Fv)_m$ tot $(Fv)_s$.

$$(Fv)_s = (Fv)_m * (1-q_{NP})$$

Non-photochemical quenching is een verzamelnaam voor, tot nu toe, drie bekende dovingsprocessen. Eén daarvan, de zogenaamde "energy quenching" (q_E), is veruit de belangrijkste. Om deze reden wordt in de literatuur geregeld gesproken over q_E terwijl men eigenlijk q_{NP} bedoelt. q_{NP} is een indirekte maat voor de verlaging (downregulering) van de lichtbenuttingsefficiëntie van "open" PSII centra. Een direkte maat werd reeds gegeven in de vorm van (Fs-Fo')/Fs.

De daling van $(Fv)_s$ naar Fv wordt veroorzaakt door de overgang van een verzadigende lichtflits naar de niet-verzadigende nevenbelichting waardoor gemiddeld weer een deel van de PSII centra geopend zal zijn. Lichtenergie geabsorbeerd door "open" PSII centra zal gebruikt kunnen worden voor fotochemie en de kans op fluorescentie zal daarom lager zijn. De doving van $(Fv)_s$ naar Fv hangt dus direkt samen met het "open" gaan van PSII centra en dus met het gebruik van lichtenergie voor fotochemie. Dit dovingsproces wordt daarom aangeduid met "photochemical quenching" (q_P). [In veel publicaties wordt deze vorm van quenching nog aangeduid met Q-quenching (q_Q). Q verwijst naar de Qa acceptor van "open" PSII centra.]. q_P is een maat voor de doving van de fluorescentie van $(Fv)_s$ tot Fv.

$$Fv = (Fv)_s * (1-q_p)$$

Anders geschreven geldt:

$$q_p = 1 - Fv/(Fv)_s = 1 - (F-Fo')/(Fs-Fo')$$

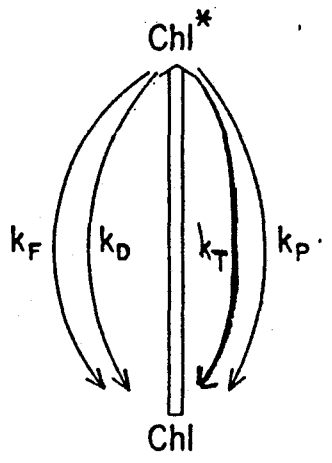
Eerder werd afgeleid dat de bezettingsgraad (=fractie "gesloten" PSII centra) wordt gegeven door (F-Fo')/(Fs-Fo'). Er volgt:

$$q_p = 1 - \text{bezettingsgraad}$$

q_p is dus een maat voor de fractie "open" PSII centra.
Door gebruik van de parameters q_{NP} en q_p wordt de daling van $(Fv)_m$ naar Fv opgesplitst in twee verschillende componenten: een niet-fotochemische $(1-q_{NP})$ en een fotochemische $(1-q_p)$.

3.5 Rekenmodellen voor fluorescentie

Het huidige inzicht in de verdeling van lichtenergie in het fotochemisch apparaat heeft geleid tot het opstellen van modellen. Het fluorescentie-onderzoek heeft hieraan een belangrijke bijdrage geleverd. De interpretatie van fluorescentiesignalen gebeurt veelal op basis van deze modellen. Dit hoofdstuk heeft tot doel een overzicht te geven van de modellen waar het meest naar verwezen wordt. Kennis van deze modellen is nodig om discussies over fluorescentie te kunnen volgen. De oorzaken van veranderingen van de fluorescentie-intensiteit zijn nog niet geheel opgehelderd. Met de modellen wordt getracht de veranderingen nader te verklaren. Vaak blijkt een model wel het één maar niet het ander te kunnen verklaren. De toepassing van de modellen geschiedt nogal eens inconsequent doordat slechts aandacht wordt besteed aan het deel van het model dat in overeenstemming is met de experimentele gegevens.



Figuur 27. Schematische weergave van het mono-partite model.

3.5.1 Model-1 "mono-partite model"

Dit is het meest eenvoudige model. Het model beschouwt het chlorofyl van de PSII centra (LHCII, "kern"-antenne, reactie-centrum chlorofyl) als één geheel. Lichtenergie ingevangen door het chlorofyl van PSII kan omgezet worden in fotochemie (k_P), warmte (k_D), fluorescentie (k_F) of overgedragen worden naar het antenne chlorofyl van PSI (k_T). Deze laatste mogelijkheid wordt ook wel aangeduid met "spill-over". Het geheel is schematisch weergegeven in figuur 27. Overdracht van energie tussen PSII centra wordt uitgesloten. "Open" PSII centra met geoxideerde Qa-acceptoren kunnen lichtenergie omzetten in fotochemie en de kans op fluorescentie (Φ_F) is gering omdat $k_P >> k_F$.

$$\Phi_F = k_F/(k_F+k_D+k_T+k_P)$$

"Gesloten" PSII centra met gereduceerde Qa^- acceptoren kunnen lichtenergie niet meer omzetten in fotochemie ($k_P=0$) en de kans op fluorescentie is dan maximaal:

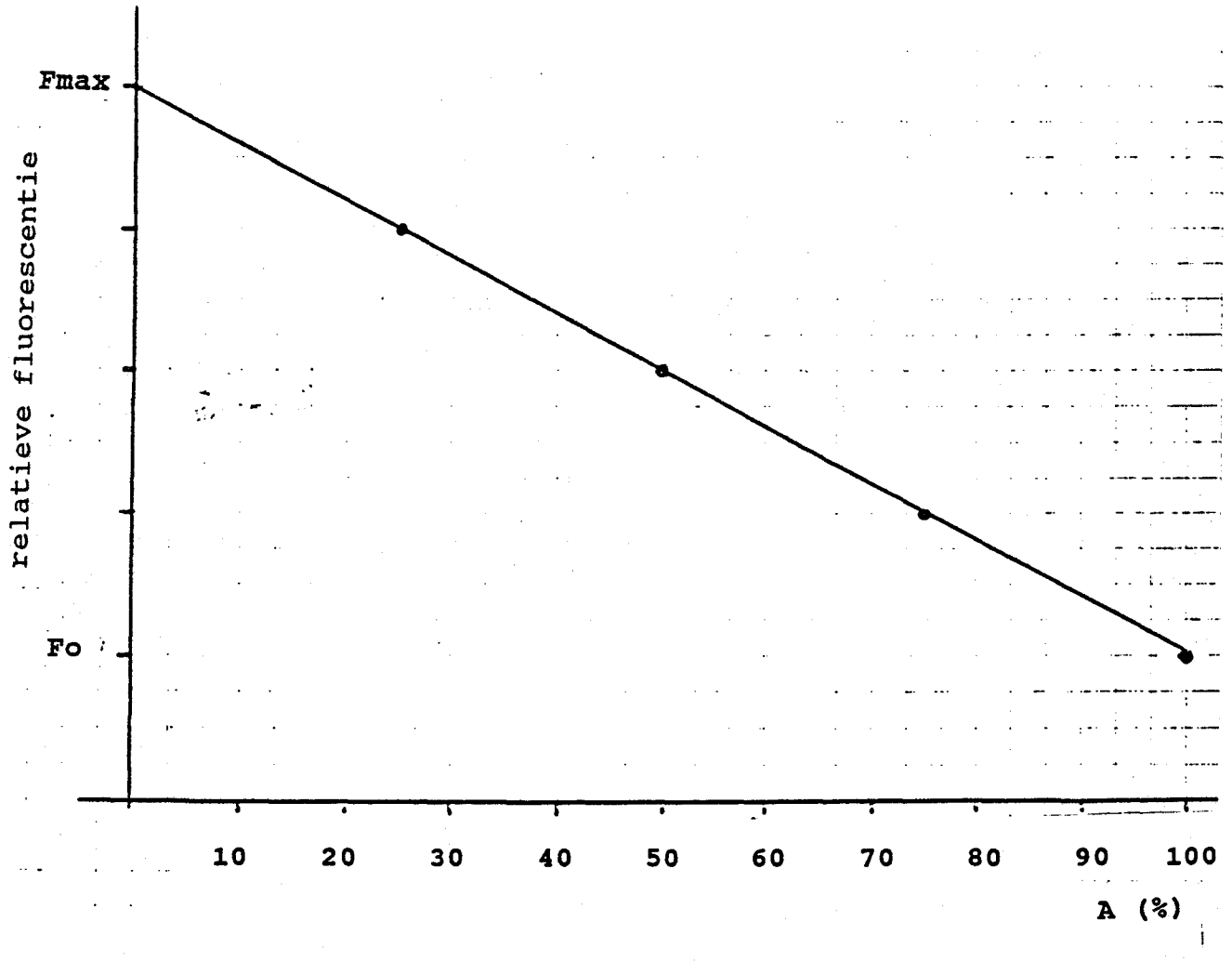
$$\Phi_F = kF/(k_F+k_D+k_T)$$

De overall kans dat een lichtkwant na absorptie door een blad weer wordt uitgestraald als fluorescentielicht is een lineaire functie van de fractie "open" PSII centra (A) en wordt gegeven door:

$$\Phi F = A * \{k_F/(k_F+k_{DT}+k_P)\} + (1-A) * \{k_F/(k_F+k_{DT})\}$$

Hierin is : A = de fractie "open" PSII centra.
$k_{DT} = k_D + k_T$

Ook de intensiteit van de fluorescentie is een lineaire functie



Figuur 28. Berekende relatieve fluorescentie intensiteit geïnduceerd door het meetlicht in afhankelijkheid van het percentage open PSII eenheden. (geldt voor het mono-partite en voor het 'separate-package' model)

van A (figuur 28) en wordt gegeven door :

$$F = \Phi_F * Ia$$

Hierin is : Φ_F = de kans dat een geabsorbeerd lichtkwant weer wordt uitgestraald als fluorescentielicht
Ia = de intensiteit van het geabsorbeerde meetlicht (μmol fotonen.m^{-2}.sec^{-1})

De fluorescentie-intensiteit is maximaal (Fmax) wanneer alle PSII centra "gesloten" zijn (A=0) :

$$Fmax = k_F/(k_F+k_{DT}) * Ia$$

De fluorescentie is minimaal (Fo) wanneer alle PSII centra "open" zijn (A=1) :

$$Fo = k_F/(k_F+k_{DT}+k_P) * Ia$$

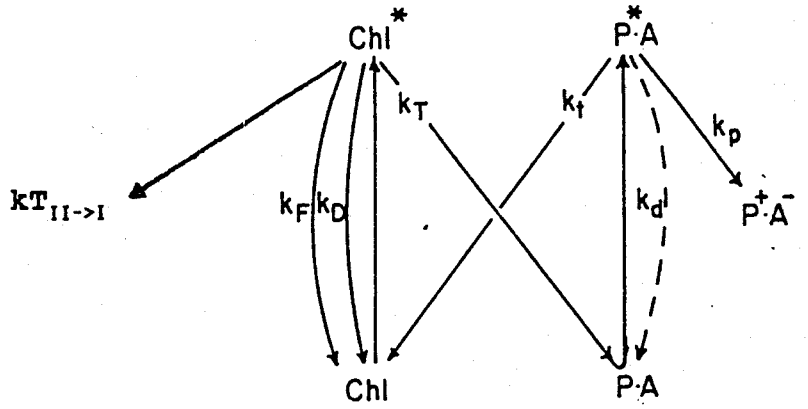
De kans dat een lichtkwant, na absorptie door een "open" PSII centrum, gebruikt wordt voor fotochemie wordt gegeven door :

$$\Phi_P = k_P/(k_F+k_{DT}+k_P)$$

Er kan eenvoudig worden afgeleid dat geldt:

$$\Phi_P = (Fmax-Fo)/Fmax$$

De relatieve verhoging van Fo naar Fmax is dus een maat voor de lichtbenuttingsefficiëntie van "open" PSII centra. Dit werd ook gevonden op basis van het getallen voorbeeld bij schema 5 en 6 en bij schema 7 en 8. (literatuur : Krause en Weis,1984; Krause en Weis,1988; Bjorkmann,1987)



Figuur 29. Schematische weergave van het bi-partite model. (uit: Butler,1978)

3.5.2 Model-2 "bi-partite model"

Butler (1978) stelde een meer gedetailleerd model op voor de energieverdeling binnen het fotochemisch-apparaat. Dit model staat bekend als het bi-partite model van Butler en Kitajima. De verfijning van dit model t.o.v. het mono-partite model is dat het antenne-chlorofyl (LHCII + "kern"-antenne) en het reactiecentrum chlorofyl P680 niet als één geheel worden gemodelleerd.
Het model is geschematiseerd in figuur 29. De symbolen in deze figuur staan voor :

P.A.	: reactiecentrum P680 van PSII + acceptor Qa
$P^*.A$	: aangeslagen reactiecentrum P680 + acceptor Qa
$P^+.A^-$	: geoxideerd reactiecentrum $P680^+$ + gereduceerde acceptor Qa^-
Chl	: antennechlorofyl (LHCII + "kern"-antenne)
$kT_{II->I}$	: reactieconstante voor spill-over van PSII naar PSI
k_T	: reactieconstante voor energieoverdracht van de antenne naar het reactiecentrum
k_t	: reactieconstante voor het terugspoelen van energie van het reactiecentrum naar de antenne
k_d	: reactieconstante voor warmteverlies bij het reactiecentrum
k_p	: reactieconstante voor fotochemie bij het reactiecentrum
k_F, k_D	: reactieconstante voor fluorescentie en warmteverlies in de antenne pool

Butler (1978) geeft twee versies van het bi-partite model :

[1] Het "separate-package" model gaat uit van gescheiden PSII

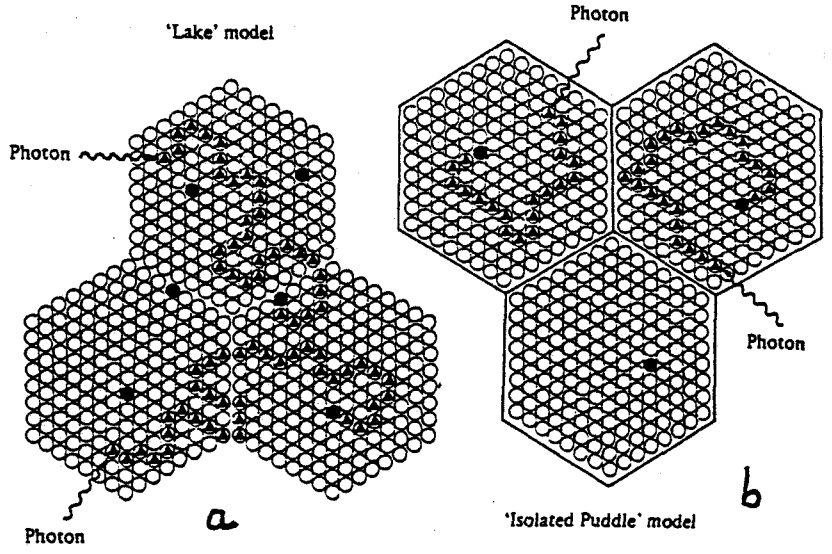
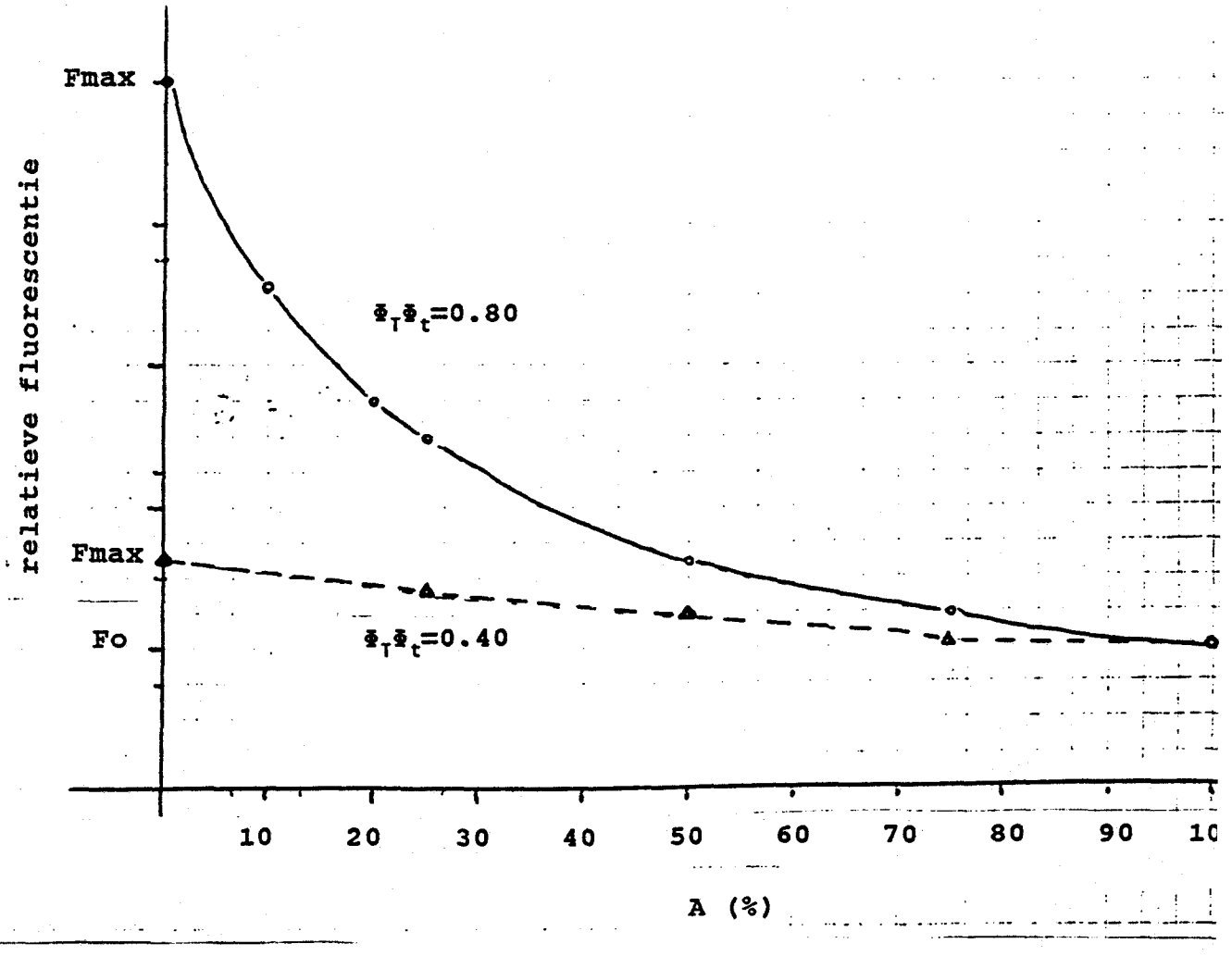


Fig. 5.17a. 'Lake' and 'Isolated Puddle' models of excitation energy flow in photosynthetic pigment systems.
○ = antenna pigment.
● = P700 or P680 at the reaction centre.
◉ = antenna pigment molecule in an excited state having received a quantum of energy by absorption of a photon or by energy transfer.

Figuur 30. Schematische weergave van [a] het 'matrix' (lake) model en [b] het 'separate-package' (isolated puddle) model. (uit: Goodwin en Mercer,1983)



Figuur 31. Berekende relatieve fluorescentie intensiteit geïnduceerd door het meetlicht in afhankelijkheid van het percentage open PSII eenheden (geldt alleen voor het 'matrix' model; [1] $\Phi_T\Phi_t$=0.80 ; [2] $\Phi_T\Phi_t$=0.40)

centra. Als een reactiecentrum gesloten is zal een foton in zo'n eenheid (antenne + reactiecentrum) blijven circuleren totdat omzetting in warmte, fluorescentie of spill-over naar PSI is opgetreden (figuur 30 b).
[2] Het "matrix-model" gaat uit van onderlinge samenhang tussen PSII centra. Als een reactiecentrum gesloten is kan een foton na terug vloeien in de antenne op zoek gaan naar een ander "open" reactiecentrum. Het foton blijft in de matrix rond circuleren totdat omzetting in warmte, fluorescentie, fotochemie in een "open" reactiecentrum, of spill-over naar PSI optreedt (figuur 30 a).

Butler veronderstelt dat $k_p >> k_t >> k_d$. Voor beide versies van het bi-partite model geldt dan :

$$Fo = k_F/(k_F+k_D+k_T+kT_{II->I}) * Ia$$

$$Fmax = Fo/(1-\Phi_T\Phi_t) \quad \text{met } \Phi_T = k_T/(k_F+k_D+kT_{II->I}+kT)$$
$$\Phi_t = k_t/(k_t+k_d)$$

$$(Fv)_m/Fm = (Fmax-Fo)/Fmax = \Phi_T\Phi_t$$

$$\Phi_p = \Phi_T$$

Bij onbeschadigde PSII centra veronderstelt Butler dat geldt: $\Phi_t \approx 1$. De verhouding $(Fv)_m/Fm$ levert dan net als bij het mono-partite model een schatting voor Φ_p.
Voor het "separate package" model geldt net als bij het mono-partite model een lineaire relatie tussen de fluorescentie-intensiteit (F) en de fractie "open" PSII centra (A) :

$$F = Fo * \{ 1 + [(1-A) * \Phi_T\Phi_t/(1-\Phi_T\Phi_t)] \}$$

Voor het "matrix" model is de relatie tussen de fluorescentie intensiteit (figuur 31) en de fractie "open" PSII centra (A) niet lineair :

$$F = Fo * \{ 1 / (1 - \Phi_T\Phi_t * (1-A) \}$$

Deze non-lineariteit tussen fluorescentie en de fractie "open" PSII centra neemt toe naarmate de koppeling tussen PSII centra en antenne nauwer is (hogere waarde voor $\Phi_T\Phi_t$). Metingen van $(Fv)_m/Fm$ ($=\Phi_T\Phi_t$) aan onbeschadigde bladeren leveren een gemiddelde waarde op van 0.80. De relatie tussen de fractie "open" PSII centra (A) en de intensiteit van de fluorescentie is dan duidelijk afwijkend van lineair.
In de geraadpleegde literatuur wordt niet duidelijk in hoeverre energie overdracht tussen PSII centra plaats vindt. Butler (1978) geeft wel schattingen voor energie-overdracht (spill-over) van PSII naar PSI. Dit zou ca 7% zijn bij "open" PSII centra (A=1) en 23% bij gesloten PSII centra (A=0). Omdat spill-over naar PSI optreedt is energie-overdracht tussen PSII centra onderling ook aannemelijk. Temeer omdat de PSII centra nauw gegroepeerd zijn in de grana.

Met het bi-partite model is het mogelijk om een toename van de kans op omzetting van lichtenergie in warmte, te verklaren met een toename van k_D (in de antenne) of met een toename van k_d (in de reactiecentra). Volgens Weis en Berry (1987) leidt energetisatie van het thylakoïdmembraan (opbouw van een protonengradiënt, accumulatie van ATP) tot conformatie-veranderingen in de reactiecentra van PSII. In getransformeerde PSII centra ($PSII_e$) zou k_d sterk toenemen. De kans dat een lichtkwant in het reactiecentrum wordt omgezet in warmte neemt dan sterk toe ten koste van het gebruik voor fotochemie. Een grotere waarde voor k_d verlaagt de lichtbenuttingsefficiëntie en verlaagt tevens Φ_t. Uit de vergelijkingen voor Fo en Fmax blijkt dat een verlaging van Φ_t geen effect heeft op Fo maar wel leidt tot een daling van Fmax. Het bi-partite model kan hiermee een verklaring geven voor het dalen van Fmax zonder daling in Fo. Dit wordt bij sommige gewassen gevonden.

3.6 Interpretatie van fluorescentie-parameters

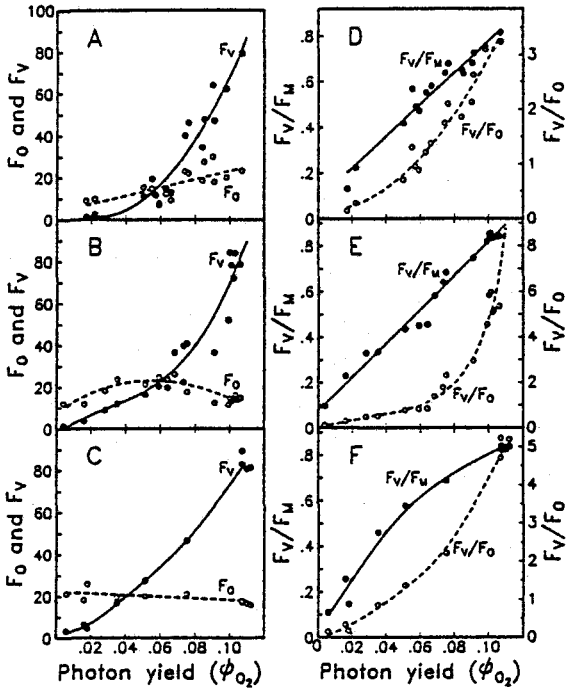
In dit hoofdstuk wordt nagegaan wat de betekenis is van bepaalde parameters en in hoevere dit overeenstemt met experimentele resultaten.

3.6.1 $(Fv)_m/Fm$

$(Fv)_m/Fm$ levert bij alle typen modellen een schatting van de kans op fotochemie in "open" PSII centra (Φ_p). Alleen geldt bij het bi-partite model dat $\Phi_t \approx 1$ moet zijn. Bjorkmann (1987) relateerde fluorescentiemetingen aan gasuitwisselingsmetingen. Bij verschillende soorten planten bepaalde hij zowel $(Fv)_m/Fm$ als het kwantenrendement voor O_2-productie (Φ_{O2}). Gemiddeld was de bij C_3-planten voorspelde Φ_p van "open" PSII centra via $(Fv)_m/Fm = 0.81$. Het gemeten kwantenrendement voor O_2-productie bedroeg bij C_3-planten gemiddeld 0.10. De theoretische maximumwaarde voor het kwantenrendement bedraagt 0.125 (1 mol O_2 per 8 mol kwanten; per mol vrijgekomen O_2 zijn vier elektronen getransporteerd van water naar $NADP^+$ en daar zijn in de ETK per fotosysteem minimaal vier lichtkwanten voor nodig). Bij het theoretisch maximum wordt uitgegaan van een lichtbenuttingsefficiëntie door "open" PSII centra van 100% ($\Phi_p=1$). Het verschil tussen de theoretische maximumwaarde en de gemeten waarde is goed te verklaren met de geschatte werkelijke $\Phi_p=0.81$.

gemeten Φ_{O2} = theor.maximum * werkelijke Φ_p = 0.125 * 0.81 = 0.10

Bij C_4-planten ligt het maximale kwantenrendement voor O_2 productie beduidend lager dan 0.125 (Bjorkmann,1987 ; Genty et al, 1989). Bjorkmann geeft een gemeten waarde van $\Phi_{O2}=0.069$ bij een waarde voor $(Fv)_m/Fm=0.825$. Toepassing van de hierboven gegeven



Figuur 32. Relatie tussen het gemeten kwantenrendement voor O_2-productie (Φ_{O2}) en diverse fluorescentie grootheden bij drie plantensoorten. A,D=Rhiziphora stylosa; B,E=Hedera canariensis; C,F=Gossypium hirsutum. (met Fv wordt $(Fv)_m$ bedoeld) (uit: Bjorkmann,1987)

vergelijking levert een schatting voor de theoretische maximumwaarde voor Φ_{O2}.

gemeten Φ_{O2} = theor.maximum * werkelijke Φ_P
0.069 = theor.maximum * 0.825
theor.maximum = 0.084 mol O_2 per mol fotonen
= 1 mol O_2 per 12 mol fotonen.

Uit de biochemie is bekend dat het C_4-metabolisme extra ATP vereist. Deze extra ATP wordt geproduceerd door cyclisch elektronentransport rond PSI en cyt b/f. De hiervoor benodigde lichtkwanten verlagen het kwantenrendement voor O_2 productie.
Mits de juiste waarde voor het theor. maximale kwantenrendement wordt gebruikt, kan ook bij C_4-planten het kwantenrendement voor O_2-productie voorspeld worden m.b.v. $(Fv)_m/Fm$ (Genty et al,1989).

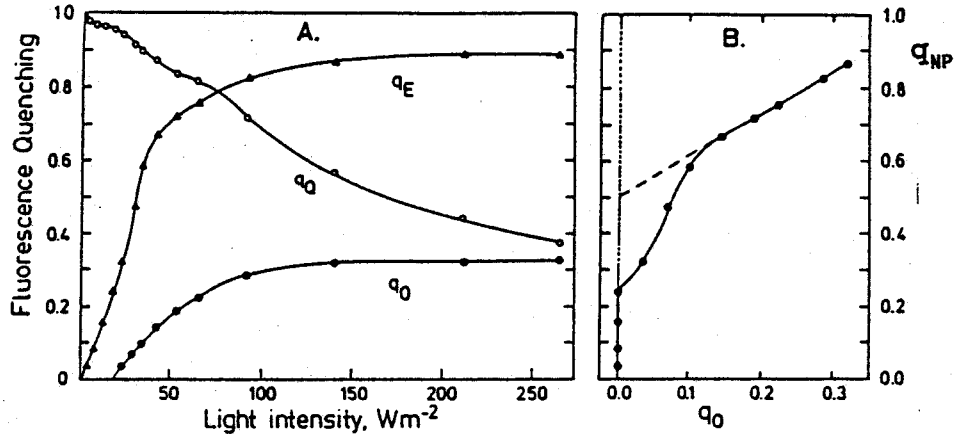
Bjorkmann (1987) vond een nagenoeg lineaire relatie tussen $(Fv)_m/Fm$ en gemeten het gemeten kwantenrendement voor O_2 productie (Φ_{O2}) bij drie soorten (figuur 32 D,E,F). Variatie in Φ_{O2} werd bewerkstelligd door een voorbehandeling met overmatig licht. Overmatig licht leidt tot beschadiging (fotoinhibitie) van PSII centra waardoor Φ_{O2} wordt verlaagd.

Bovenstaande gegevens bevestigen de voorspelde relatie tussen $(Fv)_m/Fm$ en Φ_P van "open" PSII centra.

3.6.2 q_P

Zowel het mono- als het bi-partite model voorspellen een relatie tussen q_P en de fractie "open" PSII centra (A). M.u.v. het "matrix" model is deze lineair in A (figuur 28 en 31). Er kan gemakkelijk worden afgeleid dat voor het mono-partite en "separate-package" bi-partite model geldt dat:

$$q_P = (Fs-F)/(Fs-Fo') = A$$



Figuur 33. Quenching coefficiënten in afhankelijkheid van de lichtintensiteit bij afwezigheid van CO_2.
[A] steady-state q_P (q_Q), q_{NP} (q_E) en q_o uitgezet tegen de lichtintensiteit. [B] q_o uitgezet tegen q_{NP} (q_E)
(uit: Bilger en Schreiber,1986)

en voor het "matrix" bi-partite model :

$$q_p = (Fs-F)/(Fs-Fo') = A / (1 - \Phi_T\Phi_t(1-A))$$

Voorwaarde voor deze afleiding is dat F, Fs en Fo betrekking hebben op dezelfde toestand van het blad. Dus niet de Fo-waarde behorende bij de donker-geadapteerde situatie gebruiken voor de berekening van q_p na enige tijd belichting. Om in een bepaalde situatie q_p te kunnen bepalen moeten F, Fs en Fo' ook in die situatie worden gemeten. Dit bemoeilijkt de correcte schatting van q_p in overgangssituaties. Vaak wordt hiervoor dan toch de Fo uit de donker-geadapteerde situatie gebruikt (Schreiber en Bilger, 1987). De veronderstelling is dan dat Fo in de overgangssituatie weinig verandert,wat niet erg waarschijnlijk is (O. van Kooten,pers. mededeling).

Bilger en Schreiber (1986) bepaalden Fo in de donkergeadapteerde toestand (Fo) en Fo na enige tijd belichting (Fo'). Veranderingen in Fo drukten zij uit in qo = (Fo-Fo')/Fo. Bij Phaseolus vulgaris en Vicia faba vonden zij zelfs onder condities waarbij Fs beduidend lager was dan Fmax (hoge waarde voor q_{NP}) geen verandering in Fo. Echter bij Arbutus unedo was Fo' verlaagd t.o.v. Fo zodra q_{NP} groter was dan 0.30. Maximaal werd een qo gevonden van 0.35 (figuur 33). Verlaging van Fo' t.o.v. Fo staat wel bekend als Fo-doving (Fo-quenching). Ook Demmig,Bjorkmann en Rees (fluor. workshop Wag.,1989) vonden een t.o.v. Fo verlaagde Fo' bij hoge waarden voor q_{NP}.

Haalstra (1988,ongepubliceerd) vond bij maïs dat na enige belichting bij lage intensiteit (15 W/m^2) Fo' stijgt t.o.v. de Fo in de donkergeadapteerde toestand. Vergelijkbare waarnemingen zijn gedaan door v. Kooten (1988, pers. mededeling).

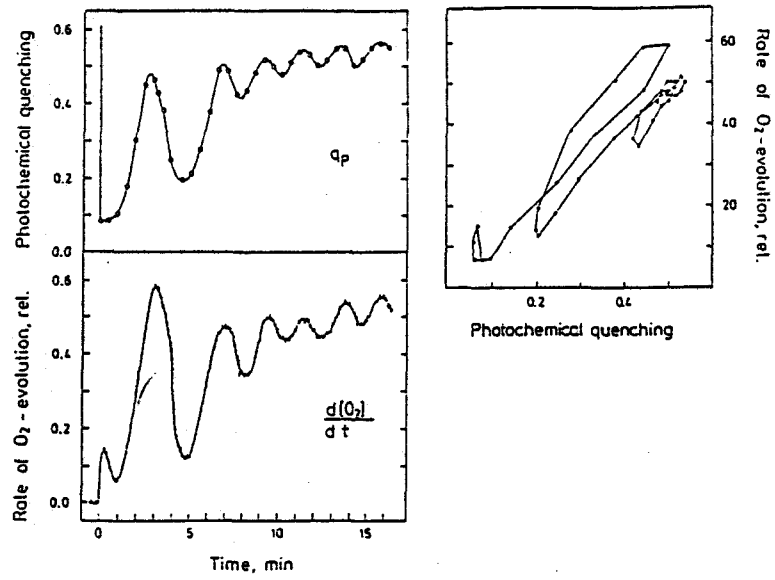


FIGURE 3 Comparison of photochemical quenching and the rate of O_2-evolution during induction of photosynthesis in barley. Simultaneous measurement of fluorescence and O_2 in a modified Hansatech leaf disc electrode. q_P was determined by repetitive application of saturation pulses. dO_2/dt was obtained by analog differentiating circuitry. In the plot of q_P vs. dO_2/dt each point corresponds to a saturation pulse, with consecutive points being connected. At time zero, continuous illumination with 150 W/m² white light was started; saturation pulses (2000 W/m²) were applied every 30 s. Temperature, 15°C; saturating CO_2.

Figuur 34. Het verloop van q_P en de O_2-productiesnelheid tijdens de inductie van de fotosynthese bij een overgang van donker naar licht (150 $W.m^{-2}$). (uit: Schreiber et al,1988)

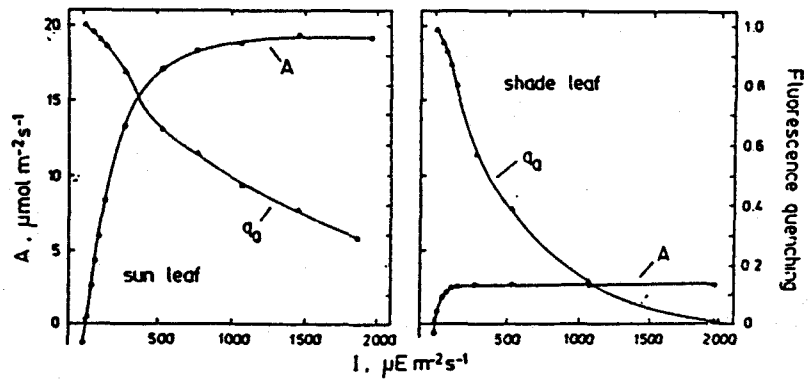


Fig. 7 Comparison of the light saturation curves of Q-quenching and assimilation rate in sun and shade leaves of Arbutus unedo. Fluorescence and CO_2 fixation were measured simultaneously (see Fig. 6). At each light intensity, measurements were carried out after attainment of steady state conditions. Leaf temperature: 22°C; 350 µbar CO_2 and 21 % O_2; 10 mbar/bar. The sun plant was grown outdoors under conditions of full sunlight and with high N_2-supply, while the shade plant was grown at approx 200 µE/m² s.

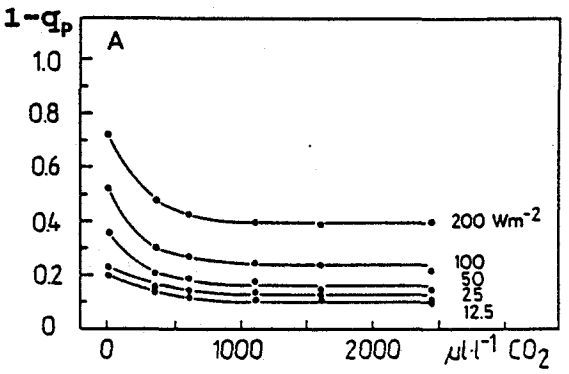
Figuur 35. Lichtrespons curven van q_P (q_Q) en van de assimilatie snelheid [A] bij een zonne- en [B] bij een schaduwblad van Arbutus unedo. (uit: Schreiber en Bilger,1987)

De veronderstelling dat Fo betrekkelijk constant is, is dus afhankelijk van de plantensoort en van de condities waaronder metingen worden verricht. Om deze complicaties met Fo' te omzeilen worden tegenwoordig de bepalingen van F,Fs en Fo' uitgevoerd onder steady state condities. Steady state wordt bereikt door adaptatie (15 á 45 minuten) van een blad bij constante condities. Op deze manier wordt een nauwkeurige schatting verkregen van de bij die condities behorende F, Fs en Fo', zodat hieruit op een correcte wijze q_p kan worden berekend.

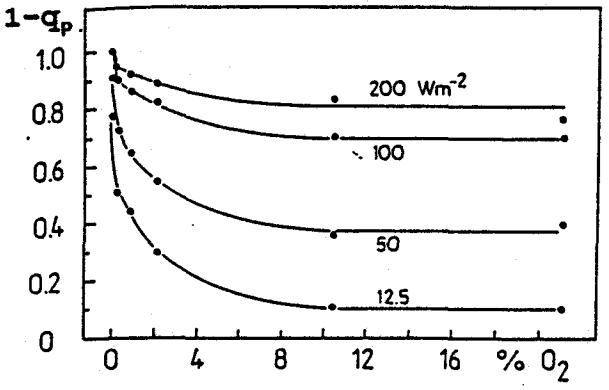
Schreiber et al (1988) relateren bij tarwe het verloop van q_p aan de O_2 productiesnelheid tijdens een overgang van donker naar licht (150 W/m^2). Hoge waarden voor q_p duiden op een goed verlopend elektronentransport (geen ophoping van "gesloten" PSII centra) terwijl lage waarden voor q_p duiden op een stagnerend elektronentransport. Bij de donker naar licht overgang treden oscillaties op in q_p. Deze oscillaties blijken goed te correleren met oscillaties in de snelheid van O_2 productie (figuur 34).

Schreiber en Bilger (1987) laten zien dat q_p daalt bij een hogere lichtintensiteit. (figuur 35). De respons van q_p op de lichtintensiteit verschilde duidelijk tussen een zonne- en schaduwblad. Ook Dietz et al (1985) vinden dit verschil tussen zonne- en schaduwbladeren. De daling van q_p geeft aan dat bij verhoging van de lichtintensiteit het aanbod van fotonen groter is dan de verwerkingscapaciteit.
Verzadiging van de assimilatie werd echter al bereikt bij een q_p beduidend groter dan nul. Dit wijst erop dat de capaciteit van de elektronentransportketen normaliter niet de capaciteit van de assimilatie bepaald. Het verschil tussen zonne- en schaduwbladeren, geeft aan dat de capaciteit van de elektronentransportketen wel is afgestemd op de assimilatiecapaciteit van het blad.

q_p is afhankelijk van de CO_2 concentratie in de lucht rondom een



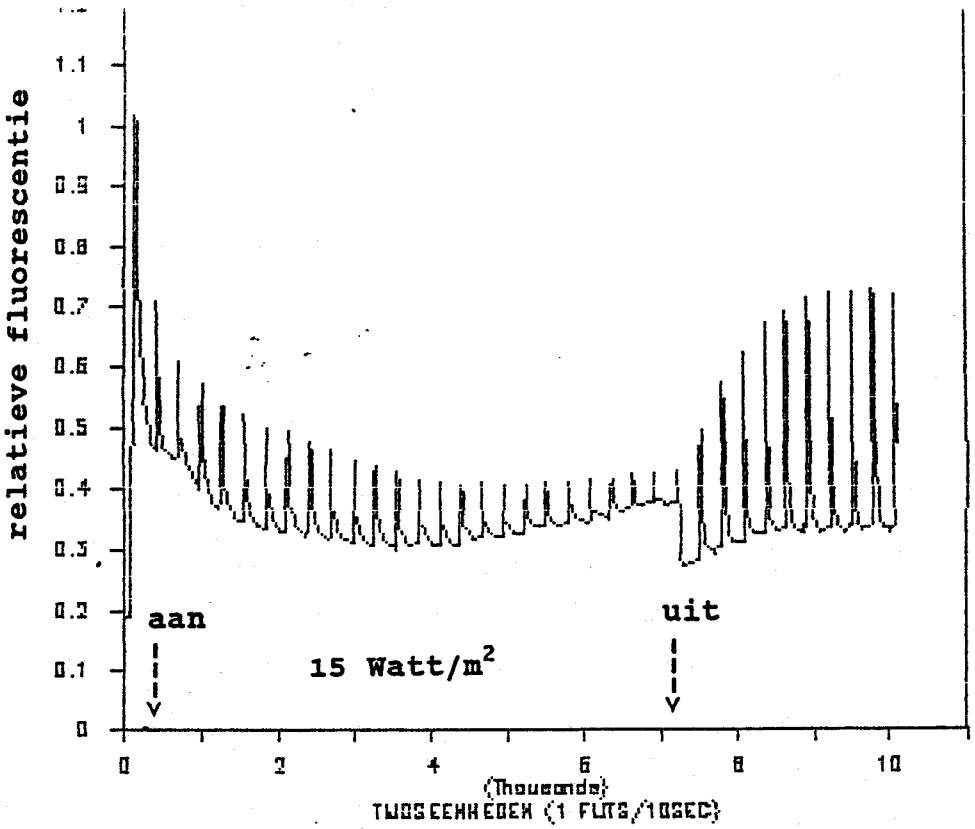
Figuur 36. Afhankelijkheid van q_p van de CO_2-concentratie bij verschillende lichtsterkten bij spinazie bladeren.
(uit: Dietz et al,1985)



Figuur 37. Afhankelijkheid van q_p van de O_2-concentratie bij afwezigheid van CO_2 bij verschillende lichtsterkten.
(uit: Dietz et al,1985)

blad (Dietz et al,1985). Verlaging van de CO_2 concentratie beneden de 600 ppm leidde bij spinazie bladeren tot een daling van q_p (figuur 36). Dit effect was het grootst bij een hoge lichtintensiteit. Boven de 600 ppm was er geen effect van de CO_2 concentratie op q_p. Bij lage CO_2 concentraties en hoge lichtintensiteit accumuleren NADPH en ATP door een gebrek aan substraat (CO_2) voor de Calvin-cyclus. Ook de ATP-synthese zal vervolgens stagneren door gebrek aan ADP waardoor de pH-gradiënt over het thylakoïdmembraan sterk zal toenemen. Bij oxidatie van PQH_2 bij cyt b/f worden nog meer protonen aan deze gradiënt toegevoegd. Volgens Dietz kan een al aanwezige sterke pH-gradiënt het elektronentransport remmen door belemmering van de oxidatie van PQH_2. Tegen deze hypothese pleit het effect van toevoeging van methyl-viologen op q_p. Methyl-viologen treedt op als kunstmatige elektronenacceptor van PSI en concurreert als zodanig met $NADP^+$. Hierdoor wordt de reductie van $NADP^+$ voorkomen zonder belemmering van het elektronentransport in de ETK. Het tekort aan NADPH dat ontstaat remt de Calvin-cyclus waardoor ATP accumuleert en een sterke pH-gradiënt wordt opgebouwd. Ondanks de hoge pH-gradiënt blijkt q_p weinig verlaagd (q_p=0.7) (zie figuur 42c). De koppeling tussen q_p en de pH-gradiënt is kennelijk minder sterk dan door Dietz wordt gesuggereerd. Een meer aannemelijke verklaring voor de verlaging van q_p bij lage CO_2 concentratie is de accumulatie van NADPH. Hierdoor ontstaat een tekort aan de acceptor $NADP^+$ waardoor het elektronentransport stagneert en "gesloten" PSII centra accumuleren.

Bij 0 ppm CO_2 is zelfs bij hoge lichtintensiteit het elektronentransport niet volledig verzadigd (q_p>0). De reden hiervoor is het optreden van fotorespiratie en de Mehler-reactie in aanwezigheid van O_2. Bij fotorespiratie wordt ribulose 1,5 bifosfaat door O_2 geoxideerd. Fotorespiratie kost ATP en NADPH waardoor een deel van het elektronentransport op gang blijft. Bij de Mehler-reactie treedt O_2 i.p.v. $NADP^+$ op als acceptor van PSI. De Mehler-reactie



Figuur 38. Inductiekinetiek van de fluorescentie bij maïs in afwezigheid van CO_2 en O_2 (lichtsterkte=15 Watt/m^2). (flitsfrequentie=0.10hz; nevenbelichting gaat uit na de 25^e flits) Duidelijk is de stijging van de fluorescentie (F) (vanaf de 15^e flits) door ophoping van "gesloten" PSII centra. (let wel! de figuur is een weergave van het meetsignaal zelf, dus niet van q_p).

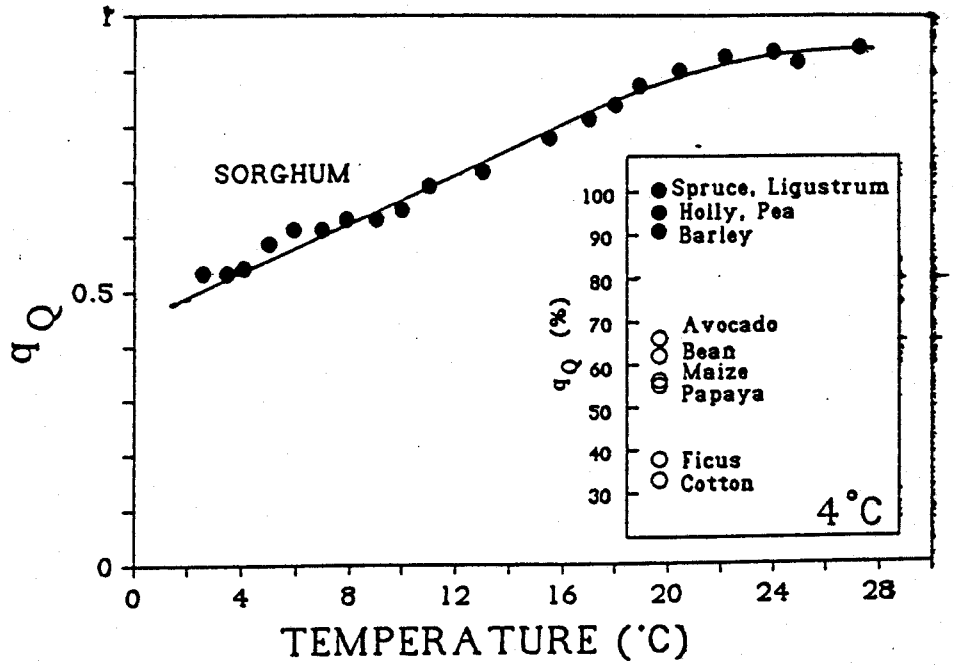


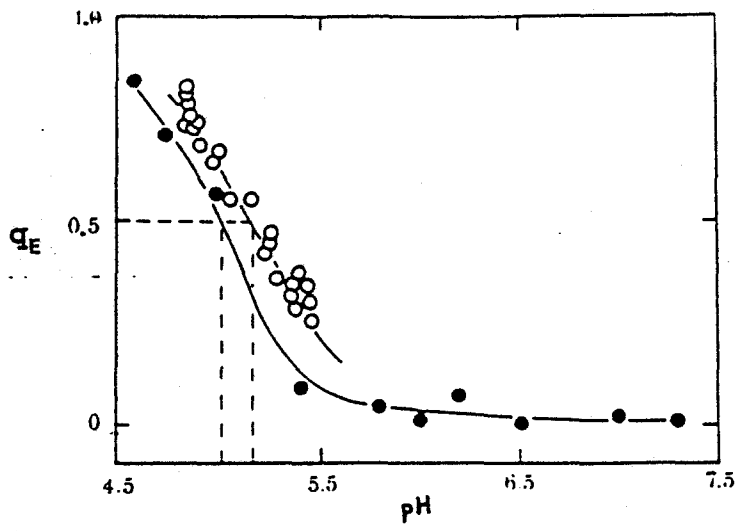
Fig. 2. Effect of temperature on the photochemical quenching q_Q of steady-state chlorophyll fluorescence in sweet sorghum leaves (genotype 'ZH 1012'). Photon flux density of L_2: 220 µmol m^{-2} s^{-1}. Insert: the inhibition of q_Q at 4 °C is shown for a series of chilling-sensitive (○) and resistant (●) plant species

Figuur 39. Effect van de temperatuur op de steady state waarde van q_p bij sorghum. (inzet= q_p bij 4°C als percentage van q_p bij 25°C bij verschillende plantensoorten) (uit: Havaux,1989)

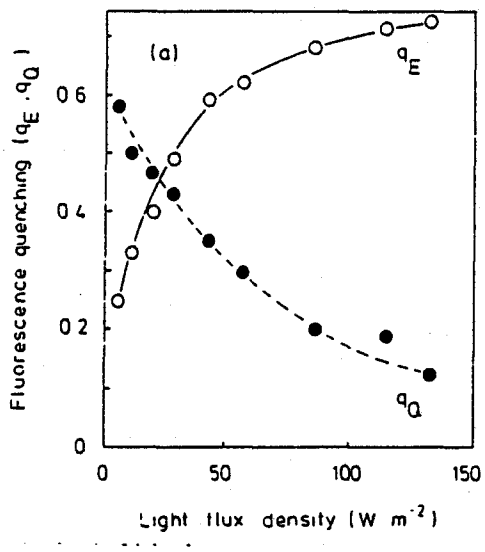
staat ook wel bekend als pseudo-cyclisch elektronentransport (O_2 komt vrij bij de watersplitsing maar wordt weer gebruikt bij PSI). Bij lage O_2 concentraties daalt de fotorespiratie en neemt q_p af. Bij 0 ppm CO_2 en 0% O_2 is bij hoge lichtintensiteit q_p=0 (figuur 37). Haalstra (1988,ongepubliceerd) vond een vergelijkbare reactie van q_p op CO_2 en O_2 condities. Verwijdering van CO_2 en O2 uit de gasfase leidde bij 15 W/m^2, na uitputting van de interne voorraad CO_2 en O2 in het blad, tot een geleidelijke afname van q_p (figuur 38).

q_p is afhankelijk van de bladtemperatuur. Met name bij warmte minnende gewassen (maïs, katoen ,sorghum) neemt q_p af bij verlaging van de temperatuur (figuur 39). De afname van q_p wordt mogelijk veroorzaakt door de vertraagde diffusie van plastoquinone in het thylakoïdmembraan. Interessant gegeven is dat de temperatuurrespons van q_p varieert tussen koudetolerante en koudegevoelige soorten en dat er ook binnen koudegevoelige soorten een aanzienlijke genetische variatie voor dit kenmerk bestaat (Havaux,1989). Hieraan wordt in een later hoofdstuk meer aandacht besteed.

De respons van q_p op factoren als lichtintensiteit, CO2- en O_2-concentratie en temperatuur is in overeenstemming met de verwachte relatie tussen de fractie "open" PSII centra en deze factoren. Het is niet duidelijk of het verband tussen q_p en de fractie "open" PSII centra lineair is. Eventuele niet-lineariteit wordt veroorzaakt door energie overdracht van een "gesloten" naar een "open" PSII centrum ("matrix" model). Bij een niet-lineair verband levert q_p een overschatting van de fractie "open" PSII centra. Bij energie overdracht tussen PSII centra is echter ook de kans dat een lichtkwant uiteindelijk aankomt in een "open" PSII centrum groter dan wordt gegeven door de fractie "open" PSII centra. q_p geeft daarom onafhankelijk van het wel of niet optreden van energie-overdracht tussen PSII centra een juiste



Figuur 40. Relatie tussen q_E en de pH in het thylakoïd lumen (open symbolen) en met de pH in het medium (gesloten symbolen). (uit: Weis en Lechtenberg,1989)



Figuur 41. [a] lichtrespons-curven voor de steady state waarden van $q_P(q_Q)$ en $q_{NP}(q_E)$ (uit: Krause en Laasch,1987)

schatting van de kans dat een lichtkwant verwerkt wordt in een "open" PSII centrum.

(**N.B.**: De over-all lichtbenuttingsefficiëntie hangt niet alleen af van de kans dat een lichtkwant aankomt in een "open" PSII centrum, maar is tevens afhankelijk van de efficiëntie waarmee een lichtkwant na aankomst in een "open" PSII centrum wordt gebruikt voor fotochemie (Φ_p). De over-all lichtbenuttings-efficiëntie (Φ_s) wordt gegeven door het product van de (schijnbare) fractie "open" PSII centra geschat via q_p en de efficiëntie van de "open" PSII centra (Φ_p).

$$\Phi_s = q_p * \Phi_p$$

Bij lage lichtintensiteit is $q_p \approx 1$ en geldt $\Phi_s = \Phi_p$.

3.6.3 q_{NP}

Non-photochemical quenching (q_{NP}) is alle afname van de intensiteit van de fluorescentie welke niet te maken heeft met het openen van "gesloten" PSII centra. q_{NP} is een verzamelnaam voor verschillende processen. Deze processen worden vooral in gang gezet zodra het aanbod van lichtenergie groter is dan in de fotosynthese kan worden verwerkt.

Krause en Weis (1988) geven drie non-photochemical quenching processen :

[1] energy-dependent quenching (q_E)
[2] quenching door afname van de lichtabsorptie door PSII door het loskoppelen van een deel van het LHCII-antenne chlorofyl van PSII (q_T)
[3] quenching door beschadiging van PSII centra (q_I)

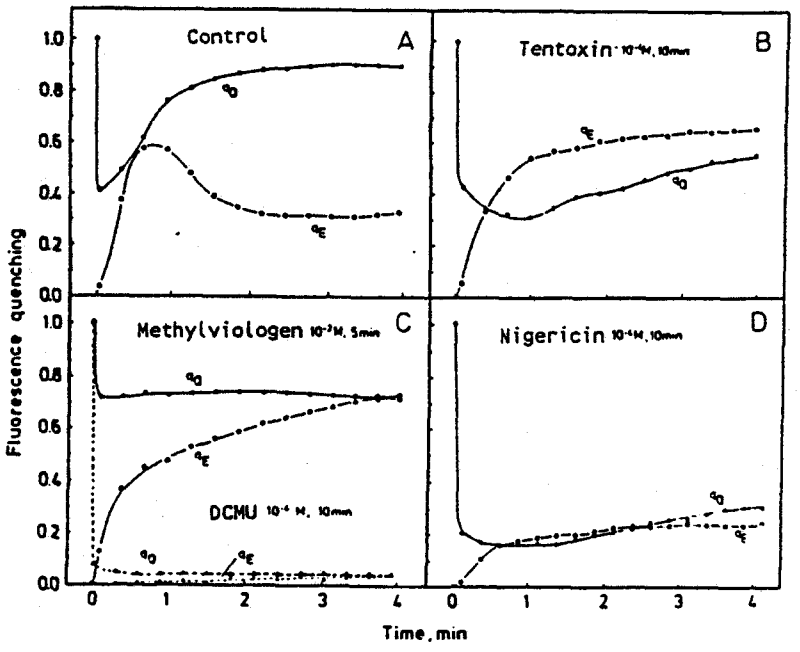


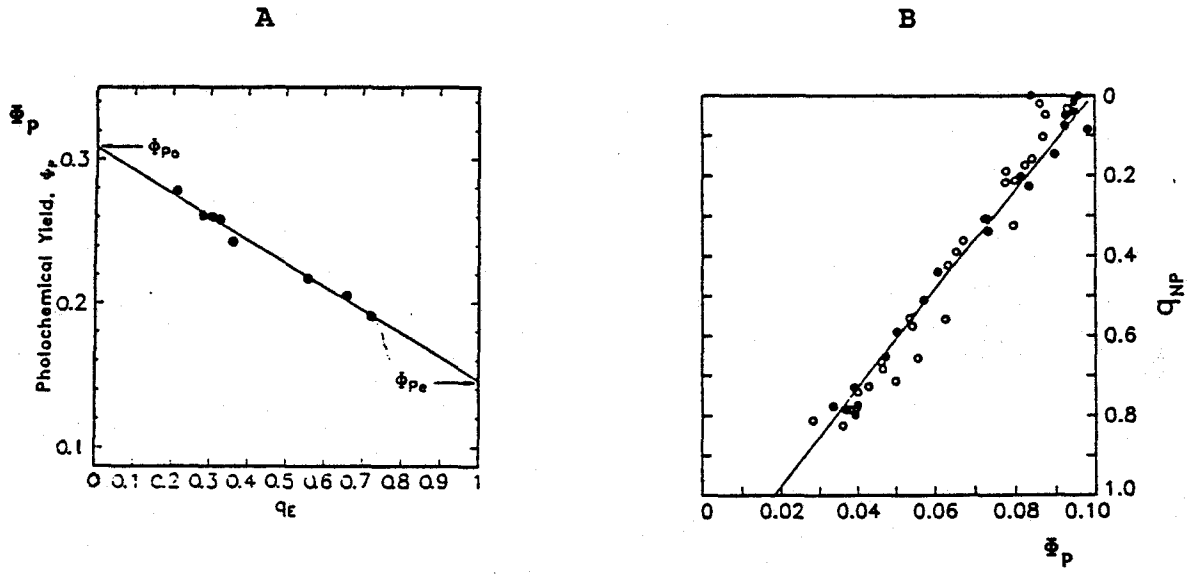
Fig. 9 Effect of various inhibitors on the induction kinetics of q_Q and q_E of intact spinach leaves. Quenching coefficients were determined from saturation pulse induction curves (see Figs. 4 and 5). The inhibitors were applied via the upper epidermis from which the cuticle was removed by gentle rubbing with carborundum powder. Concentration and incubation time of inhibitors as indicated in the figure. Light intensity: 200 µE/m² s. Temperature: 22°C

Figuur 42. Effect van verschillende fotosynthese remmers op de inductie-kinetiek van $q_P(q_Q)$ en $q_{NP}(q_E)$ van intacte spinazie bladeren. (voor verdere details zie Engels bischrift) (uit: Schreiber en Bilger, 1987)

3.6.3.1 Energy-dependent quenching (q_E)

Volgens Krause en Weis (1988) is dit normaliter het voornaamste non-photochemical quenching proces. Ca. 80% van de maximum variabele fluorescentie ($(Fv)_m$) kan via dit mechanisme worden gedoofd. q_E blijkt lineair gecorreleerd met de intrathylakoïdmembraan pH (Oxborough en Horton,1987; Weis en Lechtenberg, 1989) (figuur 40). Bij de oxidatie van PQH_2 worden twee protonen verplaatst van de stroma (buiten) naar de lumen (binnen) zijde van het thylakoïdmembraan. De hierdoor opgebouwde pH-gradiënt wordt weer afgebroken door de ATP-ase tijdens de ATP-synthese. De grootte van de pH-gradiënt is daarom afhankelijk van de verhouding tussen elektronentransport (PQH_2-oxidatie) en ATP-ase aktiviteit.

q_E neemt toe bij verhoging van de lichtintensiteit (Krause en Laasch,1987) (figuur 33,41). Bij hoge lichtintensiteit wordt de snelheid van de Calvin-cyclus limiterend waardoor ATP accumuleert en er een tekort ontstaat aan ADP + P_i. De ATP-ase aktiviteit gaat dan achter lopen op het elektronentransport waardoor de pH-gradiënt toeneemt. Toevoeging van de ontkoppelaar nigericine voorkomt de opbouw van een pH-gradiënt en leidt tot een lage q_E (Schreiber en Bilger,1987) (figuur 42d). (Nigericine verhoogt de permeabiliteit van het thylakoïdmembraan voor protonen.) DCMU remt het elektronentransport waardoor geen pH-gradiënt wordt opgebouwd. In aanwezigheid van DCMU is q_E dan ook nagenoeg nul (figuur 42c). Tentoxine is een remmer van de ATP-ase. Toevoeging van tentoxine aan een blad leidt daarom tot een hoge pH-gradiënt en hoge q_E (figuur 42b). Ook de toevoeging van methyl-viologen leidt tot een hoge q_E. Methyl-viologen treedt op als alternatieve elektronenacceptor bij PSI. Hierdoor kan $NADP^+$ niet worden gereduceerd. Door een gebrek aan NADPH stagneert de Calvin-cyclus en accumuleert ATP waardoor de pH-gradiënt toeneemt (figuur 42c).



Figuur 43. [A] Relatie tussen het kwantenrendement van "open" PSII centra (Φ_p) en q_E (naar Weis en Berry,1987) [B] Relatie tussen het kwantenrendement van "open" PSII centra (Φ_p) en q_{NP} (naar Schafer en Bjorkmann,1989).

Algemeen wordt verondersteld dat q_E een weerspiegeling is van de regulering van de lichtbenuttingsefficiëntie van "open" PSII centra. Er bestaat een lineaire relatie tussen q_E en het kwantenrendement van "open" PSII centra (Krause en Laasch,1987; Weis en Berry,1987; Schafer en Bjorkmann,1989) (figuur 43a,b).

Bij lichtverzadiging neemt het overall kwantenrendement voor fotochemische reacties af. Weis en Lechtenberg (1989) geven aan dat deze afname voor een belangrijk deel gerelateerd kan worden aan een daling van de lichtbenuttingsefficiëntie van "open" PSII centra. Zij concluderen dat hetzelfde mechanisme dat leidt tot de opbouw van q_E, de lichtbenuttingsefficiëntie van "open" PSII centra tot 50% van de maximale waarde kan reduceren. Verzadiging van de elektronentransportketen (weerspiegelt in q_P) is niet de belangrijkste reden voor de daling van het overall kwantenrendement. Weis en Lechtenberg tonen aan dat bij lichtverzadiging PSI nog voor een groot deel geoxideerd is ($P700^+$). Via een "down-regulering" van de efficiëntie van PSII centra wordt het elektronentransport afgestemd op de aktiviteit van de Calvincyclus en wordt het accumuleren van gereduceerde PSII centra ($P680.Qa^-$) voorkomen. Het voorkomen hiervan is van belang i.v.m. preventie van schade aan PSII centra (fotoinhibitie) welke anders gemakkelijk bij overmatige belichting kan ontstaan.

Krause en Behrend (1986) voorkwamen de opbouw van q_E door toevoeging van de ontkoppelaar nigericine. Ontkoppelde chloroplasten (zonder q_E) waren gevoeliger voor schade door fotoinhibitie dan niet ontkoppelde (met q_E). Bjorkmann constateerde na toevoeging van DTT een grotere gevoeligheid voor fotoinhibitie. DTT remt het tot stand komen van q_E.

De wijze waarop q_E tot stand komt is niet geheel duidelijk. Oxborough en Horton (1987) tonen aan dat de pH-gradiënt wel een voorwaarde is voor de tot stand koming van q_E, maar niet de

direkte oorzaak. In aanwezigheid van antimycine-A werd wel een pH-gradiënt opgebouwd maar kwam geen q_E tot stand. Bilger et al (1988) concluderen dat de opbouw van de pH-gradiënt in de tijd vooraf gaat aan het tot stand komen van q_E. Ook dit wijst erop dat de pH-gradiënt niet de direkte oorzaak van q_E is. De meest recente vondst m.b.t. q_E is de vorming van zeaxanthine in de antennepigmenten van PSII. Bjorkmann en Demmig (fluor. workshop Wag,1989) geven aan dat het grootste deel van q_{NP} (=q_E) veroorzaakt wordt door een toename van k_D (omzetting van lichtenergie in warmte <u>in de antenne</u> van PSII). De toename van k_D zou gerelateerd zijn aan de vorming van zeaxanthine in de antenne van PSII. Zeaxanthine wordt gevormd uit antheraxanthine en violaxanthine (xanthofyl-cyclus).

zeaxanthine <----> antheraxanthine <----> violaxanthine

Toevoeging van DTT aan bladeren remt de zeaxanthine synthese. Dit verklaart de invloed van DTT op q_E. De relatie tussen zeaxanthine synthese, pH-gradiënt en q_E is niet duidelijk. Ook zeaxanthine blijkt niet de direkte oorzaak te zijn van fluorescentiedoving. De afbraak van zeaxanthine vergt 10 á 15 minuten, terwijl q_E binnen enkele minuten reversibel is. Een interessante waarneming van Rees (fluor. workshop Wag,1989) is dat q_E sneller tot stand komt na een korte (5 minuten) donkeradaptatie dan na een lange (30 minuten). De na 5 minuten nog wel, maar na 30 minuten niet meer aanwezige zeaxanthine zou dit kunnen verklaren. Bovenstaande gegevens wijzen erop dat voor de tot stand koming van q_E zowel een grote pH-gradiënt als zeaxanthine vorming noodzakelijk zijn.

Ook Krause en Weis (1988) geven als verklaring voor q_E de toename van k_D. Uit zowel het mono-partite als het bi-partite model volgt dat een toename van k_D leidt tot een doving van Fmax naar Fs maar ook van Fo naar Fo'. Bjorkmann (1987) geeft voor het mono-partite model een schatting voor de verhouding $k_F:k_{DT}:k_P$=1:10:70. Deze

verhouding geldt bij q_E=0. Om een q_E = 0.80 te verkrijgen kan berekend worden dat k_{DT} met een factor 4 moet toenemen. De verhouding k_F:k_{DT}:k_P wordt dan 1:40:70. De verhouding Fo (q_E=0) : Fo' (q_E=0.80) wordt gegeven door :

$$Fo / Fo' = \{ [1/(1+10+70)] / [1/(1+40+70)] \} = 1.37$$

$$\Leftrightarrow$$

$$qo = (Fo-Fo')/Fo = 0.27$$

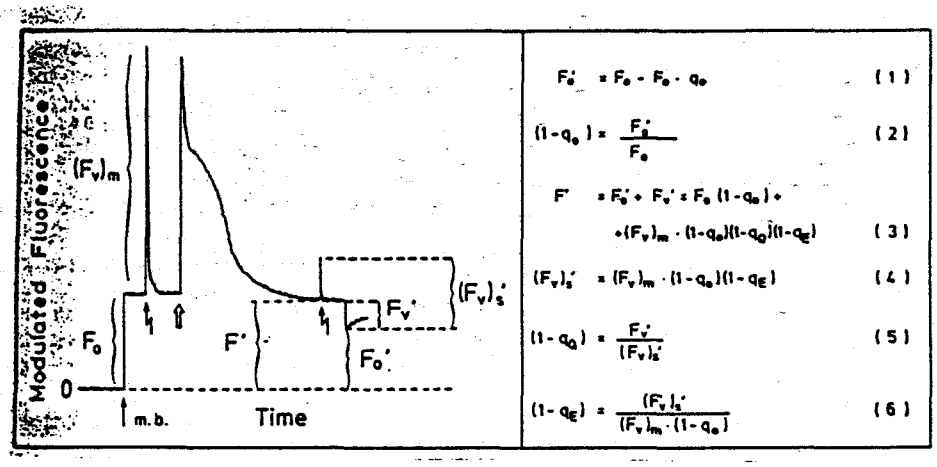
Deze automatische koppeling van q_E en qo bij een toename van k_D wordt in artikelen van Krause en Weis (1988), Bilger en Schreiber (1986) en Schreiber en Bilger (1987) niet onderkend. Enerzijds wordt q_E verklaard door een toename van k_D terwijl anderzijds geen rekening gehouden wordt met de hierdoor te verwachten daling van Fo. Dit is op zijn minst verwarrend.

Schreiber en Bilger (1987) veronderstellen dat q_{NP} voornamelijk bestaat uit q_E (q_{NP}=q_E) en gaan er verder vanuit dat Fo constant is. Zij definiëren :

$$q_E = ((Fv)_m - (Fv)_s) / (Fv)_m$$

met $(Fv)_m$ = Fmax-Fo
$(Fv)s$ = Fs-Fo

In een ander artikel (Bilger en Schreiber,1986) wordt echter aangegeven dat Fo niet altijd constant is. De verschuivingen in Fo worden door Bilger en Schreiber uitsluitend geweten aan een verlaagde absorptie van lichtenergie door PSII, door een verkleining van de antenne-grootte van PSII (state transition, q_T) (zie 3.6.3.2). Dat de verlaging van Fo ook veroorzaakt kan worden door een toename van k_D wordt volledig over het hoofd gezien.
Bilger en Schreiber stellen voor om de nieuwe Fo' en Fs te



Figuur 44. Illustratie van de berekeningsmethode van de hergedefiniëerde q_E (uit: Bilger en Schreiber,1986).

corrigeren voor de vermeende lagere lichtabsorptie van PSII. Immers een lagere lichtabsorptie door PSII (lagere Ia) leidt tot een verlaging van de fluorescentie-intensiteit welke geheel los staat van q_E. De verlaging van de lichtabsorptie (qo) wordt berekend aan de hand van de doving van Fo :

$$qo = (Fo-Fo')/Fo$$

Correctie van Fo' en Fs voor de lichtabsorptie vindt plaats door deling door 1-qo. De gecorrigeerde waarde voor $(Fv)_s$ volgt dan uit:

$$(Fv)_s = (Fs-Fo')/(1-qo)$$

q_E werd door Bilger en Schreiber (1986) her-gedefiniëerd (figuur 44) als:

$$q_E = \{ (Fv)_m - (Fv)_s/(1-qo) \} / (Fv)_m$$

Zowel het werk van D. Rees als dat van B. Demmig (fluor. workshop Wag,1989) toont aan dat verschuivingen in Fo niet volledig toegeschreven mogen worden aan veranderingen van de lichtabsorptie door PSII. Rees pastte een methode toe waardoor tijdens de meting geen veranderingen in lichtabsorptie door PSII optraden. Omdat de lichtabsorptie niet veranderde berekende zij q_E als volgt :

$$q_E = \{ [(Fv)m - (Fv)s] / (Fv)m \}$$

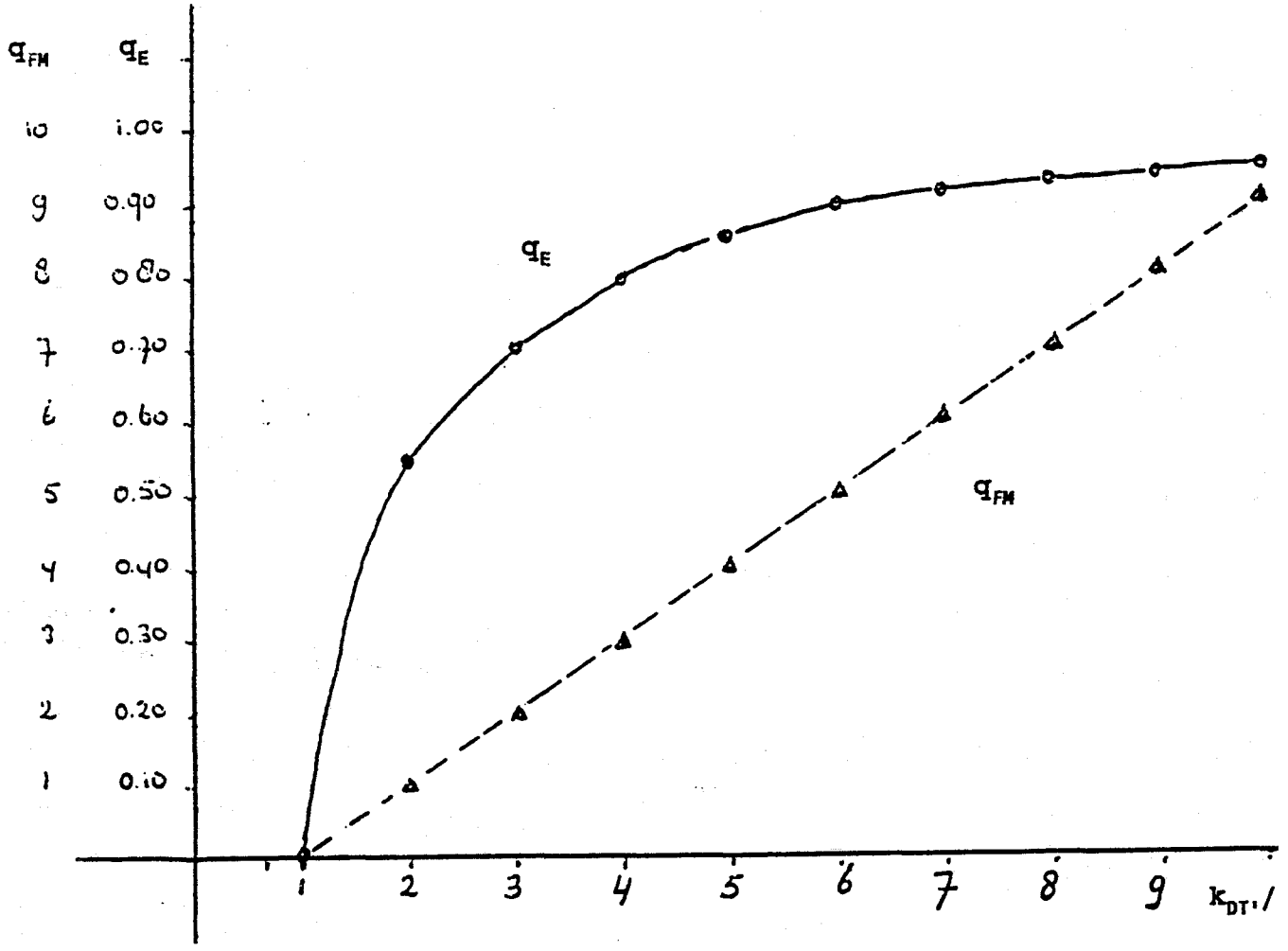
met : $(Fv)_m = Fmax - Fo$ (let op! begin Fo-waarde)
$(Fv)s = Fs - Fo'$ (let op! nieuwe Fo'-waarde)

Bij veel metingen is Fo-doving door absorptie veranderingen,

verstrengeld met Fo-doving door toename van k_D. Ook blijken er mechanismen te bestaan welke leiden tot een toename van Fo. Een eenduidige correcte berekeningsmethode voor q_E bestaat niet en een glasheldere interpretatie van q_E is eigenlijk niet mogelijk.

Het doel van q_E is om een kwantitatieve maat te geven van de energetisatie (door pH-gradiënt, accumulatie ATP,etc..) van het thylakoïdmembraan. De keuze van de q_E parameter voor dit doel, is mijns inziens een ongelukkige geweest omdat er een veel eenvoudigere en direktere parameter bestaat.
q_E komt voort uit een regulering van de lichtbenuttingsefficiëntie van "open" PSII centra na energetisatie van het thylakoïdmembraan. q_E is daarom slechts indirekt, via de regulering van de lichtbenuttingsefficiëntie, gecorreleerd aan de energetisatie van het thylakoïdmembraan. Een veel direktere maat voor de energetisatie van het thylakoïdmembraan wordt geleverd door de lichtbenuttingsefficiëntie zelf. De lichtbenuttingsefficiëntie van "open" PSII centra (Φ_p) kan ten alle tijde worden geschat door (Fs-Fo')/Fs. Gebruik van Φ_p maakt de onduidelijke parameter q_E overbodig.

Nog een argument om niet langer gebruik te maken van de parameter q_E wordt gevonden wanneer q_E wordt uitgedrukt in reactieconstanten. De fysische betekenis van q_E kan worden afgeleid door invulling van de reactieconstanten in de betreffende berekeningsformule voor q_E. Dit is in principe mogelijk voor ieder model en voor ieder vooraf verondersteld dovingsmechanisme van fluorescentie. De betekenis van q_E is afhankelijk van het vooraf veronderstelde dovingsmechanisme (een toename van k_D (antenne) , een toename van k_d (reactie centrum) of een verandering van de lichtabsorptie van PSII). Het afleiden van de fysische betekenis van q_E voor ieder model en dovingsmechanisme heeft weinig nut. Veel wijzer worden we daar niet van omdat onvoldoende informatie beschikbaar is om de waarheid van de veronderstellingen te



Figuur 45. Effect van verschuivingen in k_{DT} op q_E en q_{FM} **berekend** volgens het mono-partite model met een verhouding k_F : k_{DT} : k_P = 1 : 10 : 70 in de donker-geadapteerde situatie. Er wordt verondersteld dat k_F verwaarloost kan worden t.o.v. k_{DT} ($k_F << k_{DT}$).

toetsen.

Onderstaande afleiding beperkt zich daarom tot het mono-partite model met als dovingsmechanisme de toename van k_D.

$$q_E = \{(Fmax-Fo)-(Fs-Fo')\} / (Fmax-Fo) \quad <=>$$

$$q_E = 1 - \{[(k_F+k_{DT})*(k_F+k_{DT}+k_P)] / [(k_F+k_{DT'})*(k_F+k_{DT'}+k_P)]\}$$

waarin : $k_{DT} = k_D+k_T$ ($q_E=0$)
$k_{DT'} = k_{D'}+k_T$ (na toename k_D)

Uitgaande van de verhouding $k_F:k_{DT}:k_P$ = 1:10:70 (Bjorkmann,1987) kan de relatie tussen q_E en verschuivingen in kDT worden berekend (figuur 45). Deze relatie is niet lineair.

Een meer direkte maat voor verschuivingen in kDT (binnen het mono-partite model) wordt gegeven door de relatieve verandering van Fmax naar Fs (q_{FM}) :

$$q_{FM} = (Fmax-Fs)/Fs$$

Na invulling van de betreffende reactieconstanten kan worden afgeleid dat :

$$q_{FM} = (k_{DT'}-k_{DT}) / (k_F+k_{DT})$$

Omdat $k_{DT}>>k_F$ volgt:

$$q_{FM} = (k_{DT'}-k_{DT}) / k_{DT} = \alpha$$

α is een maat voor de relatieve verhoging van k_{DT} naar $k_{DT'}$ en wordt geschat door de relatieve verandering van Fmax naar Fs. In tegenstelling tot q_E is de relatie tussen q_{FM} en verandering in k_{DT} wel lineair (figuur 45).

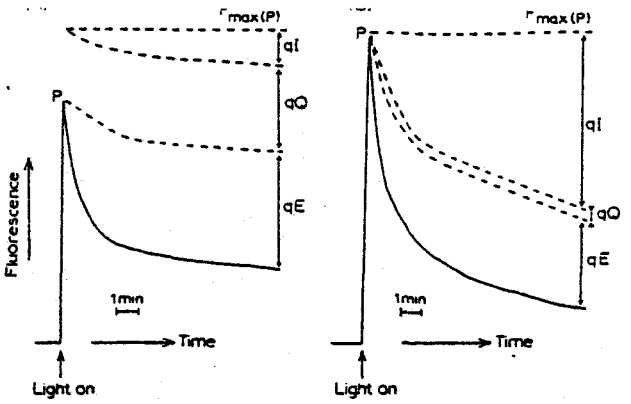


Fig. 7.5. Fluorescence quenching in pea chloroplasts excited with a PFD of (A) 300 μmol photons·m^{-2}·s^{-1} and (B) 3000 μmol photons·m^{-2}·s^{-1}. The high energy state (qE), photochemical (qQ) and irreversible non-photochemical (qI) components of the fluorescence quenching are shown. $F_{max(P)}$ represents the maximal fluorescence emission that would be observed at P. (From Bradbury and Baker, unpublished.)

Figuur 46. De snelheid van ontstaan van q_I in afhankelijkheid va de lichtintensiteit. [A] 300 μE.m^{-2}.sec^{-1} ; [B] 3000 μE.m^{-2}.sec^{-1} (uit: Baker en Horton,1987)

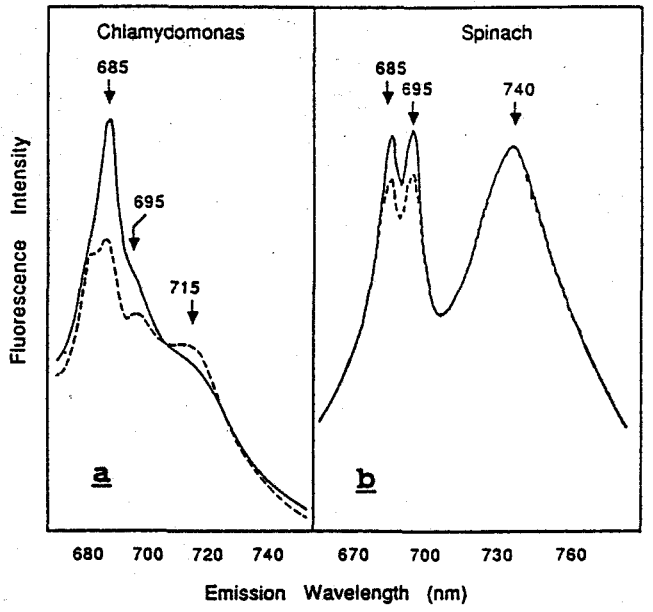


Fig. 9.1. Low-temperature (77-K) fluorescence spectra before (solid) and after (dashed) photoinhibition treatments of *Chlamydomonas reinhardii* cells and spinach thylakoids. The emissions arising from the pigment beds associated with PSII (685 and 695 nm) and PSI (715 and 740 nm) are indicated. *C. reinhardii* cells were treated for 30 min with a PFD of 2000 μmol photons·m^{-2}·s^{-1} at 50 μg Chl·ml^{-1}. Spinach thylakoids were treated for 2 min with a PFD of 6000 μmol photons·m^{-2}·s^{-1} and 10 μg Chl·ml^{-1}. Spinach thylakoid data are from Cleland and Critchley (1985).

Figuur 47. Fluorescentie spectra van [a] C. reinhardii cellen ei [b] spinazie thylakoïden vóór (——) en na (---) fotoinhibitie. (uit: Kyle,1987)

Bovenstaande argumenten bevestigen dat q_E slechts moet worden gezien als een parameter om verschuivingen in het door Schreiber geïntroduceerde begrip variabele fluorescentie te kwantificeren. Voor het kwantificeren van de energetisatie van het thylakoïd-membraan of van verschuivingen in k_{DT} zijn andere meer direkte en handigere parameters beschikbaar.

3.6.3.2 Afname van de lichtabsorptie door PSII (q_T)

Een ander non-photochemical quenching mechanisme dat kan leiden tot de doving van fluorescentie is de state 1 --> state 2 Transition (q_T). Door donkeradaptatie of door belichting met verrood licht (>700 nm) komt het fotochemisch apparaat van bladeren in de state 1. In state 1 wordt het licht vooral naar PSII geleid. Bij belichting met wit licht zal een verschuiving optreden naar state 2. Deze verschuiving draagt bij tot een betere lichtverdeling over PSI en PSII. De state 1 - state 2 overgang komt tot stand door fosforylatie van een deel van LHCII. Dit laat hierdoor los van PSII waardoor de antennegrootte van PSII wordt verlaagd. De lagere lichtabsorptie leidt tot een lagere fluorescentie. Volgens Krause en Weis (1988) is de bijdrage van q_T aan q_{NP} relatief klein (q_{Tmax} ≈0.20). De kinetiek van q_T (> 10 minuten) is trager dan van q_E (± 1 minuut). Naast de fosforylatie van LHCII zijn er waarschijnlijk meer state transities mogelijk welke binnen één minuut plaatsvinden (v. Kooten, pers. mededeling).

3.6.3.3 Beschadiging van PSII (q_I)

Een derde non-photochemical quenching mechanisme is fotoinhibitie (q_I). q_I is gedefiniëerd als het deel van de doving van $(Fv)_m$ naar $(Fv)_s$ dat niet of slechts zeer langzaam (dagen) reversibel is. q_I kan worden berekend uit het verschil tussen $(Fv)_m$ vóór de foto-

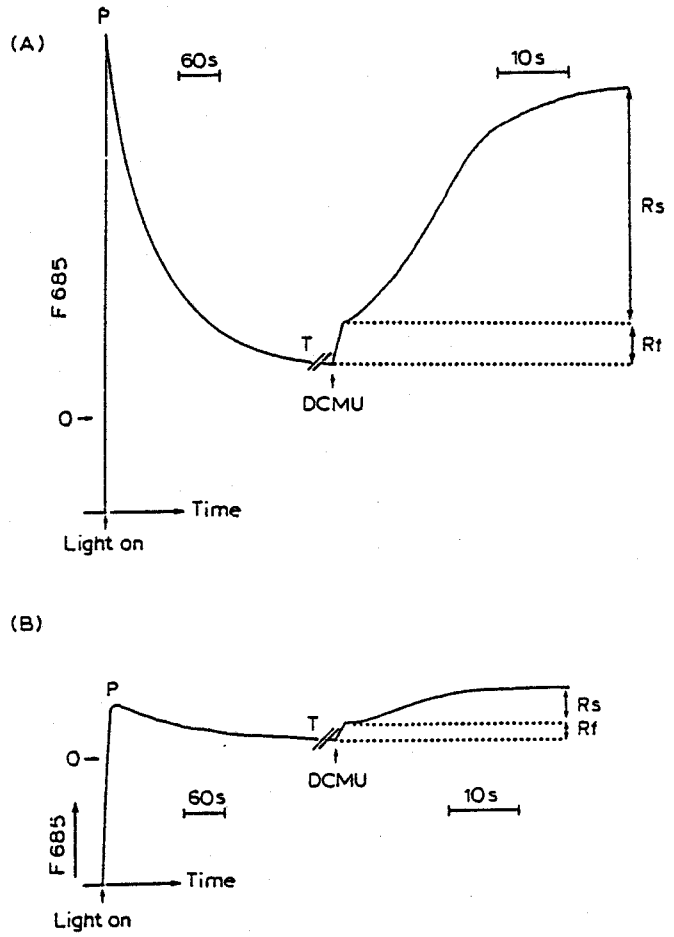


Fig. 7.1. Fluorescence-induction kinetics of intact pea chloroplasts which had been kept in the dark (A) or exposed to a PFD of 3000 μmol photons·m^{-2}·s^{-1} of broad-band blue irradiation for 10 min and then dark adapted for 5 min (B) prior to generation of fluorescence with a PFD of 100 μmol photons·m^{-2}·s^{-1}. The effect of addition of 10 μM DCMU to the chloroplasts at the steady-state fluorescence level at T is also shown. R_f and R_s estimate the amount of photochemical and high energy state quenching at T respectively. (From Bradbury and Baker, 1986.)

Figuur 48. Effect van fotoinhibitie op de fluorescentie inductiecurve. [A] controle ; [B] na fotoinhibitie (uit: Baker en Horton,1987)

inhibitie behandeling en $(Fv)_m$ na de fotoinhibitie behandeling. Voorafgaande aan de meting van $(Fv)_m$ na de fotoinhibitie behandeling, moet dan wel een ½ uur donkeradaptatie in acht genomen worden. q_I volgt uit :

$$q_I = [\ (Fv)_{m\ vóór} - (Fv)_{m\ na}\ ]\ /\ (Fv)_{m\ vóór}$$

Fotoinhibitie kan optreden bij overmatige belichting en wordt bevorderd door stress-factoren welke de regulering van de lichtbenuttingsefficiëntie van PSII belemmeren (koude-stress). Fotoinhibitie is gerelateerd aan de beschadiging van PSII reactiecentra. De kinetiek van q_I is traag. De snelheid waarmee q_I ontstaat is afhankelijk van de lichtintensiteit en temperatuur (figuur 46). Ook de groeicondities spelen een belangrijke rol. Zo is een schaduwplant gevoeliger voor fotoinhibitie dan een zonneplant. q_I kan ontstaan na enkele tientallen minuten maar het kan ook uren duren. Het herstel vergt meerdere uren tot dagen.

Er zijn diverse onderzoekresultaten die PSII localiseren als de primaire plaats van beschadiging bij fotoinhibitie. Fotoinhibitie leidde namelijk tot een verlaging van de fluorescentie van PSII (685,695 nm) maar niet van de fluorescentie van PSI (715,740 nm) (figuur 47) (Kyle,1987). Baker et al (1983) vonden dat fotoinhibitie leidde tot een daling van de variabele fluorescentie afkomstig van PSII (figuur 48).

Kyle (1987) beschrijft het onderzoek van Chritchley (1981) waarin werd aangetoond dat fotoinhibitie leidde tot een daling van de PSII aktiviteit maar niet van de PSI aktiviteit. De door fotoinhibitie verlaagde PSII aktiviteit kon niet worden verklaard door een beschadiging van het watersplitsend systeem (OEC). Wanneer door behandeling van thylakoïdmembramen met bepaalde stoffen, specifiek het watersplitsend systeem werd beschadigd, kon de hierdoor verloren gegaan PSII aktiviteit worden hersteld

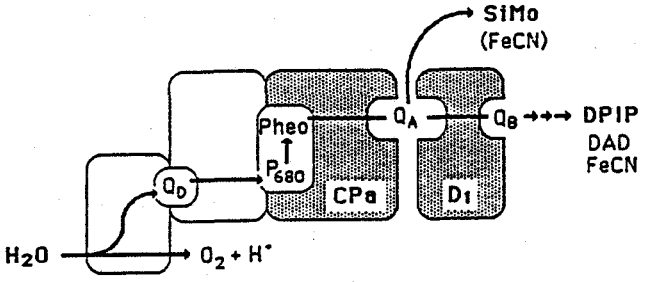


Fig. 9.5. Loss of Q_B-dependent activity ($H_2O \rightarrow$ DPIP). Q_B-independent activity ($H_2O \rightarrow$ SiMo), radiolabeled Q_B protein (D_1) and a CP-43/CP-51 complex (CPa) are shown as a function of time of incubation of pea thylakoids (50 $\mu g \cdot ml^{-1}$) with a PFD of 1000 μmol photons$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Data redrawn from Ohad et al., 1985.)

Figuur 49. Illustratie van Q_B-eiwit afhankelijk en Q_B-eiwit onafhankelijk electronentransport naar respectievelijk DPIP en SiMo. (uit: Kyle,1987)

met een artificiële elektronendonor voor PSII. De artificiële donor vervangt dan de rol van het beschadigde OEC. Wanneer echter 80-90% van de PSII aktiviteit verloren was gegaan door foto-inhibitie kon met dezelfde donor de PSII aktiviteit niet worden hersteld.

Verschillende onderzoekresultaten wijzen erop dat de beschadiging van PSII plaats vindt bij het Q_B-eiwit van PSII. Het Q_B-eiwit bindt PQ en cataliseert het elektronentransport van Qa naar PQ. Na reductie dissocieert PQH_2 van het Q_B-eiwit en komt de binding-plaats opnieuw vrij. Kyle (1987) beschrijft een onderzoek waaruit bleek dat het Q_B-afhankelijk elektronentransport van water naar DPIP veel sterker werd gereduceerd door fotoinhibitie dan het Q_B-onafhankelijk elektronentransport van water naar SiMo (figuur 49). Het verlies van atrazine bindingplaatsen door fotoinhibitie wijst ook op beschadiging van het Q_B-eiwit. Inmiddels is bekend dat het Q_B-eiwit en het D1-eiwit dezelfde zijn (O.v. Kooten, pers. mededeling).

Tijdens fotoinhibitie van C. reinhardii cellen, volgde de ver-wijdering van het Q_B-eiwit uit het thylakoïdmembraan eenzelfde kinetiek als het verlies van fotochemische aktiviteit. Een temperatuur gevoelige C. reinhardii waarbij de eiwitsynthese was geblokkeerd boven de 44 °C, was bij temperaturen boven 44 °C niet langer in staat te herstellen van fotoinhibitie (Kyle,1987). Dit geeft aan dat het door fotinhibitie beschadigde Q_B-eiwit ver-vangen moet worden door een de-novo synthese produkt.

Kyle (1987) geeft als hypothese dat in de stroma-lamellen van het thylakoïdmembraan een buffer van nieuw gesynthetiseerd Q_B-eiwit aanwezig is. Wanneer door fotoinhibitie een Q_B-eiwit is bescha-digd, kan het beschadigde eiwit worden vervangen door een nieuw eiwit vanuit deze buffer.

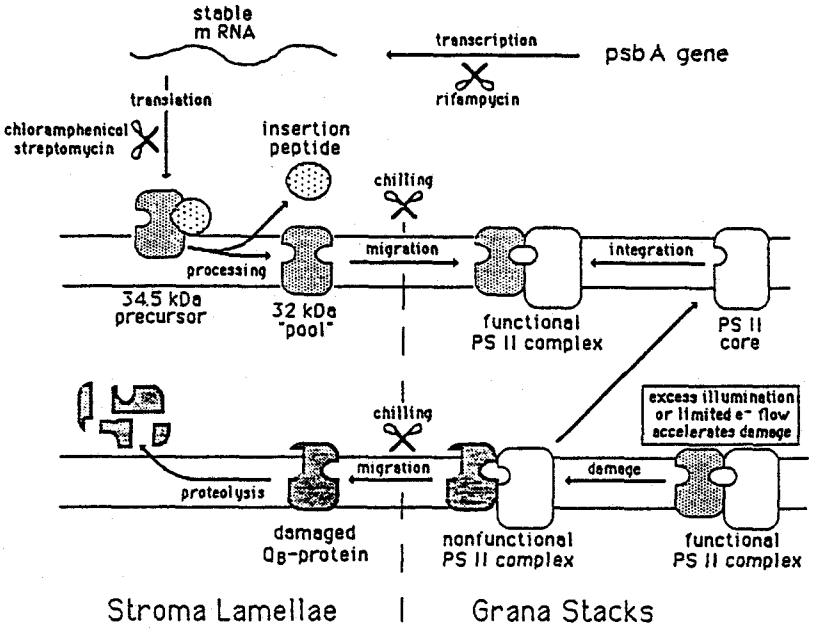


Fig. 9.8. Life history of the Q_B protein. The chloroplast gene, *psbA* codes for a very stable mRNA which, when translated on 70S ribosomes, results in the synthesis of a 34.5-kDa precursor of the Q_B protein. This precursor has a short residence time in the membrane and is either processed to the mature 32-kDa form or turned-over. The newly inserted pool of mature Q_B protein then migrates into the grana where it can be integrated with a PSII core complex deficient in Q_B acceptor activity. As a consequence of its enzymatic activity involving potential formation of active oxygen species, the Q_B protein becomes damaged. Rates of damage can be accelerated by high light (photoinhibition) and by blockage of electron flow resulting in a build up of reducing power at the reaction center. Once damaged, the Q_B protein is flagged for removal and migrates back to the non-appressed lamellae where it is proteolytically digested. The scissors mark the sites of action of various blocking agents used to enhance photosensitivity by inhibiting the repair processes.

Figuur 50. Schematische weergave van de levenscyclus van het Q_B-eiwit. Effecten van licht en temperatuur op beschadiging- en herstelprocessen zijn aangegeven. (voor verdere details zie Engels bijschrift) (uit: Kyle,1987)

De levensduur van Q_B-eiwit is vooral afhankelijk van de lichtintensiteit en de temperatuur. In het donker is de levensduur van het Q_B-eiwit groot en onafhankelijk van de temperatuur. Beschadiging van het Q_B-eiwit treedt uitsluitend op in aanwezigheid van lichtenergie. In het licht neemt de levensduur af bij toenemende lichtintensiteit en afnemende temperatuur. Hoge lichtintensiteit en lage temperatuur bevorderen de kans op beschadiging van het Q_B-eiwit. De synthesesnelheid van het Q_B-eiwit is gekoppeld aan de snelheid van beschadiging. Het mechanisme van de regulering is onbekend. Wel is duidelijk dat het een posttranscriptie regulering betreft. Herstel van fotoinhibitie bleek ongevoelig voor de toevoeging van rifampycine (remmer van de transcriptie). Het Q_B-mRNA is stabiel en komt in hoge concentraties in de chloroplast voor. Dankzij de hoge concentratie Q_B-mRNA is de synthese capaciteit van het Q_B-eiwit hoog. Fotoinhibitie komt volgens Kyle (1987) tot uitdrukking zodra herstel processen achterblijven bij de beschadiging. Kyle veronderstelt dat de herstelsnelheid bepaald wordt door [1] synthesesnelheid van Q_B-eiwit, [2] inbouwsnelheid van Q_B-eiwit in de stroma lamellen, [3] migratie snelheid van Q_B-eiwit in het thylakoïdmembraan, [4] integratiesnelheid van Q_B-eiwit in beschadigde PSII centra (figuur 50). Beschadiging van het Q_B-eiwit is normaal en treedt ook onder non-stresscondities op, zei het dat de snelheid van beschadiging dan in evenwicht is met het herstel. Pas wanneer stresscondities (bv. koude) leiden tot een onbalans tussen beschadiging en herstel ontstaat meetbare fotoinhibitieschade.

Fotoinhibitie kan geïnduceerd worden door planten te plaatsen bij een veel hogere lichtintensiteit dan waaraan zij zijn geadapteerd (Bjorkmann,1987; Baker en Horton,1987). Echter vooral een combinatie van hoge lichtintensiteit (bevordert de beschadiging) en lage temperatuur (bevordert de beschadiging + vertraagt het herstel) leidt tot fotinhibitie (Kyle,1987; Long et al,1983; Oquist et al,1987). Kyle (1987) beschrijft een experiment waarbij

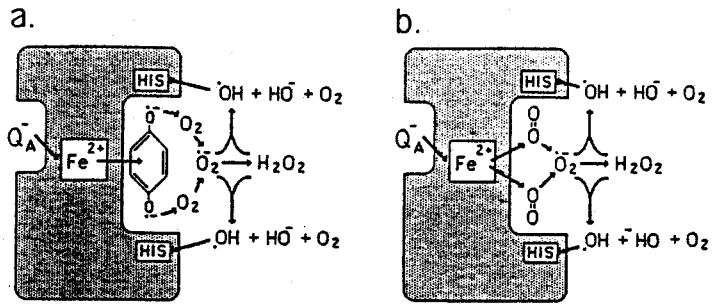


Fig. 9.10. Mechanisms for the generation of superoxide and hydroxyl radicals at the binding site of Q_B. Electrons originating from Q_A may be transferred via the semiquinone anion radical to dioxygen (a), or transferred directly to dioxygen itself which acts as a substrate analog at the plastoquinone-binding site (b).

Figuur 51. De vorming van O_2-radicalen [a] via het PQ^- anion en [b] rechtstreeks door binding van O_2 aan de Q_B-bindingplaats. (uit: Kyle,1987)

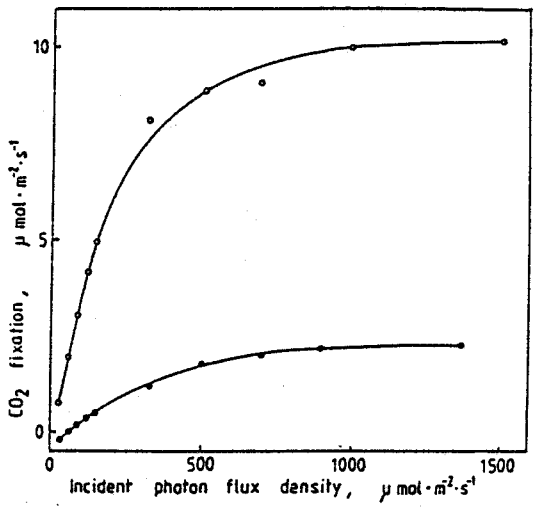


Fig. 3.1. Light-response curve of CO_2 fixation by *Lemna gibba* before (○) and after (●) a 2-h exposure to a PFD of 1750 μmol photons·m^{-2}·s^{-1} at 3°C. The measurements were made at room temperature in CO_2-enriched air to saturate CO_2 at light saturation. (After Ögren et al., 1984.)

Figuur 52. Lichtresponscurve van de CO_2-assimilatie voor ( ) en na ( ) fotoinhibitie. (uit: Oquist et al,1987)

de fotoinhibitie sterk toenam bij verlaging van de temperatuur beneden de 15 °C. Een dergelijk breekpunt is volgens hem typerend voor membraan gerelateerde processen. Er werd gevonden dat bij lage temperatuur het beschadigde Q_B-eiwit niet langer werd verwijderd uit het thylakoidmembraan.
Bij lage temperatuur is ook de regulering van het elektronentransport gebrekkig (Havaux,1987). Een gebrekkige regulering verhoogt de gevoeligheid voor fotoinhibitie (Weis en Lechtenberg, 1989; Krause en Behrend,1986; Bjorkmann en Demmig, fluor workshop Wag,1989).

Het mechanisme van de beschadiging van het Q_B-eiwit is nog niet geheel opgehelderd. Aangenomen wordt dat O_2-radicalen hierbij een rol spelen. Mogelijke onstaanswijzen van O_2-radicalen zijn weergegeven in figuur 51 (Kyle,1987). Als de O_2-radicalen inderdaad worden gevormd door onttrekking van een elektron aan Qa^-, verklaart dit het belang van de regulering van het elektronentransport. Immers bij accumulatie van Qa^- neemt de kans op de vorming van O_2-radicalen toe. Het is dus van belang de accumulatie van Qa^- te voorkomen.

Lichtkwanten die worden ingevangen door de antenne van beschadigde PSII centra gaan verloren. Fotoinhibitie komt daarom tot uitdrukking in een verlaagd kwantenrendement en een verlaagde maximale fotosynthesesnelheid (Long et al,1983; Oquist et al, 1987) (figuur 52). Het effect van fotoinhibitie op het kwantenrendement is groter dan het effect op de maximale fotosynthesesnelheid. Deze discrepantie wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de overcapaciteit van de PSII centra t.o.v. de capaciteit van de Calvin-cyclus. Het verlies van lichtkwanten in beschadigde PSII centra kan (ten dele) gecompenseerd worden door een hogere lichtintensiteit. Het extra aanbod van lichtkwanten aan niet beschadigde PSII centra compenseert dan het verlies aan aktiviteit van beschadigde centra.

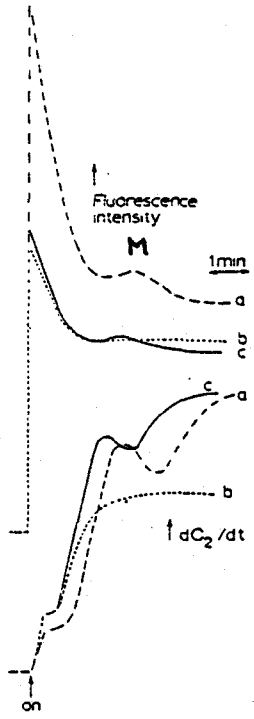


Fig. 7.9. Chlorophyll fluorescence (upper curves) and rate of O_2 evolution (lower curves) upon illumination of protoplasts that had been exposed to 0 (a) or 4 min photoinhibition (b and c). Assays were carried out at a light intensity of 1050 μmol photons·m^{-2}·s^{-1} for (a and b) but increased to 3500 μmol photons·m^{-2}·s^{-1} for (c).

Figuur 53. Effect van fotoinhibitie op het verloop van de chlorofylfluorescentie inductiecurve (bovenste drie lijnen) en (het verloop van de O_2-productiesnelheid inductiecurve (onderste drie lijnen) bij een overgang van donker naar licht. [a] contro: vóór fotoinhibitie;[b+c] na fotoinhibitie ;[a+b] gemeten bij 10: $\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$; [c] gemeten bij 3500 $\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$
(uit: Baker en Horton,1987)

In aanwezigheid van methylviologen (kunstmatige acceptor van PSI) werd geen discrepantie gevonden tussen de verlaging van het kwantenrendement en de maximale elektronentransportsnelheid. De kunstmatige acceptor neemt de limitering van de Calvin-cyclus weg waardoor de maximale elektronentransportsnelheid gelimiteerd is door de verwerkingssnelheid van lichtenergie in PSII centra. Beschadiging van een deel van de PSII centra kan dan niet meer gecompenseerd worden door andere centra.

Baker en Horton (1987) bestudeerden het effect van fotoinhibitie op de kinetiek van de inductie van fluorescentie en van de O_2-productie (figuur 53). Naast een verlies aan variabele fluorescentie leidde fotoinhibitie tot het verlies van de M-piek in de fluorescentie inductie. De M-piek ontstaat door een tijdelijke onbalans tussen de elektronentransportsnelheid (te hoog) en Calvin-cyclus aktiviteit (Quick en Horton,1986). De onbalans leidt tot een tijdelijke remming van het elektronentransport (dip in O_2-productie) en een stijging van de fluorescentie (q_p neemt af) (figuur 53a). Fotoinhibitie verlaagt de elektronentransportsnelheid waardoor de onbalans en daarmee de M-piek en de O_2-dip verdwijnen (figuur 53b). Verhoging van de lichtintensiteit compenseert voor het door fotoinhibitie verlaagde kwantenrendement waardoor de M-piek en O_2-dip opnieuw deel uitmaken van de inductie (figuur 53c).

Baker en Horton (1987) bestudeerden het effect van fotoinhibitie op Fo, Fmax en $(Fv)_m/Fm$ gemeten bij kamertemperatuur. Zij vonden bij fotoinhibitie van chloroplasten van erwten (figuur 54):

- eerst een snelle stijging van Fo gevolg door een geleidelijke daling
- een geleidelijke daling van Fmax
- eerst een snelle gevolgd door een geleidelijke daling van $(Fv)_m/Fm$

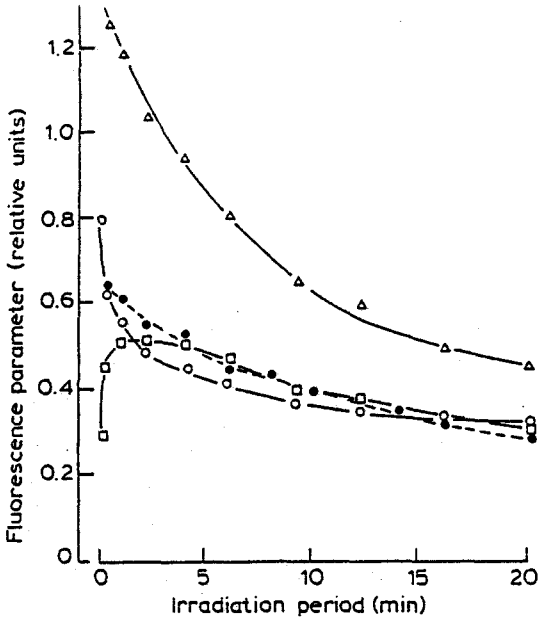


Fig. 7.2. Changes in fluorescence parameters of pea chloroplasts during photoinhibition treatment. Chloroplasts were exposed to a PFD of 3000 μmol photons·m^{-2}·s^{-1} of broad-band blue light for varying periods and then dark adapted for 5 min prior to measurement of fluorescence-induction kinetics with an excitation PFD of 100 μmol photons·m^{-2}·s^{-1}. The minimal (F_0, □) and maximal (F_M, △) fluorescence and the ratio of variable to maximal fluorescence (F_V/F_M, ○) at 20°C were determined for chloroplasts poisoned with DCMU after photoinhibition treatment. The ratio of variable to maximal fluorescence (F_V/F_M, ●) was also determined from chloroplasts at 77 K. (From Bradbury and Baker, 1986.)

Figuur 54. Verschuivingen in fluorescentie parameters tijdens ee fotoinhibitie behandeling. (▲) Fm; (□) Fo; (○) $(Fv)_m/Fm$ gemeten bij 20°C; (●) $(Fv)_m/Fm$ gemeten bij 77°K.
(uit: Baker en Horton,1987)

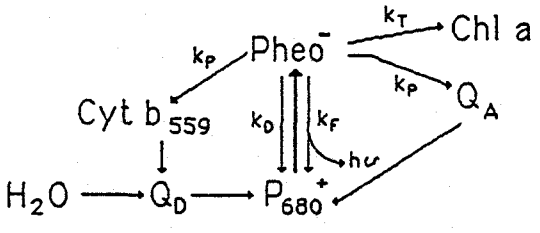


Fig. 9.6. Quenching of fluorescence during photoinhibition may be due to an increase in the r constants of thermal deactivation (k_D), energy transfer to adjacent chlorophylls or PSI (k_T), establishment of a futile cycle involving photochemistry (increase in k_P) via cytochrome b_{559} or or to a low quantum yield event involving electron donation from water oxidation through the c none donor Q_D.

Figuur 55. Mogelijke verklaringen voor de verlaagde fluorescenti opbrengst van door fotoinhibitie beschadigde PSII centra.
(uit: Kyle,1987)

De snelle stijging en daling van respectievelijk Fo en $(Fv)_m/Fm$ werden niet gevonden bij fluorescentie metingen bij 77 °K. Haalstra (1988,ongepubliceerd) vond bij fotoinhibitie van maïs een sterke daling van Fmax en $(Fv)_m/Fm$. Het is nog niet duidelijk welk mechanisme verantwoordelijk is voor de verlaging van Fmax. Kyle (1987) geeft een aantal mogelijke oorzaken voor de lagere maximale fluorescentie na fotoinhibitie (figuur 55). Een futiele elektronencyclus rondom beschadigde PSII centra via cytb/f of via Qa behoort tot de mogelijkheden. Via cyclus zou lichtenergie zo snel worden omgezet in warmte, dat zelfs tijdens een lichtflits van 2000 W/m^2 accumulatie van gesloten PSII centra wordt voorkomen.

3.7 Relatie tussen fluorescentie parameters en elektronentransport

Zowel Weis en Berry (1987) als Genty et al (1988) ontwikkelden een methode om op basis van fluorescentie parameters het elektronentransport te berekenen. Het elektronentransport is een maat voor de CO_2-assimilatie (mits fotorespiratie niet van betekenis is). Het schatten van de CO_2 assimilatie m.b.v. fluorescentieparameters heeft belangrijke voordelen t.o.v. conventionele gasuitwisseling metingen. De fluorescentiemethode is echter nieuw en nog weinig beproefd op praktische hanteerbaarheid.

Beide methoden (Weis en Berry ; Genty) berekenen het lineaire elektronentransport (H_2O --> $NADP^+$) uit het elektronentransport van PSII, met de volgende basis vergelijking :

$$J = \Phi_p * q_p * Ia * C$$

waarin : J = elektronentransport (mol electronen.m^{-2}.sec^{-1})

Φ_p = aktuele lichtbenuttingsefficiëntie van "open" PSII centra

q_p = geschatte fractie "open" PSII centra

Ia = de hoeveelheid door het blad geabsorbeerde fotonen (mol fotonen.m^{-2}.sec^{-1})

C = everedigheidsconstante

De logica achter deze vergelijking :
Wanneer een foton in een "open" PSII centrum aankomt resulteert dit foton in fotochemie (=transport van één elektron) met een kans Φ_p. De kans om in een "open" PSII centrum terecht te komen wordt geschat door q_p (=fractie "open" PSII centra). Het product Φ_p*q_p geeft dus het overall kwantenrendement van de PSII centra. Voor het transport van één elektron moet zowel PSI als PSII een foton absorberen. Het geabsorbeerde licht (Ia) wordt daarom ongeveer gelijkelijk verdeeld over de reactiecentra van PSI en PSII. De everedigheidsconstante C corrigeert voor de fractie van het totale aantal geabsorbeerde fotonen dat aankomt bij de reactiecentra van PSII. UItgaande van een gelijke lichtverdeling over PSI en PSII geldt : C=0.50 .

3.7.1 Methode Weis en Berry

Weis en Berry veronderstellen dat er een lineaire relatie bestaat tussen q_E en Φ_p (zie figuur 43a). Op basis van deze figuur leiden zij af dat :

$$\Phi_p = \Phi_{po} - q_E * (\Phi_{po} - \Phi_{pe})$$

Hierin is Φ_{po} = de efficiëntie van een "open" PSII bij q_E=0
Φ_{pe} = de efficiëntie van een "open" PSII bij q_E=1

Weis en Berry veronderstellen dat een PSII van een hoge efficiëntie (Φ_{po}) omgeschakeld kan worden naar een lage efficiëntie (Φ_{pe}). q_E zou een maat zijn voor de fractie PSII

centra met een lage efficiëntie. In een recent artikel (Weis en Lechtenberg,1989) wordt aangegeven dat de relatie tussen q_E en Φ_p niet volledig lineair is. Binnen het traject $0<q_E<0.8$ gaat lineariteit redelijk op. De uiteindelijke vergelijking voor het elektronentransport wordt :

$$J = \Phi_s * Ia * C = q_p * (\Phi_{po}-q_E(\Phi_{po}-\Phi_{pe})) * Ia$$

waarin : J = elektronentransport (mol elektronen.m^{-2}.sec^{-1})
Ia = geabsorbeerde lichtintensiteit (mol fotonen.m^{-2}.sec^{-1})
Φ_s = overall kwantenrendement van PSII centra (gemiddeld over "gesloten" en "open" centra)

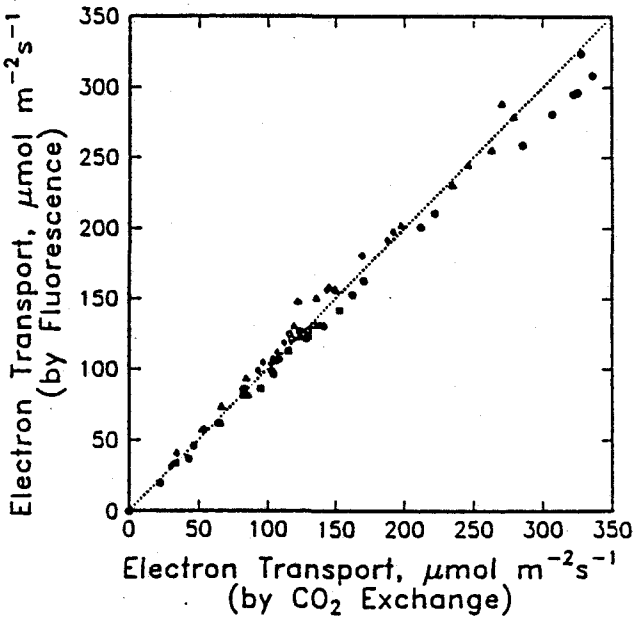
In deze vergelijking is de evenredigheids constante C reeds verwerkt in Φ_{po} en Φ_{pe}. Het schatten van Φ_{po} en Φ_{pe} vindt plaats door Φ_p uit te zetten tegen q_E. Φ_p wordt berekend door Φ_s (gemeten via gasuitwisseling) te delen door de fractie "open" PSII centra (gemeten via q_p).

$$\Phi_p = \Phi_s / q_p$$

Φ_s wordt berekend uit de hoeveelheid door het blad opgenomen CO_2 en de geabsorbeerde hoeveelheid licht (Ia).

$$\Phi_s = \text{opgenomen } CO_2 * 4 / Ia$$

De factor 4 dient voor de omrekening van mol CO_2 naar mol elektronen. q_p en q_E worden berekend uit fluorescentiemetingen. Wanneer Φ_{po} en Φ_{pe} eenmaal bekend zijn, kan het elektronentransport berekend worden uit de fluorescentieparameters q_E en q_p, zonder verdere noodzaak voor gasuitwisseling metingen. Het berekende elektronentransport via de methode van Weis en Berry



Figuur 56. Relatie tussen het, volgens de methode van Weis en Berry, berekende electronentransport (y-as) en het berekende electronentransport uit de CO_2-opname (x-as). (voor Phaseolus vulgaris en Helianthus annuus) (uit: Weis en Berry,1987)

blijkt goed overeen te stemmen met het gemeten elektronentransport via gasuitwisseling (figuur 56). Ook andere onderzoeksresultaten bevestigen deze relatie. Nadeel van de methode is dat allereerst Φ_{Po} en Φ_{Pe} geschat moeten worden door de koppeling van fluorescentie gegevens aan gasuitwisseling gegevens.

3.7.2 Methode Genty et al

Deze methode blinkt uit in zijn eenvoud. I.p.v. Φ_P af te leiden uit een vooraf vastgestelde relatie tussen q_E en Φ_P, wordt Φ_P rechtstreeks geschat uit $(Fv)_s/Fs$. $(Fv)_s/Fs$ wordt berekend uit de maximale (Fmax of Fs) en de minimale (Fo of Fo') fluorescentie. Eerder werd afgeleid dat een op deze manier berekende $(Fv)_s/Fs$ in iedere toestand ($0<q_E<1$) een schatting levert van Φ_P.

Volgens Genty et al kan het elektronentransport dan ook berekend worden door :

$$J = \Phi_s * Ia = q_P * (Fv)_s/Fs * Ia * C$$

Waarin : J = elektronentransport (mol elektronen.m^{-2}.sec^{-1})

Φ_s = overall kwantenrendement van de PSII centra (gemiddeld over "gesloten" en "open" centra)

q_P = schatting voor de fractie "open" PSII centra

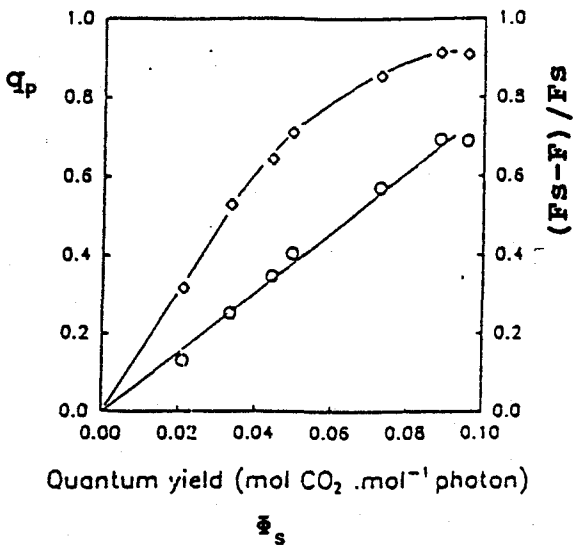
$(Fv)_s/Fs$ = schatting voor de lichtbenuttingsefficiëntie van "open" PSII centra

Ia = de door het blad geabsorbeerde hoeveelheid fotonen (mol fotonen.m^{-2}.sec^{-1})

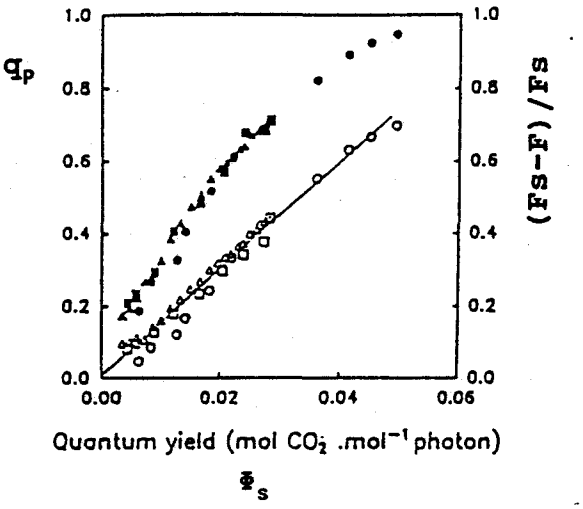
C = evenredigheidsconstante

Nader uitwerken van q_P en $(Fv)_s/Fs$ levert :

$$J = \Phi_s * Ia = (Fs-F)/(Fs-Fo') * (Fs-Fo')/Fs * Ia * C$$



Figuur 57. Relatie tussen het geschatte kwantenrendement via (Fs-F)/Fs (y-as) en het berekende kwantenrendement (Φ_s) uit de gemeten O_2 productie (x-as) (o). Tevens is de relatie tussen Φ_s en q_p weergegeven (◇). (C_3-plant gerst) (uit: Genty et al,1988)



Figuur 58. Relatie tussen het geschatte kwantenrendement via (Fs-F)/Fs (y-as) en het berekende kwantenrendement (Φ_s) uit de gemeten O_2 productie (x-as) (open symbolen). Tevens is de relati tussen Φ_s en q_p weergegeven (gesloten symbolen). (C_4-plant maïs) (uit: Genty et al,1988)

$$J = \Phi_s * Ia = (Fs-F)/Fs * Ia * C$$

Hierin is : F = de intensiteit van de fluorescentie bij lichtintensiteit I

Fs = de intensiteit van de fluorescentie bij lichtverzadiging

Genty et al toetsten hun vergelijking, door het overall kwantenrendement (Φ_s) uit te zetten tegen de fluorescentieparameter (Fs-F)/Fs. Φ_s werd geschat uit de CO_2-opname en de lichtintensiteit I. Voor het gemak werd aangenomen dat Ia=I. Φ_s werd uitgedrukt in mol CO_2.mol^{-1} fotonen. In figuur 57 is voor het C3-gewas gerst, Φ_s uitgezet tegen (Fs-F)/Fs. De figuur bevestigt de lineaire relatie tussen Φ_s en (Fs-F)/Fs. Uit de figuur blijkt een richtingscoëfficiënt gelijk aan 8.

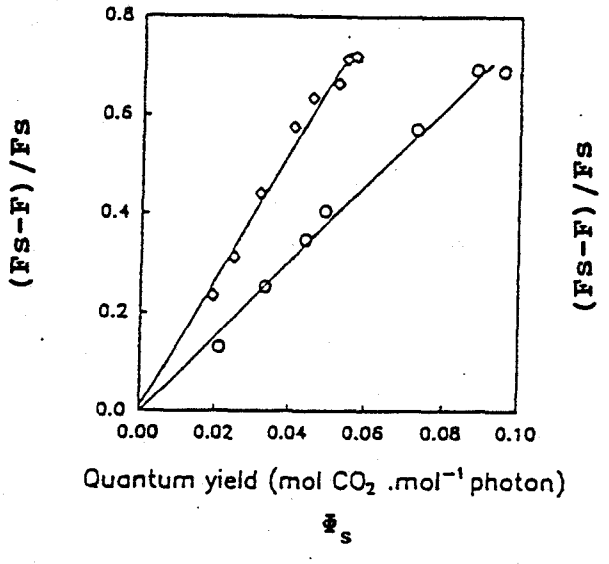
$$\Phi_s = (Fs-F)/Fs * 1/8$$

De factor 1/8 is opgebouwd uit een correctie voor de lichtverdeling over PSI en PSII centra (=1/2) en uit een correctie voor omrekening van mol elektronen naar mol CO_2 (=1/4). Voor de opname van 1 mol CO_2 moeten immers 4 elektronen worden getransporteerd. Genty et al toetsten de geldigheid van hun relatie tevens bij het C4-gewas maïs (figuur 58). Hoewel ook hier lineariteit goed opgaat is de richtingscoëfficiënt t.o.v. het C3-gewas gerst verhoogd tot 13.33 . Of te wel :

$$\Phi_s = (Fs-F)/Fs * 1/13.33$$

Ook hier is de correctiefactor opgebouwd uit een correctie voor de lichtverdeling over PSI en PSII centra en een correctie voor de omrekening van elektronen naar mol CO_2.

$$1/13.33 = ? * 1/4 \iff ? = 30\%$$

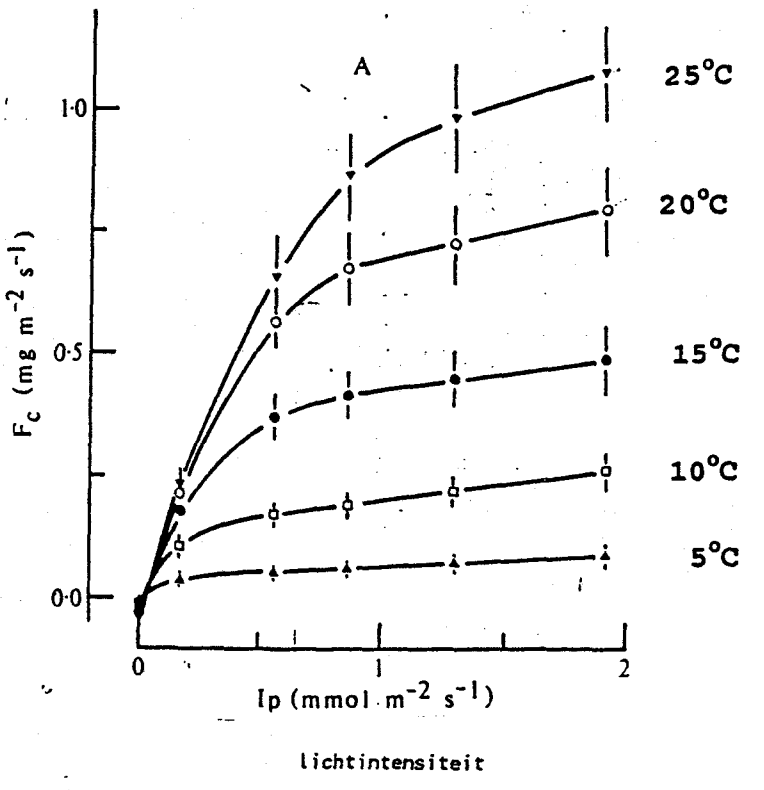


Figuur 59. Relatie tussen het geschatte kwantenrendement via (Fs-F)/Fs (y-as) en het berekende kwantenrendement (Φ_s) uit de gemeten O_2 productie (x-as). (o) normaal type gerst ; (◇) chlorofyl-b deficiënte mutant van gerst. (uit: Genty et al,1988)

In plaats van een gelijke lichtverdeling over PSI en PSII zoals bij het C3-gewas gerst, wordt bij het C4-gewas maïs slechts 30% van de geabsorbeerde lichtenergie toebedeeld aan PSII. Het is bekend dat het C4 metabolisme extra ATP vereist. Deze extra ATP wordt geproduceerd door cyclisch elektronentransport rond PSI en cyt b/f. Dit is de reden dat bij het C4-gewas maïs meer dan de helft van de fotonen wordt verbruikt in PSI centra.

Een vergelijkbare scheve verdeling van lichtenegie over PSI en PSII werd door Genty et al gevonden bij een mutant van gerst welke deficiënt was voor chlorofyl-b. Hierdoor was de antennegrootte van PSII sterk afgenomen en veranderde de lichtverdeling ten gunste van PSI. Ook dan neemt de richtingscoëfficiënt toe (figuur 59).

Zowel de methode van Weis en Berry als die van Genty et al blijken, mits goed geëikt, een goede voorspellende waarde te hebben. Voor de toepassing van de methode van Genty et al, is het slechts nodig F en Fs te bepalen en te weten of men aan een C4 dan wel een C3-gewas aan het meten is. Het gebruik van de onduidelijke parameter q_E maakt de methode van Weis en Berry mijns inziens minder populair dan de heldere en eenvoudige methode van Genty et al.



Figuur 60. Lichtrespons curven van de CO_2-assimilatie per eenhei bladoppervlak van maïs (F_c) bij verschillende bladtemperaturen. (uit: Long et al,1983)

4. TOEPASSINGEN VAN CHLOROFYL-FLUORESCENTIE IN STRESS-FYSIOLOGIE

In dit hoofdstuk wordt slechts ingegaan op de toepassing van de chlorofylfluorescentie meettechniek, bij de detectie van effecten van lage temperatuur op het fotochemisch apparaat. De toepassingsmogelijkheden voor chlorofylfluorescentie liggen echter veel breder (effecten van hitte (Bilger et al,1987), droogte- (Schreiber en Bilger,1987 ;Schapendonk et al,1988), hitte en droogte (Havaux et al,1988), SO_2 en NH_3 begassing (v. Kooten et al,1988).

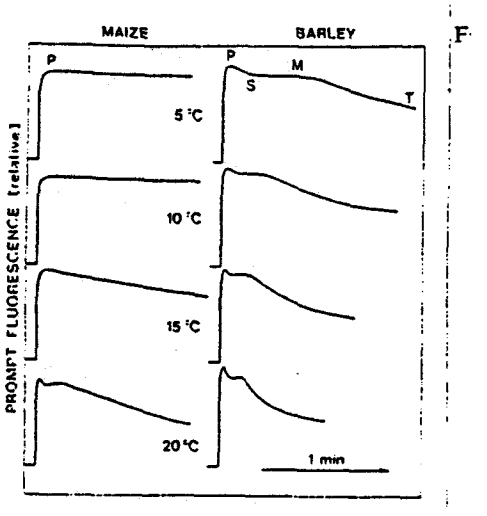
4.1 Detectie van effecten van koude op het fotochemisch apparaat m.b.v. chlorofylfluorescentie

Lage temperaturen (0-15 °C) kunnen nadelige gevolgen hebben voor het fotochemisch apparaat van met name warmte minnende soorten (maïs, katoen, sorghum). De nadelige effecten van lage temperaturen zijn [1] een direkte verlaging van de aktiviteit van het fotosynthese proces, [2] remming van de biosynthese van een nieuw fotochemisch apparaat in jonge bladeren en [3] beschadiging van een reeds opgebouwd of van het in opbouw zijnde fotochemisch apparaat.

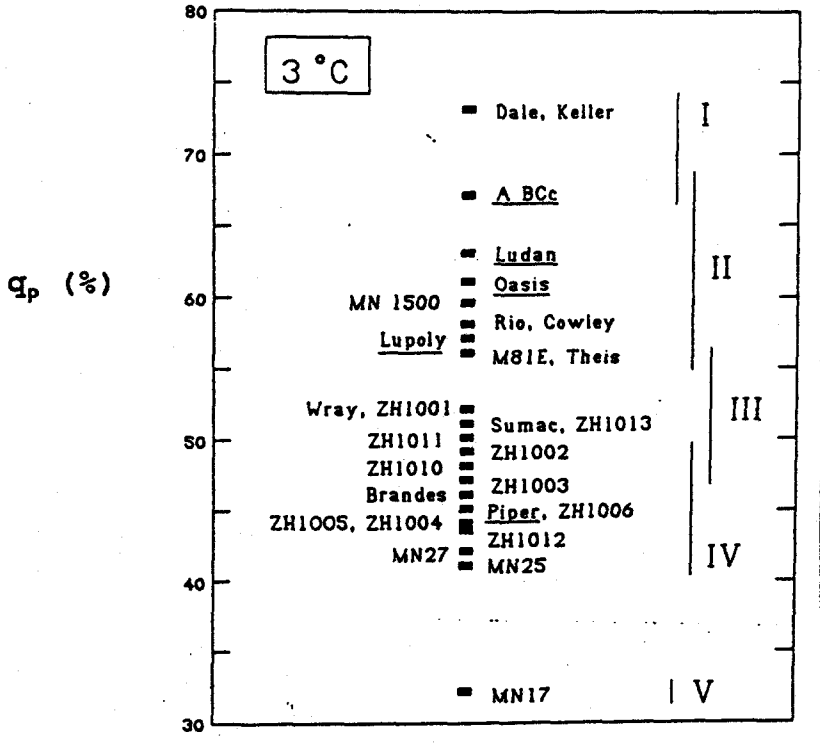
4.1.1 Verlaging van de aktiviteit

Long et al (1983) bepaalden de fotosynthese lichtresponscurve van maïs bij verschillende temperaturen (figuur 60). Duidelijk is dat de aktiviteit vooral bij hoge lichtintensiteit sterk temperatuur afhankelijk is.

Havaux en Lannoye (1984) constateerden dat ook de vorm van de fluorescentie inductiecurve temperatuur afhankelijk is. De temperatuurgevoeligheid van de inductiecurve was bij maïs (warmte



Figuur 61. Chlorofylfluorescentie inductiecurven gemeten bij eei temperatuur varierend van 5 tot 20 °C bij maïs (links) en gerst (rechts). (uit: Havaux en Lannoye,1984)

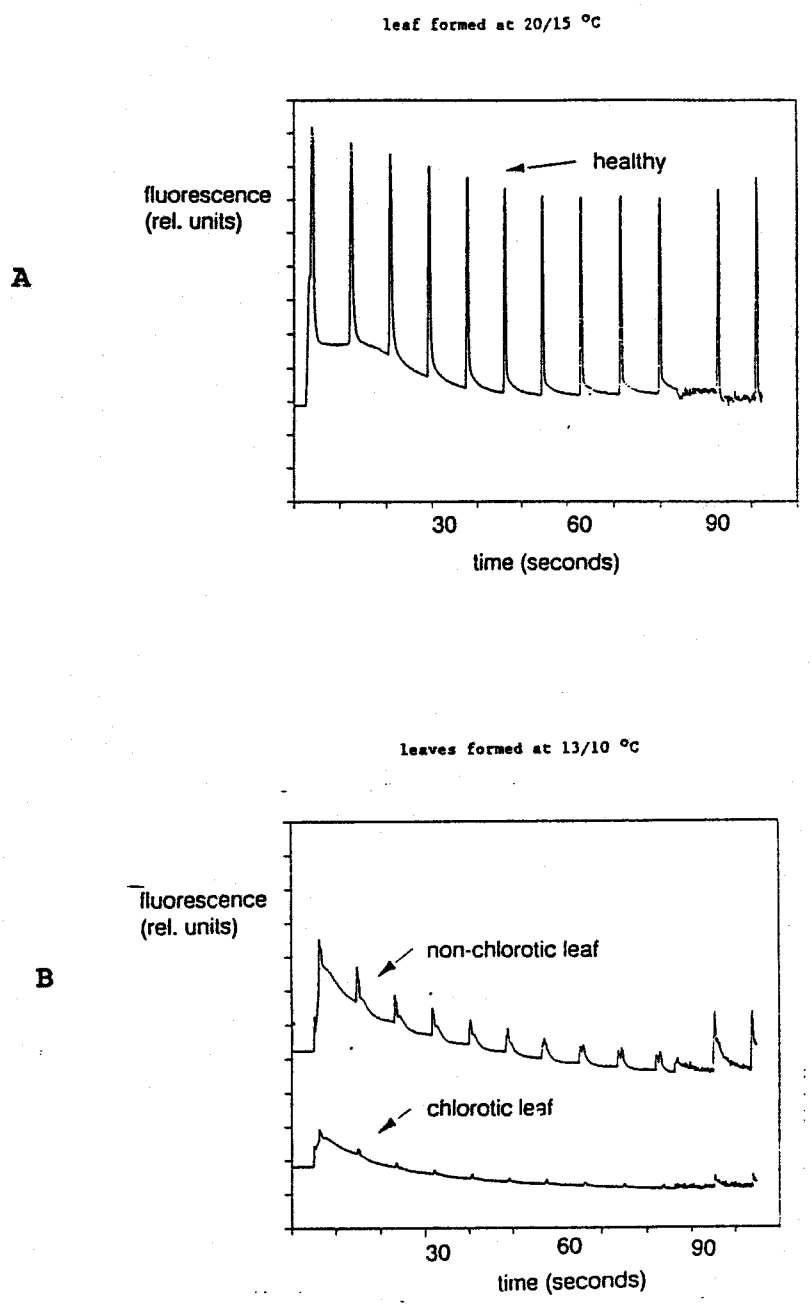


Figuur 62. Verlaging van $q_p(q_Q)$ bij 28 verschillende sorghum genotypen gemeten bij 3°C. (q_p bij 3°C is uitgedrukt als percentage van q_p bij 25°C) (uit: Havaux,1989)

minnend) veel groter dan bij gerst (koudetolerant) (figuur 61).

Havaux (1989) ontwikkelde op basis van de temperatuurrespons van de fluorescentieparameter q_p een detectie methode voor koudetolerantie. Bij koudegevoelige soorten (maïs, katoen, sorghum, boon) bleek q_p sterker temperatuur afhankelijk dan bij koudetolerante soorten (spar, gerst, erwt) (zie figuur 39). Bij 4°C daalde q_p bij koudegevoelige soorten tot 30 á 60% van de waarde bij 25 °C. Bij koudetolerante soorten varieerde q_p bij 4°C tussen de 90 á 100% van de waarde bij 25°C. Havaux concludeerde hieruit dat q_p gemeten bij 4°C wellicht een maat geeft voor het niveau van koudetolerantie. Binnen de soort sorghum vond Havaux(1989) een enorme genotypische spreiding in de temperatuurrespons van q_p (figuur 62). De reductie van q_p bij een temperatuurverlaging van 25°C naar 3°C varieerde tussen de 25 en 70%. Rassen met een geringe verlaging van q_p bleken onder veldomstandigheden koudetolerant. Bij drie maïslijnen werd een correlatie gevonden tussen de gevoeligheid van q_p voor temperatuur en de gevoeligheid van de lijn voor schade door chilling bij 1°C (Havaux,1987). Havaux beweert dat de temperatuurrespons van q_p een geschikt selectiecriterium voor koudetolerantie is.

De verlaging van q_p bij lage temperatuur wordt volgens Havaux (1989) verklaard door het onvermogen van de plant om bij de lage temperatuur het elektronentransport te reguleren. Een gebrekkige regulering leidt tot een ophoping van gereduceerde PSII centra ($P680.Qa^-$). Volgens Weis en Lechtenberg (1989) en Krause en Behrend (1986) kan dat leiden tot beschadiging van het fotochemisch apparaat (fotoinhibitie). Ophoping van gereduceerde PSII centra zou de kans op de vorming van O_2-radicalen vergroten. De temperatuurrespons van q_p kan dus een maat zijn voor de gevoeligheid voor fotoinhibitie. Dit zou de correlatie tussen de temperatuurrespons van q_p en koudetolerantie kunnen verklaren.



Figuur 63. Fluorescentie inductiecurven van maïsbladeren [A] gevormd bij 20°C en [B] gevormd bij 13°C. (chlorotic= blad van chlorose gevoelig genotype; non-chlorotic= blad van chlorose resistent genotype) (Haalstra,ongepubliceerd)

4.1.2 Remming van de biosynthese

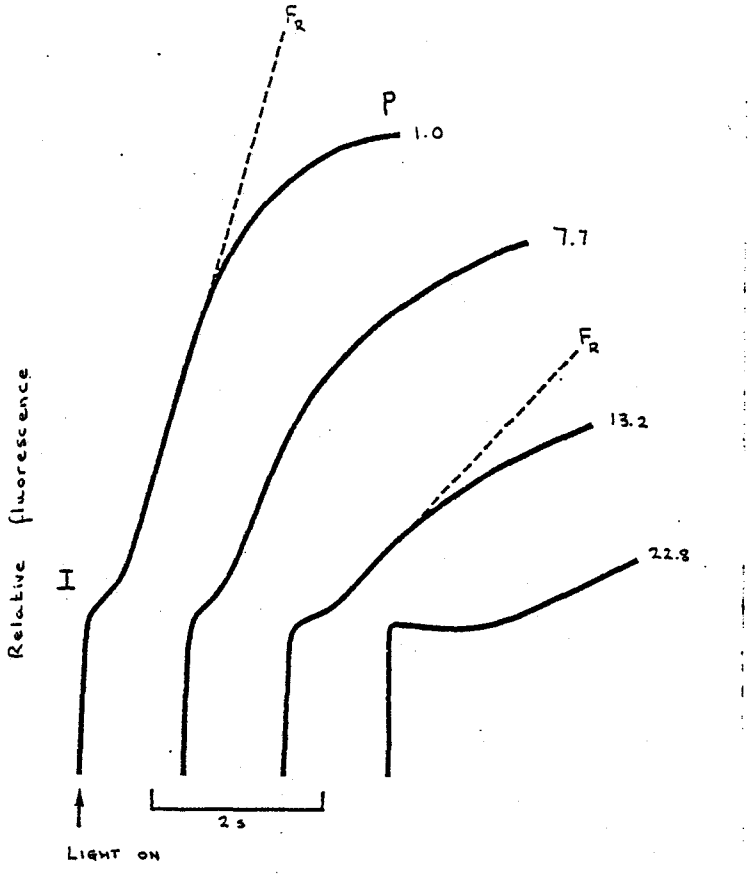
Er werd geen literatuur gevonden waarin de remming van de synthese van het fotochemisch apparaat werd bestudeerd m.b.v. fluorescentie. Haalstra (1988,ongepubliceerd) kwantificeerde de mate waarin opbouw plaats vond, m.b.v. de fluorescentieparameters $(Fv)_m/Fm$ en (Fs-F)/Fs. Bladeren gevormd bij 13 °C hadden bij 20°C een veel lagere fotosyntheseaktiviteit dan bladeren gevormd bij 20°C. Dit kwam ook duidelijk tot uitdrukking in lage waarden voor $(Fv)_m/Fm$ en (Fs-F)/Fs bij 20°C. Er werden aanzienlijke genetische verschillen gevonden. Het effect van de lage temperatuur tijdens de bladvorming kwam het meest tot uiting bij chlorose-gevoelige genotypen (figuur 63). Haalstra concludeert dat fluorescentie metingen de mogelijkheid bieden om de resistentie tegen het remmende effect van lage temperatuur op de synthese van het fotochemisch apparaat te kwantificeren.

4.1.3 Beschadiging

Beschadiging van het fotochemisch apparaat kan optreden door lage temperatuur alleen, of door een combinatie van lage temperatuur en licht. Beschadiging door lage temperatuur alleen wordt in dit rapport aangeduid met **"chilling"**. Beschadiging door lage temperatuur in combinatie met licht wordt in dit rapport aangeduid met **"fotoinhibitie"**. In de literatuur worden de begrippen chilling en fotoinhibitie door elkaar gebruikt.

4.1.3.1 chilling

Chilling kan optreden bij temperaturen tussen 0 en 12 °C (Miedema, 1982). De mate waarin schade optreedt is afhankelijk van de temperatuur en de duur van de behandeling. Schade symptomen worden veelal pas zichtbaar na afloop van de chilling condities, na verhoging van de temperatuur. Typische chilling symptomen zijn verwelking en bleking van de bladeren. Bij ernstige chilling kunnen planten of delen van planten afsterven. Schade aan membramen wordt gezien als de primaire oorzaak van



Figuur 64. Het effect van chilling bij 0°C op de I-P fase van de inductie curve van chlorofyl fluorescentie. (de duur van de chilling behandeling varieerde van 1.0 tot 22.8 uur) (uit: Hetherington et al,1987)

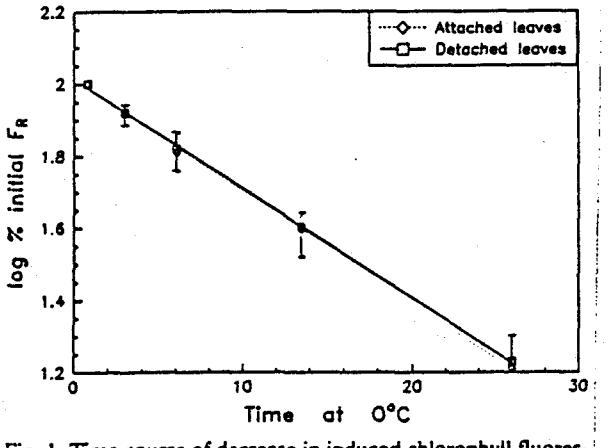


Fig. 1. Time course of decrease in induced chlorophyll fluorescence in attached and detached primary leaves of Northern Belle maize. Leaves were chilled as described in Materials and methods. Values are logarithms of the mean F_R (n = 10) at the times indicated, expressed as a percentage of the initial reading (at 10.8 h). −SE is shown for attached leaves and +SE for detached leaves. Lines of best fit are shown (r^2 = 0.9988 for attached leaves and 0.9992 for detached leaves).

Figuur 65. Verloop van log(F_R) uitgezet tegen de duur van de chilling behandeling bij 0°C. (uit: Smillie et al,1987)

chilling (Miedema,1982). Het is dan ook niet verwonderlijk dat dit ook effect heeft op het fotochemisch apparaat. Long et al (1983) vonden dat na een koude nacht (5°C) de fotosynthese aktiviteit de volgende dag 50% lager lag dan bij de controle (geen koude nacht).

Hetherington et al (1987) gebruikten chlorofylfluorescentie bij de bepaling van de chilling gevoeligheid van drie verschillende populaties van maïs. Als maat voor chilling schade gebruikten zij de reductie in de maximum snelheid (F_R) waarmee de fluorescentie toeneemt van I naar P (figuur 64). Chilling leidde tot lagere waarden voor F_R. De verlaging van F_R door chilling wordt verklaard door beschadiging van het watersplitsend systeem (OEC). Dit membraangebonden comlex zou bij lage temperatuur uiteen vallen.

Smillie et al (1987) vonden een lineair verband tussen log(F_R) en de duur van de chilling behandeling (figuur 65). De chilling gevoeligheid van de populaties werd gekwantificeerd door de behandelingsduur bij 0°C benodigd voor een halvering van F_R ($T_{½}$). Voor een koudetolerante populatie (confite pueno, afkomstig uit het hoogland van Peru) was $T_{½}$=11,8 uur. Voor een noordelijke flint populatie (AS-G) was $T_{½}$=9,4 uur , en voor een corn-belt dent-populatie (AS-D) was $T_{½}$=8,4 uur.

Hetherington en Oquist (1988) vonden dat de omvang van de schade door chilling gemeten via de reductie van F_R, goed gecorreleerd kon worden aan de reductie van de post-chilling groei bij jonge maïsplanten. Hetherington en Oquist vermeldden ook dat een goede correlatie bestond tussen de reductie in F_R en visuele chilling symptomen aan het blad. Hetherington et al geven aan dat de reductie van F_R gebruikt kan worden als criterium bij de selectie op chilling resistentie.

F_R heeft een vrij grote coëfficiënt van variatie. Schattingen op basis van gegevens van Hetherington et al (1987) lopen uiteen van 15 tot 50%. Voor een redelijke bepaling van F_R zijn dus meerdere herhalingen noodzakelijk. Smillie et al (1987) concluderen dat de chilling gevoeligheid bepaald kan worden aan losse bladponsjes. Doordat gewerkt kan worden met kleine bladponsjes zijn meerdere herhalingen per plant gemakkelijk te realiseren. Janssen (Janssen en v.Hasselt,1988) ontwikkelde op de RU-Groningen apparatuur voor een geautomatiseerde screening op basis van bladponsjes.

4.1.3.2 Fotoinhibitie

Fotoinhibitie staat voor de beschadiging van het fotochemisch apparaat o.i.v. overtollige lichtenergie. Deze vorm van koudeschade onderscheidt zich van chilling (chilling treedt ook op in het donker). Long et al (1983) bestudeerden het effect van een koudeperiode op de fotosynthese aktiviteit. De fotosynthese aktiviteit bleef ook na herstel van de temperatuur gereduceerd. De grootste reductie werd verkregen wanneer de koudebehandeling werd gegeven in het licht. Bij nader onderzoek (Long et al,1983) bleek de mate van reductie van de fotosynthese een eenvoudige functie van lichtintensiteit, temperatuur en duur van de behandeling. Haalstra (ongepubliceerd) combineerde deze gegevens tot één vergelijking. Uit deze vergelijking blijkt dat het schadelijke effect van licht (fotoinhibitie) wordt versterkt door een lage temperatuur.

$$\% \text{ reductie} = (I-200) * d * (20-T) * 0.005/15$$

waarin : % reductie = reductie van maximale fotosynthese
I = lichtintensiteit $\mu E/m^2/sec$; $I>200$)
d = duur van de behandeling (uren)
T = temperatuur tijdens de behandeling ($0<T<20$)

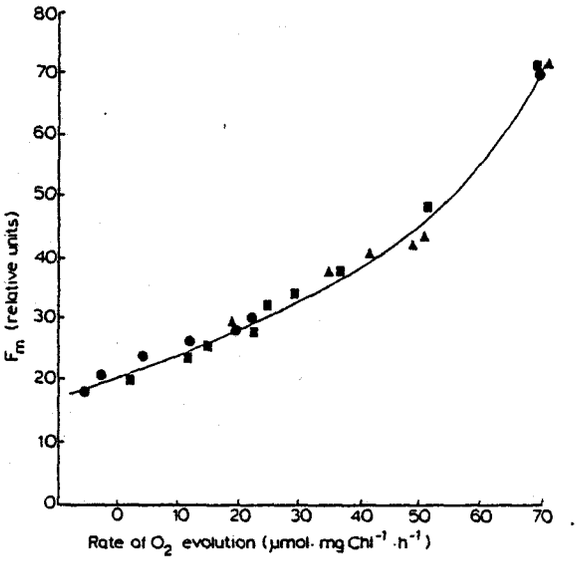


Fig. 7.11. Comparison between the F_M level of fluorescence and the rate of O_2 evolution assayed using 100 μmol photons·m^{-2}·s^{-1} after different extents of photoinhibitory treatment (■) and during recovery from 40 min (●) and 10 min (▲) photoinhibition.

Figuur 66. Het effect van fotoinhibitie op de maximale fluorescentie (Fm) uitgezet tegen het effect van fotoinhibitie (de O_2-productiesnelheid bij lage lichtintensiteit (Φ_{02}).

Ook Taylor en Rowley (1971) vonden dat de mate van beschadiging bij lage temperatuur een functie was van de lichtintensiteit en duur van de behandeling. Fotoinhibitie bij 10°C en 215 W/m^2 leidde na 3 dagen tot een volledige remming van de fotosynthese bij sorghum. Terwijl bij 50 W/m^2 de fotosynthese tot slechts 40% werd gereduceerd.

Baker en Horton (1987) geven een voorbeeld van fotoinhibitie in het veld. Op dagen waarbij de temperatuur bij zonsopkomst lager was dan 8°C en de lichtintensiteit tussen zonsopkomst en 9:30 uur gemiddeld hoger was dan 600 $\mu E/m^2/sec$ traden duidelijke veranderingen op in de fluorescentie. Zij concluderen daaruit dat het optreden van fotoinhibitie in het veld, een mogelijke oorzaak is van opbrengsreductie in koele klimaten.

Fotoinhibitie leidt door beschadiging van PSII centra tot een verlaagd kwantenrendement. Fotoinhibitie komt niet direkt tot uiting in de fotosynthese snelheid bij lichtverzadiging. Pas wanneer zoveel PSII centra zijn beschadigd, dat, zelfs bij het op volle snelheid draaien van de onbeschadigde PSII centra, het elektronentransport limiterend is voor de fotosynthese, zal fotoinhibitie zichtbaar worden in de maximale fotosynthesesnelheid.

Baker en Horton (1987) vinden een correlatie tussen het effect van fotoinhibitie op Fm en het effect op de O_2 productie-snelheid bij lage lichtintensiteit (O_2 productie snelheid bij lage lichtintensiteit levert een schatting van de lichtbenuttingsefficiëntie) (figuur 66).

Onderzoek van Bjorkmann (1987) toont aan dat de door fotoinhibitie verlaagde lichtbenuttingsefficiëntie het best kan

worden gekwantificeerd door verschuivingen in $(Fv)_m/Fm$. De parameter $(Fv)_m/Fm$ als indicator van fotoinhibitieschade heeft volgens Bjorkmann de volgende voordelen :

[1] niet gestresste bladeren vertonen weinig variatie in $(Fv)_m/Fm$
[2] $(Fv)_m/Fm$ is een direkte maat voor de gemiddelde lichtbenuttingsefficiëntie van PSII centra
[3] verlagingen van $(Fv)_m/Fm$ door fotoinhibitie correleren goed met verlagingen van het gemeten kwantenrendement voor O_2-productie
[4] $(Fv)_m/Fm$ is eenvoudig en snel te bepalen aan een klein stukje blad

Bovenstaande voordelen maken de parameter $(Fv)_m/Fm$ uitermate geschikt voor het kwantificeren van fotoinhibitie in het veld, bij verschillende gewassen en bij verschillende genotypen.

LITERATUUR

Anderson, J.M. (1986) Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoïd membranes. Ann. Rev. Plant Physiol. 37 : 93-136.

Anderson, J.M. en C.B. Osmond (1987) Shade-sun responses: compromises between acclimation and photoinhibition. In : Photoinhibition (Kyle,D.J., C.B. Osmond en C.J. Arntzen, eds.) pp 1-38

Andréasson, L.E. en T. Vanngard (1988) Electron transport in photosystems I and II. Ann. Rev. Plant Physiol. 39 : 379-411.

Baker, N.R., T.M. East en S.P. Long (1983) Chilling damage to photosynthesis in young Zea mays. II Photochemical function of thylakoïds in vivo. J. Exp. Botany 139 : 189-197.

Baker ,N.R. en P. Horton (1987) Chlorophyll fluorescence quenching during photoinhibition. In : Photoinhibition (Kyle,D.J., C.B. Osmond en C.J. Arntzen, eds.) pp 145-168.

Baret, F. , G. Guyot en D., Major (1988) Coupled fluorescence and reflectance measurements to improve crop production evaluation. In : Applications of chlorophyll fluorescence (H.K. Lichtenthaler, ed) pp 345-353

Bilger, W., U. Heber en U. Schreiber (1988) Kinetic relationship between energy-dependent fluorescence quenching, light scattering, chlorophyll luminescence and proton pumping in intact leaves. Z. Naturforsch. 43c : 877-887.

Bilger, W. en U. Schreiber (1986) Energy-dependent quenching of

dark level chlorophyll fluorescence in intact leaves. Photosynthesis research 10 : 303-308.

Bilger, W., U. Schreiber en O.L. Lange (1987) Chlorophyll fluorescence as an indicator of heat induced limitation of photosynthesis in Arbutus unedo. Presented at NATO conference in Portugal.

Bjorkmann, O. (1987) Low temperature fluorescence in leaves and its relationship to photon yield of photosynthesis. In : Photoinhibition (Kyle,D.J., C.B. Osmond en C.J. Arntzen, eds.) pp 123-144.

Butler, W. (1978) Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis.
Ann. Rev. Plant Physiol. 29 : 345-378

Chritchley (1981) Plant Physiol. 67 : 1161-1165.

Dietz, K.J., U. Schreiber en U.Heber (1985) The relationship between the redox state of Q_A and photosynthesis in leaves at various carbon dioxide, oxygen and light regimes.
Planta 166 : 219-226.

Genty, B., J.M. Briantais en N.R. Baker (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochimica et Biophysica Acta 990 : 87-92.

Glazer, A.N. en A. Melis (1987) Photochemical reaction centres : structure, organisation and fuction. Ann. Rev. Plant Physiol. 38 : 11-45.

Gooodwin & Mercer (1983) Introduction to plant biochemistry.

second edition pp 92 - 161.

Haehnel, W. (1984) Photosynthetic electron transport in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 35 : 659-693.

Hasselt, P.R. (1988) Temperature dependence of in-vivo chlorphyll fluorescence as affected by DCMU. In : Applications of chlorophyll fluorescence (H.K. Lichtenthaler, ed) pp 121-126.

Havaux, M. (1987) Effects of chilling on the redox state of the primary electron acceptor Q_A of photosystem II in chilling-sensitive and resistant plant species.
Plant Physiol. Biochem. 25(6) : 735-743.

Havaux, M. (1989) Fluorimetric determination of the genetic variability existing for chilling tolerance in sweet sorghum and sudan grass. Plant breeding 102 : 327-332.

Havaux, M., M. Ernez en R. Lannoye (1988) Correlation between heat tolerance and drought tolerance in cereals demonstrated by rapid chlorophyll fluorescence tests.
J. Plant Physiol. 133 : 555-560.

Havaux, M. en R. Lannoye (1984) Effects of chilling temperatures on prompt and delayed chlorophyll fluorescence in maize and barley leaves. Photosynthetica 18(1) : 117-127.

Hetherington, S.E., R.M. Smillie, H.A. Eagles en A.K. Hardacre (1987) Using chlorphyll fluorescence in vivo to measure the chilling tolerances of different populations of maize.

Holtzwarth, A.R. (1988) Time resolved chlorophyll fluorescence. What kind of information on photosynthetic systems does it provide? In : Applications of chlorophyll fluorescence (H.K.

Lichtenthaler, ed) pp 21-31.

Janssen, L.H.J. en P.R. v. Hasselt (1988) Temperature-induced alterations of in vivo chlorophyll-a fluorescence induction in cucumber as affected by DCMU.
Photosynthesis research 15 : 153-162.

Kooten, O. v. (1988) Photosynthetic free energy transduction. Modelling electrochemical events. Proefschrift pp.111.

Kooten, O. v., B. v. Hove en K.J. v. Wijk (1988) The effect of long term exposition of poplars to low concentrations of SO_2 and NH_3. In : Applications of chlorophyll fluorescence (H.K. Lichtenthaler, ed) pp 203-209.

Krause, G.H. en U. Behrend (1986) pH-dependent chlorophyll fluorescence quenching indicating a mechanism of protection against photoinhibition of chloroplasts. FEBS 3575 Vol. 200 , 2 : 298-302.

Krause, G.H. en H. Laasch (1987) Energy-dependent chlorophyll fluorescence quenching in chloroplasts correlated with quantum yield of photosynthesis. Z. Naturforsch. 42c : 581-584.

Krause, G.H. en E. Weis (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II Interpretation of fluorescence signals. Photosynthesis research 5 : 139-157.

Krause, G.H. en E. Weis (1988) The photosynthetic apparatus and chlorophyll fluorescence an introduction. In : Applications of chlorophyll fluorescence (H.K. Lichtenthaler, ed) pp 3-11.

Kyle, D.J. (1987) The biochemical basis for photoinhibition of photosystem II. In : Photoinhibition (Kyle,D.J., C.B. Osmond en

C.J. Arntzen, eds.) pp 197-226.

Lichtenthaler H.K. en U. Rinderle (1988) Chlorophyll fluorescence signatures as vitality indicator in forest decline research. In : Applications of chlorophyll fluorescence (H.K. Lichtenthaler, ed) pp 143-151

Long, S.P., T.M. East en N.R. Baker (1983) Chilling damage to photosynthesis in young Zea mays. I Effects of light and temperature variation on photosynthetic CO_2-assimilation. J. Exp. Botany 34 : 177-188.

Melis, A., G.E. Guenther, P.J. Morrissey en M.L.Ghirardi (1988) Photosystem II heterogeneity in chloroplasts. In : Applications of chlorophyll fluorescence (H.K. Lichtenthaler, ed) pp 33-45

Maas, S.J. en J.R. Dunlap (1989) Reflectance, transmittance and absorption of light by normal, etiolated and albino corn leaves. Agron. J. 81 : 105-110.

Miedema, P. (1982) The effects of low temperature on Zea mays. Advances in Agronomy, 35 : 93-128.

Nobel, P.S. (1970) Plant cell physiology; a physiochemical approach. University of California, Los Angeles. (D. Kennedy en R.B. Park, eds.) pp 267

Ogren, E. en G. Oquist (1984) Physiol. Plantarum 62 : 187-192.

Oquist, G., D.H. Greer en E. Ogren (1987) Light stress at low temperature. In : Photoinhibition (Kyle,D.J., C.B. Osmond en C.J. Arntzen, eds.) pp 67-87.

Oxborough, K. en P. Horton (1987) Characterisation of the effects

of antimycine-A upon high energy state quenching of chlorophyll fluorescence (q_E) in spinach and pea chloroplasts. Photosynthesis Research 12 : 119-128.

Quanning, L. en E.A. Nothnagel (1989) Fluorescence and delayed light emission from mesophyll and bundle sheath cells in leaves of normal and salt treated Panicum-miliaceum. Plant Physiol. (1989) : 211-219.

Quick en Horton (1986) Biochimica et Biophysica Acta 849 : 1-6.

Rinderle U. en H.K. Lichtenthaler (1988) The chlorophyll fluorescence ratio F690/F735 as a possible stress indicator. In Applications of chlorophyll fluorescence (H.K. Lichtenthaler, ed pp 189-197

Schafer, C. en O. Bjorkmann (1989) Relationship between efficiency of photosynthetic energy conversion and chlorophyll fluorescence quenching in upland cotton (Gossypium hirsutum L.) Planta : 367-376

Schreiber, U. (1986) Detection of rapid induction kinetics with new type of high-frquency modulated chlorophyll fluorometer. Photosynthesis research 9 : 261-272

Schreiber, U. en W. Bilger (1987) Rapid assesment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements In : Plant response to stress (Tenhunen, J.D.,eds.)

Schreiber, U. , C. Klughammer en C. Neubauer (1989) Measuring P700 absorbance changes around 830nm with a new type of pulse modulation system.

Schreiber U., U. Schliwa en W. Bilger (1986) Continuous recordi

of photochemical and non-photochemical chlorphyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynthesis Research 10 : 51-62

Schmidt, W. (1988) Luminescence of organic molecules theory and analytical applications in photosynthesis. In : Applications of chlorophyll fluorescence (H.K. Lichtenthaler, ed) pp 211-216

Smillie, R.M., R. Nott, S.E. Hetherington en G. Oquist (1987) Chilling injury and recovery in detached and attached leaves measured by chlorophyll fluorescence. Physiol. Plantarum 72 : 241-247.

Taylor, A.O. en J.A. Rowley (1971) Plants under climatic stress. I Low temperature, high light effects on photosynthesis. Plant Physiol. 47 : 713-718.

Walker, D.A. (1988) Some aspects of the relationship between chlorophyll-a fluorescence and photosynthtic carbon assimilation. In : Applications of chlorophyll fluorescence (H.K. Lichtenthaler, ed) pp 13-20.

Weis, E. en J.A. Berry (1987) Quantum efficiency of photosystem II in relation to energy dependent quenching of chlorophyll fluorescence. Biochimica et Biophysica Acta 894 : 198-208.

Weis, E. en D. Lechtenberg (1989) Fluorescence analysis during steady-state photosynthesis. Plnt. Trans R. Soc. Lond. B. 323 : 253-268.

Wrisher, M. (1989) Ultrastructural localisation of photosynthetic activity in thylakoïds during chloroplast development in maize. Planta 177 : 18-23.