

Aula P-5 - Taxa de Fotossíntese e Problemas

Dr^a Luísa Carvalho

Determinação da taxa fotossintética

Analisador de gás-por Infra vermelho (infra-red gas analyzer, IRGA)

Os IRGAs medem concentrações de dióxido de carbono (CO_2). A taxa de absorção de CO_2 por uma folha pode ser medida colocando a folha numa câmara transparente, fazendo passar ar sobre a folha e medindo com o IRGA a variação da concentração de CO_2 após a passagem pela câmara.

O funcionamento destes aparelhos baseia-se na capacidade de absorção do infra-vermelho que a maioria dos gases e vapores orgânicos, cujas moléculas são constituídas por dois ou mais átomos diferentes (ex: CO_2 , vapor de água, NH_3), têm. Um IRGA (Figura 1) é constituído essencialmente por três partes: uma fonte de infra-vermelhos, o detetor e duas colunas, uma de análise e outra de referência.

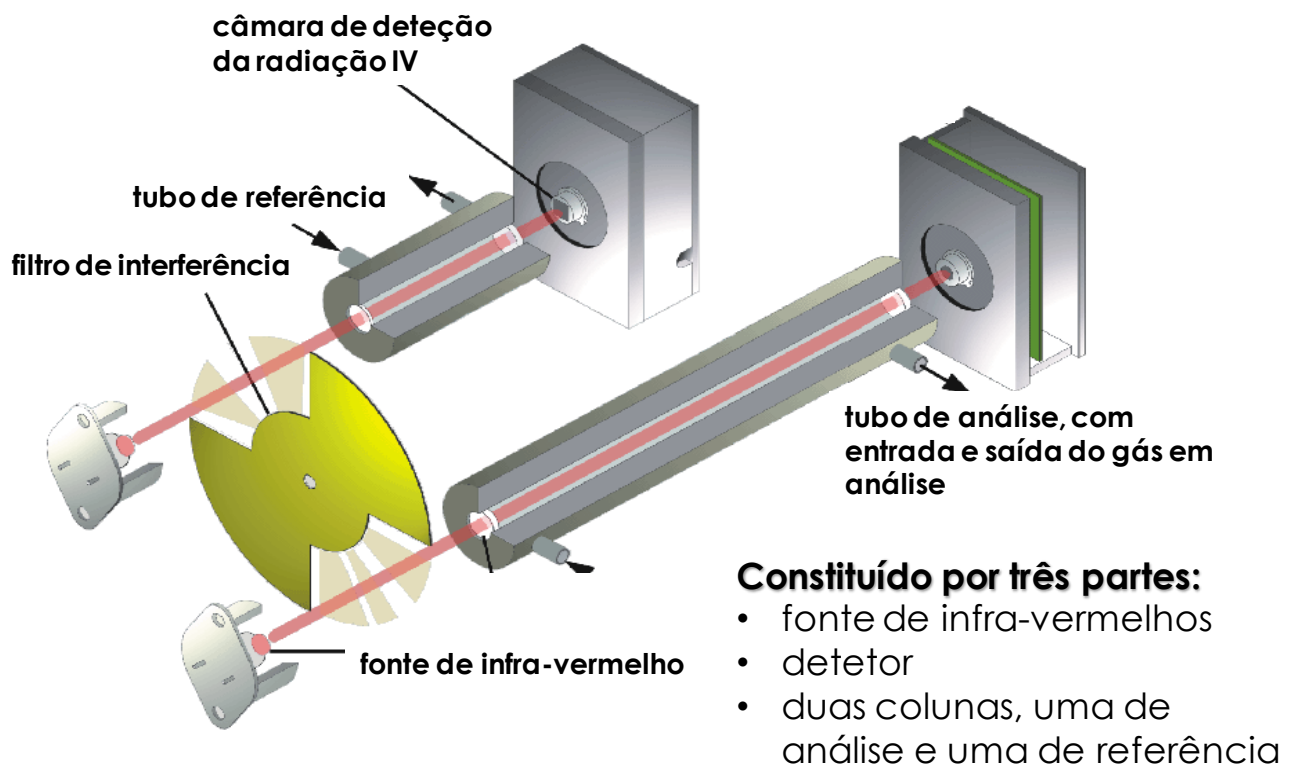


Figura 1. Esquema de um IRGA: A – fonte de infra-vermelho; B – filtro de interferência; C – tubo de referência; D – tubo de análise; E e F – entrada e saída do gás em análise; G – câmara de deteção da radiação IV.

O feixe de radiação produzido é dividido em dois, por meio de refletores, de modo a que uma parte vá atravessar a coluna de referência e a outra a coluna de análise. Ambas as colunas possuem janelas de fluorite na extremidade superior e inferior, as quais originam uma transmissão máxima da radiação IV. Quando a radiação atravessa qualquer dos tubos é absorvida proporcionalmente à concentração de CO₂ que estiver presente. A medida da radiação transmitida é efetuada com um detetor colocado na extremidade inferior das colunas. O sinal eléctrico obtido permite-nos saber a diferença de concentração de CO₂ entre os dois tubos, desde que se tenha realizado previamente a calibração do aparelho com gases de concentrações conhecidas de CO₂. Dada a possível interferência do vapor de água (visto que também absorve radiação IV) nas medidas das trocas de CO₂ a maioria dos aparelhos está equipada com filtros especiais que apenas deixam passar os comprimentos de onda do IV que o CO₂ absorve.

Atualmente a maioria dos sistemas de medida do CO₂ utilizam o IRGA num modo diferencial, o que permite detetar variações muito pequenas na concentração de CO₂. Neste processo o ar passa pela coluna de referência antes de entrar na câmara que contém a folha, seguindo depois para a coluna de análise. A diferença entre os valores das duas colunas dá-nos o CO₂ consumido em cada momento pelo tecido foliar.

As taxas de fotossíntese são calculadas pela expressão:

$$PN = f \Delta C / A$$

Sendo PN a taxa de fotossíntese líquida, ΔC a variação na concentração de CO₂ antes e depois de passar através da câmara, f a velocidade do ar no circuito e A a área do tecido foliar colocado na câmara.

Medições com um IRGA:

1. Condutância estomática

Os estomas representam a principal resistência ao fluxo difusivo do vapor de água através das folhas. Medições da resistência estomática (r_s) ou do seu inverso, a condutância estomática (g_s), são deste modo importantes para estabelecer a influência dos estomas na transpiração e/ou na troca de outros gases entre os tecidos foliares e a atmosfera envolvente.

O porómetro de difusão “steady state” mede a taxa de transpiração de uma folha uncluída numa câmara. O princípio básico de medida é o seguinte: ar seco entra numa câmara ventilada a uma taxa que é medida e que permite manter constante uma humidade do ar pré-determinada (em geral a humidade relativa do ar que rodeia a folha). Equilíbrio é mantido entre o fluxo de água transpirada e o fluxo de ar seco.

O fluxo de água devido à transpiração, T , é dado pela expressão:

$$T = \frac{C_{sat}(t_f) - C_a}{r} = \frac{f(C_a - C_i)}{A (g \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1})}$$

$C_{sat(tf)}$ – concentração de vapor de água da folha que se admite igual à concentração de vapor saturante, à temperatura da folha (tf)

C_a – concentração de vapor de água no ar da câmara

r – resistência total à difusão (somatório da resistência estomática (r_s) e da resistência da camada limite (r_a))

C_i – concentração de vapor de água do ar que entra na câmara e que, como é seco, é igual a zero.

A – área da superfície da folha exposta na câmara (cm^2)

F – fluxo de ar ($cm^3 s^{-1}$)

Da equação anterior obtém-se que:

$$r = \frac{C_{sat(tf)} - C_a}{C_a \times A/f} \quad (s \text{ cm}^{-1})$$

$$r = \frac{1}{g} = \left(\frac{1}{HR} - 1 \right) A/f$$

HR – humidade relativa do ar na câmara

Sendo HR e A constantes e conhecidas, r é função única do influxo de ar seco (f).

A resistência ou condutância estomática serão então definidas por:

$$r_s = \frac{1}{g} = \left(\frac{1}{HR} - 1 \right) A/f - r_a$$

O modelo de porómetro steady-state que utilizamos (Li-6400, Li-COR), além de medir a resistência estomática, dá-nos ainda informação sobre:

-temperatura da folha (medida com um termopar chromel-constantan)

- temperatura da câmara

- radiação fotossinteticamente ativa (PAR) incidindo sobre a folha (medida com um sensor de quantum e expressa em $\mu E m^{-2} s^{-1}$).

2. Fotossíntese e transpiração a CO_2 ambiente com o sistema de medição do CO_2/H_2O por infra/vermelho (da Walz) em circuito aberto

Este sistema de medida é constituído essencialmente por três partes:

- câmara de medida
- analisador de gás em modo diferencial para o CO₂ e para o vapor de água (Binós, da Leybold Heraeus)
- unidade munida de um visor digital, que centraliza as informações recebidas do IRGA e dos sensores instalados na câmara e que contém ainda as bombas para a circulação de ar e os controladores de fluxo.

Com este esquema a funcionar em circuito aberto, a folha ligada à planta é colocada na câmara de medida durante 1 a 2 minutos o que permite obter uma boa estimativa da taxa fotossintética aparente antes da folha começar a aquecer e de serem alteradas as suas condições de funcionamento.

A câmara do porómetro é de forma cilíndrica e possui um volume de 70 cm³, permitindo abranger uma área máxima de tecido foliar de 19,6 cm² (correspondente a um disco de 5 cm de diâmetro). A câmara é tapada com uma fina película de polietileno e a circulação do ar no interior impulsionada por uma pequena turbina que reduz a possibilidade de se formar uma camada limite importante sobre a folha; uma segunda ventoinha produz uma circulação de ar ao longo das paredes exteriores da câmara mantendo a temperatura próxima da do ambiente. A temperatura do ar na câmara é medida com um termistor NTC e a da folha com um termopar, cuja junção livre se apoia contra a superfície da folha. A humidade relativa é medida com um sensor Vaisala e a irradiância (PAR) com um sensor Li-COR. Estes sensores, incorporados na câmara, transmitem os respetivos sinais para a unidade centralizadora de dados. O ar que entra no sistema de medida passa primeiro por um recipiente, que funciona como homogeneizador, sendo a seguir dividido em duas correntes. Uma vai passar na câmara contendo a folha e depois no IRGA e a outra vai servir como gás de referência para o analisador. As leituras dos diferenciais do CO₂ e do H₂O são tomadas no visor instalado na unidade centralizadora de dados, logo após se atingir o valor máximo de fotossíntese.

Os valores do zero determinados a intervalos de 15 a 30 minutos são obtidos fazendo passar o mesmo ar pela referência e pela câmara sem folha.

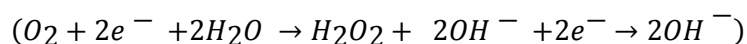
O cálculo da taxa fotossintética foi efetuado de acordo com a expressão, utilizada em circuito aberto, $P_N = f \cdot \Delta CO_2 / A$, sendo P_N a taxa de fotossíntese aparente, f o fluxo de ar através da câmara, ΔCO_2 a diferença da concentração do ar antes e depois de passar na câmara e A a área da folha.

Fotossíntese a CO₂ saturante com o Eléctrodo de Oxigénio (Método polarográfico)

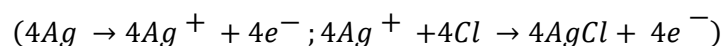
O eléctrodo de oxigénio é um instrumento polarográfico que mede a concentração de oxigénio num meio onde está colocada a extremidade de um eléctrodo de platina (cátodo). Com ele mede-se a libertação fotossintética do oxigénio tanto em cloroplastos isolados como em discos foliares. A concentração de oxigénio é medida através da sua taxa de redução, a

qual é proporcional ao patamar da corrente produzida. É, portanto, a taxa da difusão do oxigénio para o cátodo que vai controlar a intensidade de corrente.

Existem vários tipos de eléctrodos de oxigénio, os mais importantes dos quais são os eléctrodos abertos e cobertos com uma membrana. O mais divulgado deste último tipo é o chamado eléctrodo de Clark. Compõe-se de um fino eléctrodo de platina (200 μ de diâmetro) colocado num tubo de plástico conjuntamente com o eléctrodo de referência (de prata, o ânodo). A extremidade do eléctrodo fica coberta por um filme de polietileno ou de teflon, que permite ao oxigénio e a outros gases difundirem-se rapidamente através da membrana. O método consiste na aplicação de uma diferença de potencial entre dois eléctrodos (o ânodo de prata e o cátodo de platina). Por outro lado os solutos não gasosos, que podem interagir com o eléctrodo, são excluídos, pois os dois eléctrodos estão mergulhados num electrólito de KCl saturado. A redução do oxigénio no cátodo de platina ocorre quando se verifica o aparecimento de pequenas quantidades de H_2O e o meio junto ao eléctrodo se torna alcalino. Como a concentração de H_2 não afeta a velocidade de redução do O_2 passam-se as seguintes reações:



A intensidade de corrente que vai circular entre os eléctrodos de prata e platina é medida. Acima de determinada voltagem (cerca de 0,6 Volts) a intensidade de corrente é proporcional à concentração de oxigénio presente, que vai ser reduzido no cátodo de platina, enquanto no ânodo se forma cloreto de prata aquando da oxidação da prata:



Admite-se que os eletrões aqui produzidos podem ser utilizados pelo cátodo para a redução do O_2 . É um método de registo contínuo, com rapidez de resposta e elevada sensibilidade. É utilizado para medir na fase gasosa o O_2 libertado por um tecido verde e permite fazer determinações de taxas fotossintéticas a elevadas concentrações de CO_2 (até 5%), que nos dão as capacidades máximas de fotossíntese das espécies.

O eléctrodo de oxigénio para tecidos foliares consta de uma peça circular em perspex, onde estão montados o ânodo e o cátodo, de uma unidade geradora da diferença de potencial e de uma câmara onde se coloca o disco da folha, com cerca de $10cm^2$, ou vários discos mais pequenos, que podem ser constantemente irrigados na zona do corte. A câmara contacta com os eléctrodos por uma abertura circular, na sua base, por onde se difunde o O_2 . A temperatura da câmara é regulada por circulação de água, nas suas paredes superior e inferior. A luz é fornecida exteriormente, através da tampa transparente. Na câmara coloca-se uma mistura de tampão de carbonato e bicarbonato de sódio 1M a pH 9,5 que permite manter constante a concentração de CO_2 na câmara.

A taxa de fotossíntese aparente é dada pela expressão:

$$PN = \frac{n^\circ \text{ de divisões do registador}}{\text{tempo (minutos)}} \times \mu\text{moles } O_2 \text{ por divisão do registador}$$

O número de μmoles de O_2 por divisão do registador é obtido por calibração com ar (21% de oxigénio molecular) e azoto ou por injeção na câmara de um volume conhecido de ar.

Fluorescência da clorofila: princípios e definição de coeficientes

A energia luminosa absorvida pelos pigmentos antena do complexo LHC é transferida para o complexo fotossistema II (PSII), responsável pela oxidação da água na fotossíntese. Quando as plantas são submetidas a um stresse ambiental pode verificar-se um excesso de energia de excitação ao nível dos pigmentos antena dos fotossistemas. Uma das primeiras defesas das plantas nestas circunstâncias é a dissipação de parte dessa energia por um processo não-radiativo, isto é, através de calor. Este mecanismo ocorre ao nível do PSII e pode ser considerado um ajustamento negativo (*down-regulation*) tendo como consequência um decréscimo na eficiência da utilização da luz. Quando este mecanismo não é suficiente ocorrem danos nos fotossistemas que podem ser reversíveis (caso da fotoinibição) ou irreversíveis (caso da fotooxidação). A fotoinibição corresponde à inibição do transporte de electrões com efeitos sobre a separação de cargas associada à oxidação da água.

As moléculas de clorofila possuem a capacidade de reemitir, na forma de fluorescência, uma parte da luz absorvida que não é convertida em energia química. Deste modo, a intensidade da fluorescência pode ser correlacionada com a actividade do transporte fotossintético de electrões. Uma modificação no estado funcional das membranas tilacoidais induzida por um stresse ambiental (temperatura, luz, défice hídrico) traduz-se em alterações na fluorescência da clorofila, sendo possível utilizá-la para medir precoce e rapidamente as respostas das plantas ao stresse.

A medição da fluorescência da clorofila (predominantemente emitida pelo PSII) permite então estudar os destinos da energia de excitação no aparelho fotossintético. Isto porque a luz emitida através da fluorescência compete com os processos fotoquímicos (i.é. a fotossíntese) e com os processos de dissipação térmica, pela energia de excitação disponível.

A fluorescência da clorofila *in vivo*, principalmente a chamada fluorescência variável ou seja, a fluorescência observada após iluminação, é originada principalmente a partir da clorofila *a* no PSII. Sendo assim, as modificações no rendimento da fluorescência devem ser consideradas, na sua maioria, como reflexo das propriedades de excitação e conversão de energia no PSII. No entanto, devido às conexões funcionais do PSII com os outros componentes do aparelho fotossintético, o rendimento da fluorescência será também, indirectamente, um indicador do processo como um todo.

Quando uma folha é mantida na escuridão por um período de tempo não inferior a 20 minutos, as quinonas aceitadoras de electrões do PSII (Q_A e Q_B) são oxidadas. Ao excitar a folha com uma luz modulada de intensidade suficientemente baixa para que a quinona aceitadora primária do PSII (Q_A) permaneça oxidada ($< 1\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), gera-se um nível mínimo, ou basal, de fluorescência, F_0 . Se a folha for exposta a um pulso de 1s de luz de intensidade muito elevada ($> 4000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que reduza totalmente a *pool* de Q_A , a fluorescência atinge um valor máximo, F_m . O aumento de fluorescência de F_0 para F_m pode ser atribuído à

fotoredução de Q_A em todos os complexos PSII, ou seja, a fluorescência aumenta para um máximo porque a competição com a fotoquímica pela energia de excitação é quase inexistente. Este aumento na fluorescência, associado à redução de Q_A é conhecido como fluorescência variável, F_v ($F_v = F_m - F_0$). A razão F_v/F_m indica a eficiência do PSII, apresentando valores próximos de 0,8 em plantas em condições ótimas.

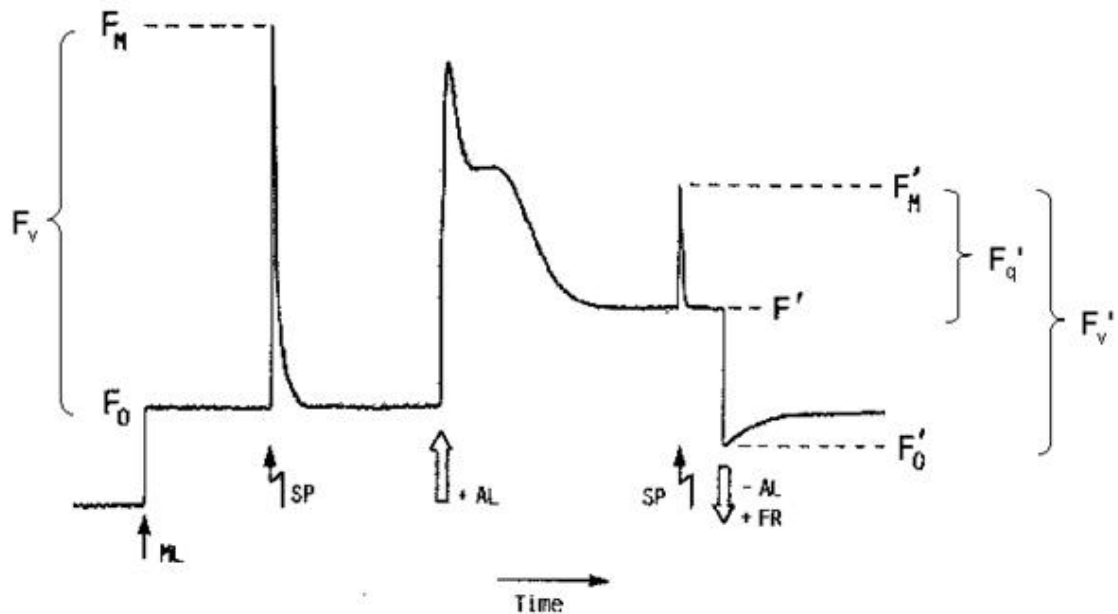


Figura 2. Variação da fluorescência de uma folha adaptada ao escuro após a exposição à luz de medição (ML, *measuring light*) e de pulsos de luz saturante (SP, *saturating pulse*) ou luz actínica (AL, *actinic light*). F_0 – fluorescência basal; F_m – fluorescência máxima em folhas pré-adaptadas ao escuro; F_v – fluorescência máxima variável em folhas pré-adaptadas ao escuro; F'_m – fluorescência máxima variável após a aplicação de um pulso de luz saturante; F'_m – fluorescência máxima em folhas não pré-adaptadas ao escuro; F' – fluorescência após ter sido atingido o estado estacionário (*steady state*).

Se a folha adaptada à escuridão for exposta a uma luz actínica contínua (luz “ambiental”), então a fluorescência atinge rapidamente um pico (P), menor que F_m sempre que a luz actínica não seja suficientemente elevada para reduzir a totalidade da *pool* de Q_A . De seguida, a fluorescência decresce lentamente até atingir um nível de estado estacionário (*steady state*, F_s). Esta extinção da fluorescência do nível P até ao estado estacionário coincide com a indução da assimilação de CO_2 na folha). Se a folha for exposta a pulsos de 1s de luz saturante durante este amortecimento de P, observa-se um aumento na fluorescência até um nível F'_m , que é consideravelmente mais baixo que o valor F_m , gerado na folha adaptada à escuridão, apesar de Q_A se encontrar totalmente reduzido nas duas situações. Assim, a diferença entre F_m e F'_m pode ser atribuída a uma extinção não fotoquímica da energia de excitação na folha exposta à luz actínica.

A medição de fluorescência modulada permite a separação da extinção ou decaimento (*quenching*) em componentes fotoquímicos e não fotoquímicos. A eficiência fotoquímica do PSII é proporcional ao coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência da clorofila (q_p) e à eficiência fotoquímica dos centros abertos ($F'v/F'm$). *In vivo*, a diminuição da eficiência fotoquímica do PSII não se deve apenas a uma diminuição de q_p , mas também a um decréscimo de $F'v/F'm$, devida em parte a processos não fotoquímicos. É a extinção não fotoquímica (q_N), parâmetro importante para compreender alguns processos regulatórios que ocorrem na membrana fotossintética como resposta a alterações de condições externas e internas. A dissipação do excesso de excitação absorvida, que corresponde ao principal componente de extinção não fotoquímica, é um processo indispensável para que as plantas evitem a fotoinibição e fotodestruição em condições de stresse luminoso.

- Definição dos vários parâmetros de decaimento:

$$q_p = \frac{(Fv)_s - Fv}{(Fv)_s}$$

ou:

$$q_p = \frac{(F'm - F)}{(F'm - F'0)}$$

q_p é o parâmetro de decaimento fotoquímico. É uma medida da fracção de centros de reacção do PSII que se encontram abertos. A definição original deste parâmetro implica que este afeta principalmente a fluorescência variável (Fv) e não a fluorescência mínima (F_0). Nos casos em que q_N seja maior que 0.4 esta hipótese poderá não se verificar, o que afectará o cálculo de q_N e q_p . Ao usar como fonte de iluminação uma fonte de luz infra-vermelha, os aceitadores de electrões do PSII podem ser re-oxidados através do efeito da iluminação no PSI. Um novo valor de F_0' pode ser medido e usado para as correções dos parâmetros de decaimento, assumindo que os aceitadores de electrões do PSI estejam correctamente activados, o que pode não corresponder à verdade numa amostra adaptada ao escuro. Deste modo, a determinação de F_0' deve ser feita alguns minutos após a indução da fotossíntese (Van Kooten & Snel, 1990).

$$NPQ = \frac{(Fm) - (F'm)}{(F'm)}$$

NPQ corresponde ao decaimento não-fotoquímico e funciona como um indicador da dissipação térmica, permitindo quantificar a combinação dos mecanismos de foto-proteção, foto-inibição e danos permanentes ao nível do PSII. NPQ funciona como um modo alternativo de exprimir q_N (decaimento não fotoquímico), dando uma estimativa do decaimento sem necessidade de quantificar F_0 . A vantagem de usar este parâmetro em vez de q_N depende da aplicação da medição. NPQ é mais afectado pelo componente de q_N que reflecte a dissipação térmica da energia de excitação no sistema antena, ou seja, pode ser visto como um indicador de "excesso de energia de excitação". Por outro lado, NPQ é relativamente insensível à parte do decaimento não fotoquímico associado a valores de q_N abaixo de 0.6. Este valores de q_N são principalmente afectados pela variação de pH do lumen (Bilger & Björkman, 1990).

$$q_N = \frac{(F'm) - Fv}{(F'm)}$$

q_N é um parâmetro similar a NPQ mas necessita de F_0' para ser calculado. q_N é definido como o coeficiente de decaimento não fotoquímico. A definição original deste parâmetro implica que este afeta principalmente a fluorescência variável (F_v) e não a fluorescência mínima (F_0). Como já foi referido relativamente a q_p , nos casos em que q_N seja maior que 0.4 esta hipótese poderá não se verificar. Ao usar como fonte de iluminação uma fonte de luz infra-vermelha, os aceitadores de electrões do PSII podem ser re-oxidados e o PSI ser reduzido. Um novo valor de F_0' pode ser medido e usado para as correções dos parâmetros de decaimento (Van Kooten & Snel, 1990).

Utilizando uma técnica de fluorescência modulada é possível, apenas com medições de $F'm$ e F_s , e para folhas sujeitas a qualquer situação ambiental, estimar o rendimento quântico do transporte de electrões no PSII através de um parâmetro definido por Genty *et al.* (1989). É igual ao produto da eficiência com que um fotão absorvido pode atingir um centro de reacção para realizar o processo fotoquímico ($F'v / F'm$) e a proporção de centros de reacção que são capazes de transferir um electrão para o aceitador primário, isto é, que estão fotoquimicamente abertos (representada por q_p). Este método não necessita da medição de F_0 , pelo que se torna mais rápido e mais prático de utilizar em situações de campo.

$$\phi_{PSII} = \frac{(F'm) - F_s}{(F'm)}$$