

CARACTERIZAÇÃO FOTOQUÍMICA DE CLONES DE *Coffea canephora* Pierre ex Froehner CULTIVADOS EM CONDIÇÕES DE PLENO SOL¹

Guilherme Augusto Rodrigues de Souza², Igor Damasceno Pires³, Basílio Cerri Neto⁴, Rizia Joyce Costa⁵, Laísa Zanelato Correia⁶, Thayanne Rangel Ferreira⁷, Kayo Cesar Corrêa Lima⁸, Fernanda Rodrigues Nunes e Silva⁹, José Altino Machado Filho¹⁰, Sara Dousseau Arantes¹¹, Antelmo Ralph Falqueto¹², Lúcio de Oliveira Arantes¹³

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

²Mestrando em Produção Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, guilherme.rodrigues@edu.uniube.br

³Bolsista de Iniciação Científica, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES/CEUNES, São Mateus, ES, igordpires@gmail.com

⁴Mestrando em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, ES, basiliocerri@yahoo.com.br

⁵Bolsista no Incaper – CPDI Norte, Linhares – ES, r.joycecosta@gmail.com.

⁶Mestrando em Produção Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos

⁷Mestranda em Agricultura Tropical, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES/CEUNES, São Mateus, ES, thayanne_rangel@hotmail.com

⁸Bolsista no Incaper – CPDI Norte, Linhares – ES, correokayocesar@outlook.com

⁹Mestranda em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, ES, fernandarns@hotmail.com

¹⁰Pesquisador, Dsc, Incaper – CPDI Norte, Linhares – ES, altino@incaper.es.gov.br

¹¹Pesquisadora, Dsc, Incaper – CPDI Norte, Linhares – ES, sara.arantes@incaper.es.gov.br

¹²Professor, Dsc, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, ES, antelmofalqueto@yahoo.com.br

¹³Pesquisador, MS, Incaper – CPDI Norte, Linhares – ES, lucio.arantes@incaper.es.gov.br

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar seis clones de *C. canephora* Pierre ex Froehner cultivados sob condições de pleno sol, a fim de caracterizá-los de acordo com suas respostas fotoquímicas, obtidas por meio da análise da fluorescência da clorofila a. Para isso, o experimento foi conduzido na Fazenda Experimental do Incaper, localizada no município de Sooretama – ES, onde foram dispostos quatro blocos, dentro dos quais foram cultivados aleatoriamente os seis clones supracitados, caracterizando um delineamento em blocos casualizados. Para avaliação da emissão de fluorescência, foram selecionadas folhas pertencentes ao terceiro ou quarto par de folhas completamente expandidas em ramos plagiotrópicos do terço superior das plantas de café. Em cada parcela experimental foram selecionadas três plantas aleatórias, nas quais as medições foram efetuadas. Antes das medições, as folhas selecionadas foram adaptadas ao escuro por meio da utilização de pinças foliares específicas para este procedimento, e após 30 minutos de adaptação foram submetidas a um pulso de luz saturante de 3500 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilizando-se o *Handy-PEA* (Hansatech instruments). Os dados coletados foram processados e submetidos às normalizações propostas por Strasser e Strasser (1995) para avaliação da diferença cinética na curva OJIP para os seis clones. Os resultados mostraram que entre os clones avaliados, o clone 83 mostrou-se mais estável para fluxo de elétrons no PSII, isso porque cultivado em pleno sol ele manteve amplitudes negativas para as normalizações ΔVOP , ΔVOJ , ΔVOK e ΔVOI , enquanto os demais clones manifestaram amplitudes positivas, sendo o clone 16 o mais significativo. Já para a taxa de redução global de aceptores do PSI (ΔVIP) o clone 83 não se mostrou tão eficiente. Mas em termos gerais o clone 83 demonstrou, a partir de suas características fotoquímicas, maior potencial para cultivo a pleno sol.

PALAVRAS-CHAVE: Fluorescência da clorofila a, café conilon, desempenho fotoquímico, estresse luminoso.

PHOTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *Coffea canephora* Pierre ex Froehner CLONES CULTIVATED IN FULL SUN CONDITIONS

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate six *C. canephora* Pierre ex Froehner clones cultivated under full sun conditions in order to characterize them according to their photochemical responses, obtained by chlorophyll a fluorescence analysis. For this, the experiment was conducted at Incaper Experimental Farm, located in the municipality of Sooretama - ES, where four blocks were arranged, within which the six aforementioned clones were randomly cultivated, characterizing a randomized block design. For fluorescence emission evaluation, leaves belonging to the third or fourth pair of fully expanded leaves in plagiotropic branches of the upper third of coffee plants were selected. In each experimental plot three random plants were selected, in which measurements were made. Before the measurements, the selected leaves were adapted to the dark by the use of specific leaf clamps for this procedure, and after 30 minutes of adaptation they were submitted to a 3500 μmol photon $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ saturating light pulse using Handy-PEA (Hansatech instruments). The collected data were processed and submitted to the normalization proposed by Strasser and Strasser (1995) to evaluate the kinetic difference in the OJIP curve for the six clones. The results showed that among the evaluated clones, clone 83 was more stable for electron flux in the PSII, because in full sun it maintained negative amplitudes for the normalization ΔVOP , ΔVOJ , ΔVOK and ΔVOI , while the other clones showed positive amplitudes, being clone 16 the most significant. For the overall PSI acceptor reduction rate (ΔVIP), clone 83 was not as efficient. But in general terms clone 83 demonstrated, from its photochemical characteristics, greater potential for full sun cultivation.

KEY WORDS: Chlorophyll a fluorescence, conilon coffee, photochemical performance, light stress.

INTRODUÇÃO

As espécies de café, tanto *Coffea arabica* quanto *Coffea canephora*, são originárias de regiões tropicais da África, onde evoluíram como espécies lenhosas de sub-bosque, e devido a esta característica as primeiras plantações de café foram implantadas em sistema de sombreamento, a partir do consórcio com plantas arbóreas de alto porte (Ferrão et al., 2016). Claramente o consórcio de lavouras cafeeiras com espécies florestais apresenta inúmeros benefícios ao desenvolvimento da cultura em questão, como a melhoria na qualidade de frutos e bebida do café, aumento na eficiência de uso da água e nitrogênio, redução dos índices de bionalidade, redução de infestação de plantas daninhas, bem como uma gama de outros benefícios. Entretanto, apesar das vantagens demonstradas pelo desenvolvimento do cafeeiro em condições de sombreamento a grande maioria das lavouras cultivadas no Brasil são conduzidas sob condições de pleno sol, haja vista, a maior intensidade luminosa incidente sobre a cultura e, portanto, maior possibilidade de aumento da produtividade, por meio da potencialização das taxas fotossintéticas líquidas (A) das plantas (DaMatta, 2004).

De acordo com diversos autores, as taxas de fotossíntese líquida do café, principalmente *C. canephora*, são relativamente baixas, com valores máximos próximos de $11 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, o que demonstra a baixa eficiência fotossintética do café em relação a outras plantas lenhosas. Devido a isto a saturação fotossintética em plantas de café ocorrem com cerca de 1/3 da radiação incidente sobre a copa, o que gira em torno de 550 a 700 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fazendo com que todo o excedente de energia incidente seja dissipado (Ronchi & DaMatta, 2016).

A dissipação de energia de plantas de café cultivadas a pleno sol pode ser altamente eficiente quando estas se encontram sob ótimas condições de nutrição e disponibilidade hídrica, no entanto, sob condições adversas a dissipação energética pode ocorrer de maneira ineficiente, ocasionando a fotoinibição, que caracteriza-se como um processo indesejável que compromete a manutenção das taxas de fotossíntese líquida da planta. Este processo pode ocorrer em dois estágios, sendo o primeiro a fotoinibição dinâmica, que consiste no decréscimo reversível da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (PSII) e está associada à dissipação de energia na forma de calor e a mecanismos fotoprotetores. O segundo estágio é a fotoinibição crônica, que ocorre em decorrência da ineficiência de mecanismos fotoprotetores para dissipação de energia, a qual é direcionada para o oxigênio molecular dissolvido no meio intracelular formando espécies reativas de oxigênio, responsáveis pela ocorrência de danos estruturais na maquinaria fotossintética (Batista, 2011).

A ocorrência de danos na etapa fotoquímica que podem comprometer a eficiência fotossintética global das plantas pode ser monitorada por meio da técnica de medição da intensidade de emissão de fluorescência pelas moléculas de clorofila *a* presentes nas folhas. Esta técnica, chamada simplesmente de Fluorescência da Clorofila *a*, tem sido amplamente usada em estudos de estresses em plantas justamente por ser uma técnica muito sensível e útil na avaliação do desempenho fotossintético, fornecendo uma gama de informações referentes à estrutura e funcionamento do aparato fotossintético, desde a absorção da energia luminosa pelos complexos antena até a transferência de energia entre os fotossistemas I e II (Stirbet et al., 2018). Uma das metodologias de medição da fluorescência muito usual preconiza a adaptação de folhas ao escuro por um determinado tempo e logo após estas folhas são submetidas a um pulso de luz saturante, e a análise da emissão de fluorescência em função do tempo após a saturação luminosa permite a avaliação da chamada Curva de Kautsky, que fornece importantes informações sobre a eficiência no transporte de elétrons através do PSII (Stirbet e Govindjee, 2012).

O uso desta técnica como mecanismo para avaliação das respostas de diferentes materiais em condições estressantes, como no caso da alta intensidade luminosa, pode ser, portanto, uma excelente ferramenta utilizada para caracterização e seleção de variedades ou clones de café que demonstrem melhores respostas quando cultivados em condições de pleno sol, objetivando-se sempre a potencialização da produtividade. Por tanto, neste trabalho foram avaliados seis clones de *C. canephora* Pierre ex Froehner cultivados a pleno sol, objetivando a caracterização das respostas fotoquímicas dos mesmos em função das análises do transiente O-J-I-P da curva de Kautsky, por meio da fluorescência rápida da clorofila *a*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na fazenda experimental de Sooretama – ES, pertencente ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), onde foram dispostos 4 blocos nos quais foram cultivados seis clones de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, aqui denominados clones 03, 14, 16, 19, 83 e 153, a fim de avaliar comparativamente estes clones em função de suas respostas fotoquímicas em condições de pleno sol. As plantas foram avaliadas após três anos de cultivo em sistema de sequeiro, em dias ensolarados durante o mês de setembro de 2018, cuja radiação média incidente sobre o experimento era de $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, valor obtido por meio da mensuração da Radiação Fotossinteticamente Ativa ao longo dos horários de coleta de dados, utilizando uma barra quântica LightScout (*Spectrum Technologie, Inc.*).

Para avaliação do desempenho fotoquímico dos clones descritos acima por meio da análise da indução da fluorescência transiente da clorofila *a*, foram realizadas mensurações no período entre 7h e 10h da manhã utilizando-se o fluorímetro portátil *Handy-PEA* (Hansatech). Previamente a realização das avaliações foram selecionados ramos plagiotrópicos no

terço superior das plantas, nos quais selecionou-se uma folha completamente expandida do terceiro ou quarto par de folhas, contados a partir do ápice do ramo. As folhas selecionadas foram adaptadas ao escuro durante trinta minutos utilizando-se cliques foliares (*leaf-clip*) apropriados, e logo após ao período de adaptação emitiu-se um pulso de luz saturante de $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fótons sobre a folha utilizando o equipamento descrito anteriormente. Após a coleta os dados foram devidamente processados e submetidos às análises do transiente OJIP e suas respectivas normalizações, como proposto por Strasser e Strasser (1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 traz a representação da Curva Polifásica Padrão da emissão de fluorescência da clorofila *a* para os seis clones avaliados neste experimento, e a partir da análise destas curvas é possível observar que todos os clones se mantiveram fotossinteticamente ativos, pois demonstraram a forma polifásica da curva representada pelas fases O-J-I-P. Nesta figura observa-se que o clone 153 apresentou maiores valores da fluorescência inicial, representada pela fase “O”, e maiores valores para fluorescência máxima, indicada pela fase “P”. O clone 83 demonstrou menores valores da fluorescência inicial, e o clone 03 apresentou menores valores de fluorescência máxima, enquanto os demais materiais mostraram-se intermediários na emissão de fluorescência nestas fases.

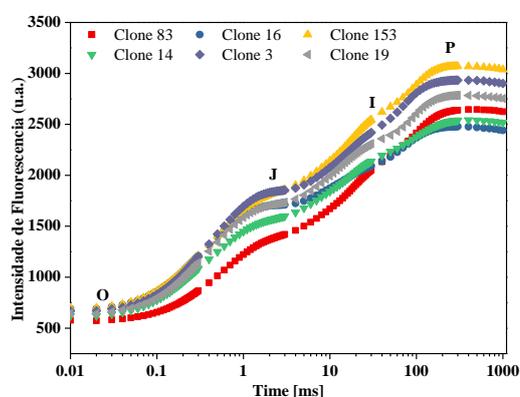


Figura 1. Curva polifásica de emissão da fluorescência da clorofila *a*, para diferentes clones de *Coffea canephora* cultivados sob condições de pleno sol.

Para melhor evidenciar as diferenças cinéticas entre as fases do transiente OJIP foram realizadas duplas normalizações, afim de realizar a determinação da fluorescência variável na Fase O-P (Figura 2a) e do ΔVOP (Figura 2b). Para efeito de cálculos, o clone 153 foi utilizado como controle por apresentar o pico de F_m mais proeminente comparativamente aos outros materiais. A amplitude positiva da curva ΔVOP indica o aumento no acúmulo de quinona A no estado reduzido (QA^-) o que compromete diretamente o fluxo de elétrons além deste receptor em direção aos receptores finais do fotossistema II (PSII) e iniciais do fotossistema I (PSI).

Como observado neste trabalho todos os clones cultivados a pleno sol manifestaram amplitude positiva do ΔVOP , excetuando-se o clone 83, o que demonstra que este material sob condições de pleno sol apresenta maior eficiência no transporte de elétrons além de QA^- , caracterizando, portanto, maior tolerância deste clone ao excesso de radiação. De acordo com Strasser et al. (2000) plantas cultivadas sob condições de alta intensidade luminosa tendem a apresentar maior comprometimento na eficiência de transporte de elétrons em direção ao PSI, devido ao fato do aumento no acúmulo de QA em estado reduzido.

A figura 3 apresenta a dupla normalização efetuada entre as fases O (20 μs) e J (2 ms), também chamada de banda K, para determinação da Fluorescência variável relativa entre O-J (A) e do ΔVOJ (B) que caracteriza a diferença cinética entre estes pontos. A amplitude positiva entre as fases O-J do ΔVOJ pode indicar o comprometimento do fluxo linear de elétrons em função da inativação do complexo de evolução do oxigênio (CEO) que é o responsável pela quebra das moléculas de água, e conseqüentemente, pela liberação de elétrons no lado doador do PSII, assim como pode indicar o aumento considerável do tamanho funcional do complexo antena. O surgimento da amplitude positiva ocorre devido ao fato da transferência de elétrons para o transportador Yz ocorrer de forma mais lenta do que a transferência de elétrons do P680 para QA (centro de reação do PSII), seja pela inativação do CEO ou pela maior condução de energia do complexo antena para o P680 (Strasser, 1997; Tomek et al., 2001; Gonçalves et al., 2010).

Como visto nos resultados todos os clones demonstraram uma amplitude positiva da banda K, exceto o clone 83 que também apresentou maior tolerância ao transporte linear de elétrons a partir do CEO. Enquanto o clone 16 caracterizou-se como o mais afetado.

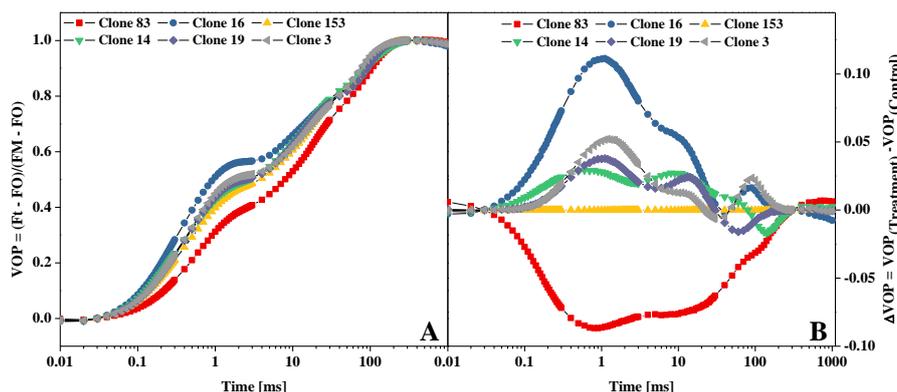


Figura 2. A: Fluorescência variável relativa entre os pontos 0,02 e 300 ms ou $Vop = (Ft - FO) / (FM - FO)$; B: Diferença cinética entre os pontos O (0,02 ms) e P (300 ms) ou ΔVop estabelecidas entre 0,01 e 300 ms a partir da normalização $\Delta VOP = [VOP_{(controle)} - VOP_{(tratamento)}]$, em diferentes clones de *Coffea canephora* cultivados sob condições de pleno sol.

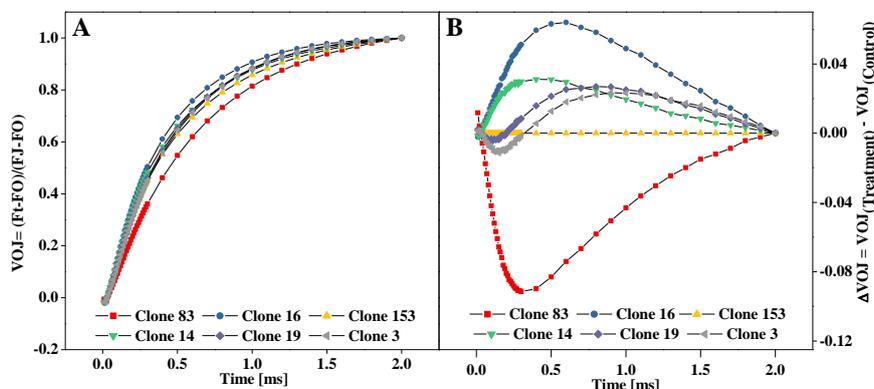


Figura 3. A: Normalização entre a fase O (obtido a 20 μ s) e a fase J (2 ms), como a cinética do $VOJ = (Ft - FO) / (FJ - FO)$; Variação da banda K (0,3 ms); B: ΔVOJ estabelecida entre 0 e 2 ms a partir da dupla normalização $\Delta VOJ = [VOJ_{(controle)} - VOJ_{(tratamento)}]$, em diferentes clones de *Coffea canephora* cultivados sob condições de pleno sol.

A figura 4 apresenta a dupla normalização na entre as fases O e K, também chamada de banda L, que está diretamente relacionada com a conectividade energética entre os transportadores do PSII, sendo que quanto maior a amplitude positiva da curva em ΔVOK menor é a conectividade entre as unidades do PSII (Strasser & Stirbet, 1998). Sendo assim, observa-se que somente os clones 14 e 16 demonstraram amplitude positiva, entretanto, não foram amplitudes grandes o suficiente para indicar a redução da conectividade energética entre transportadores de elétrons. Além disso, o clone 83 apresentou maior amplitude negativa, indicando a maior eficiência deste material na transferência energética entre os aceptores dentro do PSII.

As normalizações promovidas entre as Fases O e I, sendo $VOI < 1$ (Fig. 5A) e ΔVOI (Fig. 5B) possibilitam a compreensão da sequência de eventos desde a captura do excíton pelo PSII até a redução da plastoquinona (Yusuf et al., 2010). A amplitude positiva da diferença cinética entre as fases O-I demonstra a redução do transporte do excíton para redução da plastoquinona, sendo assim, é possível perceber que todos os clones, com exceção do 83, apresentaram aumento significativo da curva, indicando a diminuição do fluxo de energia em direção ao PSI.

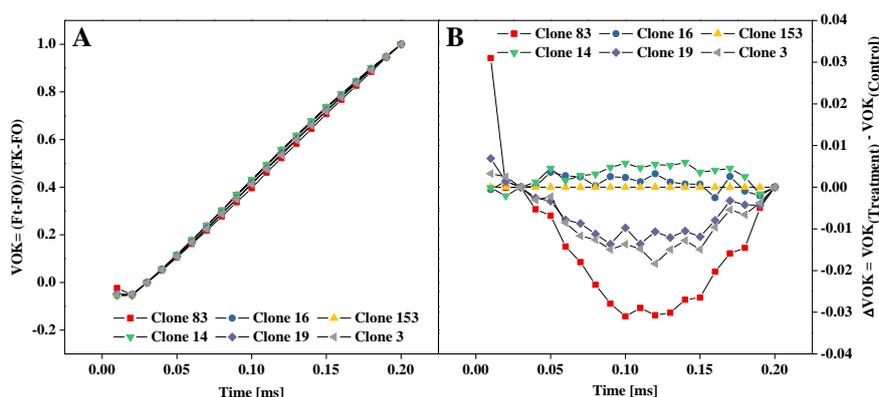


Figura 4. A: Normalização entre a fase O (20 μ s ou 20 ms) e a fase K (300 μ s ou 0,3 ms) apresentados como $VOK = (Ft-FO) / (FK-FO)$; B: Variação da banda L ou ΔVOK estabelecidas entre 0 e 0,3 ms a partir da dupla normalização $\Delta VOK = [VOK(\text{controle}) - VOK(\text{tratamento})]$, em diferentes clones de *Coffea canephora* cultivados sob condições de pleno sol.

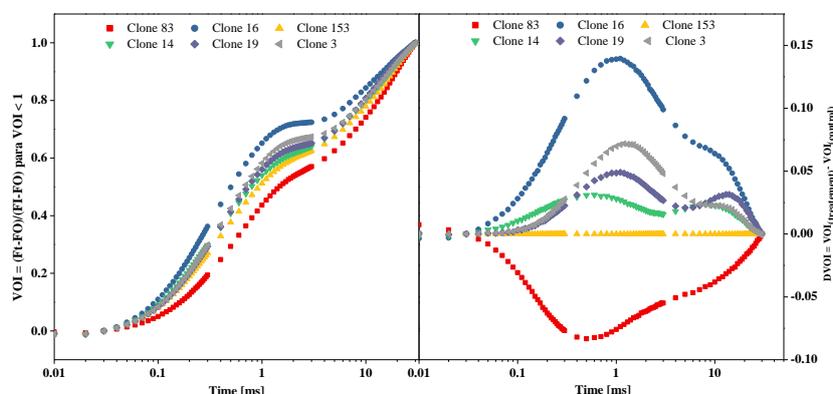


Figura 5. A: Normalização entre FO e FI onde $VOI = (Ft - FO) / (FI - FO)$, sendo $VOI < 1$ no intervalo de 30 a 300 ms e; B: diferentes cinéticas $\Delta VOI = [VOI(\text{tratamento}) - VOI(\text{controle})]$, em diferentes clones de *Coffea canephora* cultivados sob condições de pleno sol.

A dupla normalização realizada entre as fases I e P para Fluorescência variável relativa (Fig. 6A) e ΔVIP (Fig. 6B) indica a estimativa da taxa de redução dos aceptores do PSI, sendo que, o inverso do tempo para atingir $VIP = 0.5$ representa a velocidade do tempo de meia-vida para redução global de aceptores de elétrons do PSI (Adamski, 2011). Desta forma, observa-se neste trabalho que os clones 03 e 16 apresentaram tempo de meia-vida menor para completa redução do pool de aceptores de elétrons do PSI, enquanto os demais apresentaram taxas de redução menores, principalmente o clone 14. Apesar do fluxo de elétrons a partir do PSII não ter sido tão seriamente comprometido a partir da análise das normalizações anteriores, para o clone 83, a taxa de redução dos aceptores do PSI não se mostrou tão eficiente quando comparadas aos outros materiais cultivados sob as mesmas condições.

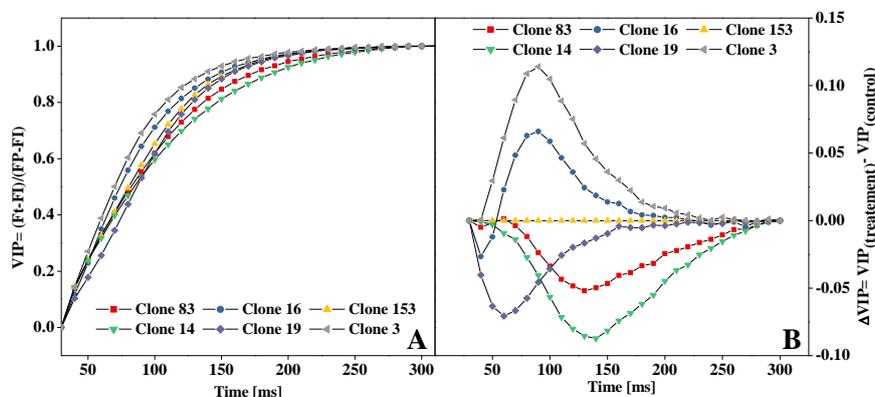


Figura 6. A: Normalizações entre FI e FP onde $VIP = (Ft - FI) / (FM - FI)$ no intervalo de 30 a 300 ms e; B: fluorescência variável relativa entre os pontos I-P ou $\Delta VIP = [VIP(\text{controle}) - VIP(\text{tratamento})]$

CONCLUSÕES

Os clones apresentam diferentes comportamentos fotoquímicos evidenciados por meio da análise do transiente OJIP, sendo que alguns materiais demonstram maior tolerância ao excesso de radiação luminosa ao qual estão expostos ao longo do dia. Por isso, é importante o conhecimento do material que se pretende cultivar a fim possibilitar o aumento da produtividade por meio da potencialização das taxas fotossintéticas de cada material, as quais podem ser mantidas a partir da utilização de clones que sejam mais tolerantes à ocorrência de fotoinibição. Dentre os clones aqui abordados o 83 destaca-se, por apresentar melhor comportamento fotoquímico nas mesmas condições em que os demais clones foram cultivados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSKI, J.M., PETERS, J.A., DANILOSKI, R., BACARIN, M.A. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. J. Plant Physiol. 168, 2056–2062, 2011.

- BATISTA, K. D., ARAÚJO, W. L., ANTUNES, W. C., CAVATTE, P. C., MORAES, G. A., MARTINS, S. C., & DaMATTA, F. M. 2012. Photosynthetic limitations in coffee plants are chiefly governed by diffusive factors. *Trees*, 26(2), 459-468.
- DaMATTA F.M. 2004. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. *Field Crops Res.*, 86, 99-114.
- FERRÃO, R. G., de Muner, L. H., da FONSECA, A. F. A., & FERRÃO, M. A. G. 2016. *Café Conilon*. Vitória, ES: Incaper, 2017.
- GONÇALVES, J. F. de C.; SILVA, C. E. ; GUIMARÃES D. G.; BERNARDES, R. S., Análise dos Transientes da Fluorescência da Clorofila a de Plantas Jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* Submetidas a Dois Ambientes de Luz. *Acta amazônica*, v.40 p. 89-98, 2010.
- RONCHI, C. P.; DAMATTA, F. M. 2016. Aspectos fisiológicos do café conilon. *Café Conilon*, v. 2, p. 103-129, 2007.
- STIRBET A., GOVINDJEE. 2012. Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynth. Res.* 113: 15-61.
- STIRBET, A. LAZÁR, D., & KROMDIJK, J. 2018. Chlorophyll a fluorescence induction: can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses?. *Photosynthetica*, v. 56, n. 1, p. 86-104.
- STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test. In: Mathis P, editor. *Photosynthesis: from light to biosphere*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 977–80, 1995.
- STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. 2000. The fluorescence transiente as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In YUMUS, M.; PATHRE, U.; MOHANTY, P (eds.), *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*, Taylor & Francis, 445-483 p.
- STRASSER, B. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. *Photosynthesis Research*, 52: 147-155, 1997.
- STRASSER R.J. STIRBET A.D. 1998. Heterogeneity of photosystem II probed by the numerically simulated chlorophyll a fluorescence rise (O-J-I-P). *Math Comput Simulat*, 48:3–9.
- TOMEK, P.; LAZÁR, D.; ILÍK, P; NAUS, J. On intermediate steps between the O and P steps in chlorophyll a fluorescence rise measure at different intensities of exciting light. *Australian Journal Plant Physiology*, 28: 115-1160, 2001.
- YUSUF, M. A., KUMAR, D., RAJWANSHI, R., STRASSER, R. J., TSIMILLI-MICHAEL, M., GOVINDJE. 2010. Overexpression of c-tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1428–1438.