



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

**Estudio del quenching no fotoquímico de la fluorescencia de clorofila y
parámetros fotosintéticos relacionados en plantas y algas**

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Inorgánica,
Química Analítica y Química Física

Lic. Brian Ospina Calvo

Directora de tesis:

Dra. María Gabriela Lagorio

Consejero de estudios:

Dr. Enrique San Román

Lugar de Trabajo: Instituto de química física de los materiales, medio ambiente y
energía (INQUIMAE)

07 de noviembre de 2018

Fecha de defensa: 28/03/2019

Estudio del quenching no fotoquímico de la fluorescencia de clorofila y parámetros fotosintéticos relacionados en plantas y algas.

El quenching no fotoquímico es un proceso empleado por plantas y algas para protegerse del exceso de luz y consiste en la desactivación de moléculas de clorofila excitada (Chl*) por conversión interna al estado fundamental (disipación de calor). Esta desactivación compite con otros dos procesos fotoquímicos: la emisión de fluorescencia desde (Chl*) y la transferencia de electrones en el proceso fotosintético. El quenching no fotoquímico reduce la formación de tripletes excitados de clorofila y en consecuencia disminuye la formación de especies reactivas de oxígeno.

En esta tesis doctoral se estudió la conexión entre la magnitud del quenching no fotoquímico y diversas características del material fotosintético con el fin de comprender mejor los procesos de transferencia y repartición de energía *in vivo*. A partir del estudio de la fluorescencia variable de la clorofila (Cinética de Kautsky) se obtuvieron parámetros fotosintéticos tales como eficiencia máxima de fotosíntesis, rendimiento cuántico de fotosistema II y parámetros de quenching entre otros. Del análisis de la emisión rápida y polifásica de la fluorescencia de clorofila-a se adquirió información sobre los distintos pasos de transferencia electrónica en la fotosíntesis de los sistemas estudiados. Por otro lado, se relacionaron los espectros de emisión de fluorescencia de clorofila en estado estacionario con la estequiometría de los fotosistemas I y II.

Para estudiar la variabilidad entre los diferentes materiales fotosintéticos se realizaron ensayos en hojas de plantas, frutos y algas *P. kessleri*. Dentro de las plantas estudiadas se incluyeron especies con diferentes mecanismos de fijación de carbono y con diferente concentración de pigmentos.

Palabras Clave: Quenching no fotoquímico, Fluorescencia de clorofila, Fotosíntesis, Fotosistemas, Cinética de Kautsky, Curva OJIP, Decaimiento fotofísico.

Study of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and related photosynthetic parameters in plants and algae.

Non-photochemical quenching is a process used by plants and algae to protect themselves against excess light and consists in the deactivation of excited chlorophyll molecules (Chl*) by internal conversion to the ground state (heat dissipation). This deactivation competes with two other photochemical processes: the emission of fluorescence from Chl* and the electron transfer in the photosynthetic process. Non-photochemical quenching reduces the formation of chlorophyll triplets excited states and consequently decreases the formation of reactive oxygen species.

In this doctoral thesis, the connection between the magnitude of non-photochemical quenching and various characteristics of the photosynthetic material was studied in order to better understand the processes of energy transfer and energy distribution *in vivo*. From the study of the variable chlorophyll fluorescence (Kautsky kinetics), some photosynthetic parameters such as the maximum photosynthesis efficiency, the quantum yield of photosystem II and the quenching parameters, among others, were obtained. From the analysis of the rapid and polyphasic chlorophyll-a fluorescence, information on the various steps of electronic transfer in the photosynthesis of the studied systems was acquired. On the other hand, the steady state fluorescence emission spectra of chlorophyll were related to the stoichiometry of photosystems I and II.

To study the variability between the different photosynthetic materials, tests were carried out on plants leaves, fruits and algae *P. kessleri*. Species with diverse mechanisms of carbon fixation and different pigment concentration were included in the studied plants.

Keywords: Non-photochemical Quenching, Chlorophyll Fluorescence, Photosynthesis, Photosystems, Kautsky Kinetics, OJIP Curve, Photophysical Decay.

Contenido

Agradecimientos	VII
Índice de Figuras.....	IX
Índice de Tablas	XV
Capítulo 1 Introducción.....	1
1.1 Fotosíntesis.....	1
1.2 Fluorescencia de la clorofila-a	5
1.2.1 Fluorescencia basal de la clorofila-a.....	6
1.2.1.1 Correcciones por reabsorción de luz. Modelos	7
1.2.1.1.1 Modelo de capa ópticamente delgada.....	9
1.2.1.1.2 Modelo de capa ópticamente gruesa	10
1.2.2 Fluorescencia variable de clorofila-a. Cinética de Kautsky	11
1.2.2.1 Fluorescencia variable de clorofila. Adquisición rápida de datos OJIP. ..	11
1.2.2.2 Método de pulsos de saturación de Kautsky	17
1.2.2.2.1 Tratamientos lumínicos	21
1.2.2.2.2 Regulación fotofísica de la antena	22
1.2.2.2.3 Quenching no fotoquímico	23
1.3 Ciclo de las xantófilas.....	24
1.4 Componentes de los rendimientos cuánticos	26
Capítulo 2 Objetivos	29
2.1 Objetivo del trabajo	29
2.2 Resumen y objetivo de los experimentos	30
Capítulo 3 Análisis de la fluorescencia de clorofila y la partición de energía en el PSII para dos variedades de <i>Fittonia albivenis</i> con pigmentaciones diferentes	33
3.1 Introducción	33

3.2 Materiales y métodos.....	35
3.2.1 Material Vegetal.....	35
3.2.2 Concentración de pigmentos.....	35
3.2.3 Humedad de suelo.....	36
3.2.4 Parámetros fotosintéticos y fluorescencia (Cinética de Kautsky)	37
3.3 Resultados y Discusión.....	40
3.4 Conclusiones del Capítulo 3	47

Capítulo 4 Análisis de fluorescencia de la clorofila-a para plantas con diferentes metabolismos de fijación de CO₂	49
4.1 Introducción	49
4.2 Materiales y Métodos	54
4.2.1 Experimentos I y II. Análisis de partición de energía y efecto del estrés hídrico en plantas C ₃ , C ₄ y CAM.....	54
4.2.1.1 Material Vegetal	54
4.2.1.2 Humedad de suelo	55
4.2.1.3 Espectros de emisión de fluorescencia de la clorofila no variable.....	55
4.2.1.4 Espectros de reflectancia y transmitancia	57
4.2.1.5 Fluorescencia variable de la clorofila-a. Adquisición rápida de datos OJIP	57
4.2.1.6 Parámetros fotosintéticos y fluorescencia (Cinética de Kautsky)	57
4.2.2 Experimento III. Clasificación de especies C ₃ , C ₄ y CAM según los parámetros fotosintéticos obtenidos de la adquisición rápida de datos. Fluorescencia variable de la clorofila-a.....	58
4.2.2.1 Material vegetal.....	58
4.2.2.2 Análisis estadístico	60
4.3 Resultados y Discusión.....	61
4.3.1 Experimento I. Análisis de partición de energía en plantas C ₃ , C ₄ y CAM. Componentes del quenching no fotoquímico	61
4.3.2 Experimento II. Efecto del estrés hídrico sobre los parámetros fotosintéticos.....	65
4.3.3 Experimento III. Clasificación de especies C ₃ , C ₄ y CAM según los parámetros fotosintéticos obtenidos de la adquisición rápida de datos OJIP. Fluorescencia variable de la clorofila-a	75

4.4 Conclusiones del Capítulo 4	80
Capítulo 5 Variabilidad en los espectros de fluorescencia de la clorofila en frutos de berenjena (<i>Solanum melongena</i>) crecidos bajo diferentes distribuciones espectrales de luz solar	83
5.1 Introducción	83
5.2 Materiales y Métodos	85
5.2.1 Material Vegetal.....	85
5.2.2 Espectros de reflectancia y transmitancia.....	86
5.2.3 Fluorescencia de la clorofila no variable.....	86
5.2.4 Correcciones de los espectros de fluorescencia considerando los procesos de reabsorción de luz.....	87
5.2.5 Modelado de fluorescencia y reconstrucción de espectros	88
5.2.6 Parámetros fotosintéticos y fluorescencia (Cinética de Kautsky)	90
5.3 Resultados y Discusión.....	91
5.4 Conclusiones del Capítulo 5	103
Capítulo 6. Efecto de la atrazina sobre los parámetros fotosintéticos del alga unicelular <i>Parachlorella kessleri</i>	105
6.1 Introducción	105
6.2 Materiales y métodos.....	107
6.2.1 Cepa y condiciones de cultivo	107
6.2.2 Bioensayo de toxicidad	108
6.2.3 Aplicación de herbicidas	108
6.2.4 Preparación preliminar de la muestra para las mediciones de fluorescencia de la clorofila-a	108
6.2.5 Fluorescencia variable de clorofila. Adquisición rápida de datos	109
6.2.5 Fluorescencia variable de clorofila. Cinética de Kautsky	110
6.2.6 Espectros de emisión de fluorescencia de la clorofila	111
6.2.7 Espectros de reflectancia y transmitancia.....	112
6.2.8 Análisis de datos y estadística	112
6.3 Resultados y Discusión.....	113

6.3.1 Bioensayo de toxicidad	113
6.3.2 Cinética de Kautsky	114
6.3.3 Parámetros Fotosintéticos.....	116
6.3.4 Cinética Rápida OJIP	122
6.3.5 Relación $F_{red}/F_{far-red}$	123
6.4 Conclusiones del Capítulo 6	126
Capítulo 7. Conclusiones Generales	127
Lista de acrónimos y abreviaturas	131
Bibliografía.....	137
ANEXO 1	153
Producción científica.....	159

Agradecimientos

Me gustaría aprovechar esta oportunidad para agradecer a todas las personas maravillosas que hicieron posible esta tesis.

Primero que todo, me gustaría agradecer a la investigadora más comprometida con su trabajo que conozco, mi directora de tesis, la Dra. María Gabriela Lagorio quien siempre estuvo dispuesta a guiarme en el camino de la investigación y brindarme su apoyo incondicional durante todos estos años.

Gracias a todos los integrantes del grupo de fotoquímica: Diana, Rocío, Betty, Gabi, Juan, Nahuel, Hernán y a mi consejero de estudios el Dr. Enrique San Román que siempre estuvieron para escucharme, ayudarme y compartir sus conocimientos.

Gracias a la República Argentina y sus instituciones, especialmente a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme las becas doctorales que me permitieron realizar esta tesis.

Gracias a la Universidad de Buenos Aires, al INQUIMAE y al Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física por brindarme la posibilidad de trabajar en sus instalaciones que me llenan de orgullo.

Agradezco a mi familia por su respaldo y paciencia que me han dado toda mi vida:

A mi madre Adriana que me ha dado todo su amor, su conocimiento, por enseñarme que en la vida hay que luchar y ser perseverante, a mi hermano Fabian por su apoyo infinito, a mi hermana Laura por siempre estar pendiente de mí y a mi padre

Argemiro que dio todo de sí para que fuera la persona que soy ahora. Me siento afortunado de poder dedicarles este trabajo que realice con tanto cariño y dedicación.

Gracias también:

A la Dra. Ángela Juárez, por brindarme su tiempo y asesoramiento para realizar los análisis de toxicidad en algas.

Al Dr. Ezequiel Morzan por su paciencia y ayuda para realizar los análisis estadísticos.

A mis amigos Mayito, André, Tere, Orlando, Ramón, Rubén, Andrés, Luis H, Marcos, Danielle, Jhon S y Adriana, sin su amistad nada hubiera sido lo mismo.

Gracias a todos por su paciencia y amor.

Índice de Figuras

Figura 1.1 Esquema en Z para la fotosíntesis oxigénica.....	3
Figura 1.2 Aspectos básicos del origen de la fluorescencia. Chl: Clorofila-a; $^1\text{Chl}^*$: Estado excitado singlete de la clorofila-a; $^3\text{Chl}^*$: Estado excitado triplete de la clorofila-a; O_2 : Oxígeno; $^1\text{O}_2^*$: Estado excitado singlete del Oxígeno.....	4
Figura 1.3 Espectro basal típico de fluorescencia de la clorofila-a (F_0) para hojas vegetales a temperatura ambiente. PSII: Fotosistema II; PSI: fotosistema.....	7
Figura 1.4 Espectros tipo de absorción (línea fina) y de fluorescencia de clorofila (línea gruesa) para hojas vegetales a temperatura ambiente.....	8
Figura 1.5 Curva OJIP de la fluorescencia de la clorofila-a en escala logarítmica, donde se puede observar los diferentes aceptores de electrones de la cadena fotosintética correspondiente a cada punto de inflexión de la curva. Q_A : Plastoquinona A; Q_B : Plastoquinona B; PQ: Pool de plastoquinonas.....	13
Figura 1.6 Diagrama de cinética de inducción de fluorescencia de la clorofila-a (Cinética de Kautsky).....	20
Figura 1.7 Ciclo de las xantofilas. VDE: Violazantina deepoxidasa; ZE: Zeaxantinaepoxidasa.....	25
Figura 3.1 <i>Fittonia albivenis</i> A) Variedad <i>Argyroneura</i> B) Variedad <i>Verschaffeltii</i>	34

Figura 3.2 Fluorescencia de clorofila variable para hojas de *Fittonia albivenis* utilizando un fluorómetro de pulso modulado. A) Variedad *Argyroneura*. B) Variedad *Verschaffeltii*.....39

Figura 3.3 Partición de energía para *Fittonia albivenis* (variedad *Argyroneura*) (A) y *Fittonia albivenis* (Variedad *Verschaffeltii*) (B) a diferentes intensidades de luz actínica.....42

Figura 3.4 Rendimiento cuántico de los componentes del quenching no fotoquímico: Φ_{qE} (quenching dependiente de la energía), Φ_{qT} (quenching del estado de transición) y Φ_{qI} (quenching relacionado con la fotoinhibición) para *Fittonia albivenis* (Variedad *Argyroneura*) (A) y *Fittonia albivenis* (variedad *Verschaffeltii*) (B) a diferentes intensidades de luz actínica.....44

Figura 3.5 Rendimiento fotosintético evaluado a través de la relación F_v/F_o para *Fittonia albivenis* (Variedad *Argyroneura*) (A) y *Fittonia albivenis* (Variedad *Verschaffeltii*) (B), bajo estrés hídrico. Las medidas se realizaron con una luz actínica de intensidad baja ($97\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$).....46

Figura 4.1 Ruta fotosintética de fijación de carbono en plantas C_3 (ciclo de Calvin-Benson).....51

Figura 4.2 Ruta fotosintética de fijación de carbono en plantas C_4 (ciclo de Hatch-Slack).....52

Figura 4.3 Ruta fotosintética de fijación de carbono en plantas CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas).....53

Figura 4.4 *Vinca minor* (C_3), *Axonopus compressus* (C_4) y *Kalanchoe pinnata* (CAM).....54

Figura 4.5 Partición de energía para C_3 : *Vinca minor*, C_4 : *Axonopus compressus* y CAM: *Kalanchoe pinnata* a diferentes irradiaciones de luz actínica.....62

Figura 4.6 Rendimiento cuántico de los componentes del quenching no fotoquímico: Φ_{qE} (quenching dependiente de la energía), Φ_{qT} (quenching del estado de transición) y Φ_{qI} (quenching relacionado con la fotoinhibición) para C₃: *Vinca minor*, C₄: *Axonopus compressus* y CAM: *Kalanchoe epinnata* a diferentes irradiaciones de luz actínica.....64

Figura 4.7 Relación de bandas de los espectros de fluorescencia basal (F_0) de clorofila-a (F_{683}/F_{730}) para C₃: *Vinca minor*, C₄: *Axonopus compressus* y CAM: *Kalanchoe pinnata* a diferentes concentraciones de humedad en el suelo.....66

Figura 4.8 Curva OJIP de fluorescencia de la clorofila-a F_v/F_0 para C₃: *Vinca minor*, C₄: *Axonopus compressus* y CAM: *Kalanchoe pinnata* a diferentes concentraciones de humedad en el suelo.....69

Figura 4.9 Máximo rendimiento cuántico de fotoquímica del PSII (previamente adaptado a la oscuridad) F_v/F_m para C₃: *Vinca minor*, C₄: *Axonopus compressus* y CAM: *Kalanchoe pinnata* a diferentes concentraciones de humedad en el suelo.....71

Figura 4.10 Partición de energía a diferentes porcentajes de humedad en suelo para C₃: *Vinca minor*, C₄: *Axonopus compressus* y CAM: *Kalanchoe pinnata*.....73

Figura 4.11 Gráfico biplot para el análisis de componentes principales de los parámetros fotosintéticos obtenidos del test OJIP para 43 especies de plantas con diferentes metabolismos de fijación de CO₂. A) Especies agrupadas según su mecanismo de fijación de CO₂. C₃ (Punto verde), C₄ (Punto rojo) y CAM (Punto negro). B) Posición espacial de cada una de las especies donde se incluyen 30 especies C₃ (Puntos verdes), 6 especies C₄ (Puntos rojos) y 7 especies CAM (Puntos negros).....77

Figura 4.12 Gráfico de coordenadas en tres ejes para el análisis de componentes principales de los parámetros fotosintéticos obtenidos del test OJIP para 43 especies de plantas con diferentes metabolismos de fijación de CO₂ donde se incluyen 30 especies C₃ (Puntos verdes), 6 especies C₄ (Puntos rojos) y 7 especies CAM (Puntos negros).....79

Figura 5.1 Variedades de <i>Solanum melongena</i> var. <i>esculentum</i> estudiadas, las letras N, V, B son abreviaciones para Negra, Violeta y Blanca para las respectivas especies.....	85
Figura 5.2 Descripción gráfica de los flujos de luz en el fruto de berenjena negra.....	90
Figura 5.3 Espectro de fluorescencia experimental (F_o) de las diferentes partes de la berenjena negra (a), berenjena violeta (b) y berenjena blanca (c). Fruto entero (—), cáscara (--) y pulpa (-.-). Todos los espectros fueron corregidos por la respuesta del detector.....	92
Figura 5.4 Espectros de fluorescencia corregidos por la respuesta del detector (F_o) y adicionalmente corregidos por procesos de reabsorción de luz para de las diferentes partes de la berenjena negra (a), berenjena violeta (b) y berenjena blanca (c). Fruto entero (—), cascara (--) y pulpa (-.-).....	93
Figura 5.5 Espectro de transmitancia difusa para las cáscaras de berenjena Negra (—), Blanca (--) y Violeta (-.-).....	95
Figura 5.6 Modelado del espectro de fluorescencia reconstruido para el fruto entero (- -) y espectro de fluorescencia experimental para el fruto entero (—). Ambos espectros son de frutos de berenjena negra y presentan sus respectivas barras de error.....	96
Figura 5.7 Valores de los parámetros fotosintéticos obtenidos de las medidas de fluorescencia variable para las pulpas de las berenjenas Negra y Violeta.....	97
Figura 5.8 Variación de los parámetros fotosintéticos: F_v'/F_m' , Φ_{PSII} y F_v'/F_o' obtenidos de la fluorescencia de la clorofila variable de frutos intactos de berenjena negra en función del tiempo de almacenamiento. Berenjenas mantenidas a 4°C (izquierda) y a temperatura ambiente 20°C (derecha).....	99
Figura 6.1 Punto de acción de la atrazina dentro de la cadena de transporte electrónico de la fotosíntesis.....	106

- Figura 6.2** Curva OJIP de la fluorescencia de la clorofila-a. Con la flecha roja (→) se muestra el punto de acción de la atrazina sobre la cadena de transporte electrónico.....109
- Figura 6.3** Esquema de la cinética de Kautsky para algas de *P. kessleri* adaptadas a la oscuridad.....110
- Figura 6.4** Porcentaje de inhibición vs concentración de atrazina para algas de *P. kessleri* expuesta a diferentes concentraciones de atrazina (130, 260, 520, 1040, 2080 y 4160 μgL^{-1}) por 96 horas.....103
- Figura 6.5** Cinética de Kautsky de *P. kessleri* después de ser expuesta a diferentes concentraciones de atrazina durante 1 minuto.....114
- Figura 6.6** Cinética de Kautsky de *P. kessleri* después de ser expuesta a diferentes concentraciones de atrazina durante 60 minutos.....115
- Figura 6.7** Cinética de Kautsky de *P. kessleri* después de ser expuesta a diferentes concentraciones de atrazina durante 360 minutos.....115
- Figura 6.8** Parámetros fotosintéticos calculados a partir de la cinética de Kautsky para las algas de *P. kessleri* expuestas durante 1 min a diferentes concentraciones de atrazina (260, 520 y 1040 μgL^{-1}). Fv/Fm: Máximo rendimiento cuántico fotoquímico del PSII cuando es adaptado a la oscuridad; Fv/Fo: Máximo rendimiento cuántico fotoquímico del PSII; ΦC : Rendimiento cuántico del decaimiento fotofísico; ΦPSII : Rendimiento cuántico del PSII; qP: quenching fotoquímico; UQF: Fluorescencia relativa no quencheada.....117
- Figura 6.9** Parámetros fotosintéticos calculados a partir de la cinética de Kautsky para las algas de *P. kessleri* expuestas durante 60 min a diferentes concentraciones de atrazina (260, 520 y 1040 $\mu\text{g L}^{-1}$).Fv/Fm: Máximo rendimiento cuántico fotoquímico del PSII cuando es adaptado a la oscuridad; Fv/Fo: Máximo rendimiento cuántico fotoquímico del PSII; ΦC : Rendimiento cuántico del decaimiento fotofísico; ΦPSII : Rendimiento cuántico del PSII; qP: quenching fotoquímico; UQF: Fluorescencia relativa no quencheada.....118

Figura 6.10 Parámetros fotosintéticos calculados a partir de la cinética de Kautsky para las algas de *P. kessleri* expuestas durante 360 min a diferentes concentraciones de atrazina (260, 520 y 1040 $\mu\text{g L}^{-1}$). F_v/F_m : Máximo rendimiento cuántico fotoquímico del PSII cuando es adaptado a la oscuridad; F_v/F_o : Máximo rendimiento cuántico fotoquímico del PSII; Φ_C : Rendimiento cuántico del decaimiento fotofísico; Φ_{PSII} : Rendimiento cuántico del PSII; qP : quenching fotoquímico; UQF: Fluorescencia relativa no quencheada.....119

Figura 6.11 Partición de energía para los rendimientos cuánticos del fotosistema II (Φ_{PSII}), quenching no fotoquímico (Φ_{NPQ}) y decaimiento fotofísico (Φ_C) para las algas de *P. kessleri* a distintos tiempos. A) 1 min. B) 1 hora y C) 6 horas. Cada tiempo se trató a las algas con tres concentraciones de atrazina diferente. (260, 520 y 1040 $\mu\text{g L}^{-1}$).....121

Figura 6.12 Curva OJIP de la fluorescencia de la clorofila normalizada en el origen y en el pico máximo para algas de *P. kessleri* después de ser expuestas a diferentes concentraciones de atrazina (260, 520 y 1040 $\mu\text{g L}^{-1}$) por 1, 60 y 360 min.....122

Figura 6.13 Relación de bandas de los espectros de fluorescencia basal (F_o) de clorofila-a (F_{683}/F_{730}) para *P. kessleri* tratada con 260 $\mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina en función del tiempo. La relación está calculada sobre espectros corregidos por procesos de re-absorción de luz.....124

Figura 6.14 Relación de bandas de los espectros de fluorescencia basal (F_o) de clorofila-a (F_{683}/F_{730}) para *P. kessleri* tratada con 520 $\mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina en función del tiempo. La relación está calculada sobre espectros corregidos por procesos de re-absorción de luz.....124

Figura 6.15 Relación de bandas de los espectros de fluorescencia basal (F_o) de clorofila-a (F_{683}/F_{730}) para *P. kessleri* tratada con 1040 $\mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina en función del tiempo. La relación está calculada sobre espectros corregidos por procesos de re-absorción de luz.....125

Índice de Tablas

Tabla 1.1 Definición de términos y fórmulas de los parámetros obtenidos a partir del test OJIP usados para el análisis de fluorescencia de la clorofila-a emitida por muestras fotosintéticas adaptadas a la oscuridad. La fluorescencia (F) se refiere sólo a la fluorescencia inicial y RC a los centros de reacción de PSII activos (reductores de QA).....	14
Tabla 3.1 Composición de pigmentos fotosintéticos presentes en hojas de <i>Fittonia albivenis</i> (Variedad <i>Argyroneura</i> y Variedad <i>Verschaffeltii</i>). Clorofila-a = Chla, Clorofila-b = Chlb, Carotenoides = Car, Antocianinas = Anth. Los resultados informados resultan del promedio de tres mediciones.....	40
Tabla 4.1 Lista de especies C3, C4 y CAM analizadas mediante la adquisición rápida de datos. OJIP.....	58
Tabla 4.2 Parámetros obtenidos del test OJIP de fluorescencia de la clorofila-a, emitida por hojas previamente adaptadas a la oscuridad. (Ver Capítulo 1 Sección 1.2.2.1 Imagen 1.5 y Tabla 1.1 para más información) Donde: RC (Centro de reacción), RE (Reducción de electrones), Fv (Fluorescencia variable), Fm (máxima intensidad de fluorescencia en hojas previamente adaptadas a la oscuridad), ET (Transporte Electrónico), ABS (flujo de absorción), TR (Flujo de energía atrapada).....	59
Tabla 5.1 Relación de fluorescencia (F_{682}/F_{732}) corregida por los procesos de reabsorción de luz para las diferentes partes de las tres variedades de berenjenas. Los valores reportados en esta tabla corresponden a cada parte del fruto y son promedios de 9 espectros de fluorescencia (se tomaron tres frutas para cada tipo de berenjena y se registraron tres espectros para analizar cada parte).....	83
Tabla 5.2 Fluorescencia de la clorofila variable en las diferentes partes de los frutos de berenjena. Para las pulpas de las berenjenas Negra y Violeta, la señal de fluorescencia variable fue mayor cerca a la cáscara y fue decreciendo a medida que se acercaba al centro del fruto, siendo casi nula en el centro.....	94

Capítulo 1

Introducción

1.1 Fotosíntesis

Los organismos fotosintéticos (autótrofos) son capaces de absorber y utilizar la energía luminosa, sea de una fuente natural como el sol o una artificial como lámparas incandescentes o fluorescentes. El proceso fotoquímico mediante el cual estos organismos transforman compuestos inorgánicos en materia orgánica se denomina fotosíntesis. Existen dos tipos de fotosíntesis: la oxigénica y la anoxigénica. En el primer tipo de proceso se desprende oxígeno (O_2) y el agua actúa como donador de electrones mientras que en el segundo tipo se desprende azufre y el donador de electrones es el sulfuro de hidrógeno. Las plantas superiores, algas y algunos organismos procariotas como las bacterias verdes-oxifotosintéticas y las cianobacterias, presentan fotosíntesis oxigénica. Por otro lado, la fotosíntesis anoxigénica (también llamada bacteriana) es llevada a cabo en las bacterias púrpuras y verdes del azufre.

En plantas y algas, la fotosíntesis tiene lugar en organelas llamadas cloroplastos, que son descendientes evolutivos de las bacterias fotosintéticas. Dentro de los cloroplastos se encuentran los fotosistemas constituidos por una red de moléculas de clorofila-a, pigmentos accesorios y proteínas asociadas. La luz colectada por los fotosistemas es transferida a sus respectivos centros de reacción que están formados por un par de

moléculas de clorofila-a. Los centros de reacción de cada fotosistema absorben energía lumínica en forma independiente a diferentes longitudes de onda. El par presente en el PSII absorbe luz a 680 nm y se denomina P680 mientras que el del PSI absorbe luz a 730 nm y recibe el nombre de P730.

La fotosíntesis oxigénica involucra dos reacciones que operan simultáneamente en los centros de reacción del fotosistema II (PSII) y del fotosistema I (PSI). La energía luminosa absorbida por los pigmentos del complejo antena (en inglés *light harvesting complex*, LHC) se distribuye a los dos fotosistemas que están conectados por una cadena de transportadores de electrones (Figura 1.1). Cuando el centro de reacción del PSII recibe energía, se produce la excitación de un electrón del P680. Posteriormente, ocurre una separación de carga, ya que el estado excitado de P680 transfiere un electrón a una molécula aceptora (reducción de la plastoquinona) en la cadena fotosintética e inicia así el transporte de electrones. El electrón es sucesivamente transferido a lo largo de una serie de aceptores. Las especies P680⁺ formadas reciben electrones provenientes de la oxidación del agua, lo que conduce a la formación de O₂. La reacción neta de los procesos de transferencia de electrones que involucran a PSII y PSI da como resultado la formación de dos compuestos que sirven como reserva energética para la célula, NADPH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato), que se forma gracias a la transferencia de electrones desde una molécula de agua a NADP⁺, y ATP (Adenosín Trifosfato).¹

La función principal de la antena es transferir energía de excitación a los centros de reacción fotosintética que conducen a la reacción fotoquímica, pero una parte de la energía luminosa absorbida se disipa como calor y otra se emite como fluorescencia. Estos tres procesos son competitivos entre sí, por lo cual una disminución en uno de ellos tendrá como resultado un aumento en los otros.²

El aparato fotosintético en plantas, algas y cianobacterias está diseñado para absorber energía proveniente de la luz y transformarla en energía fotoquímica. El complejo antena (LHC) es el encargado de captar esta energía a través de pigmentos fotosintéticos, principalmente clorofilas y carotenoides, los que permiten que el sistema

se acople a una amplia variedad de intensidades de luz y longitudes de onda, incrementando así la eficiencia total.³

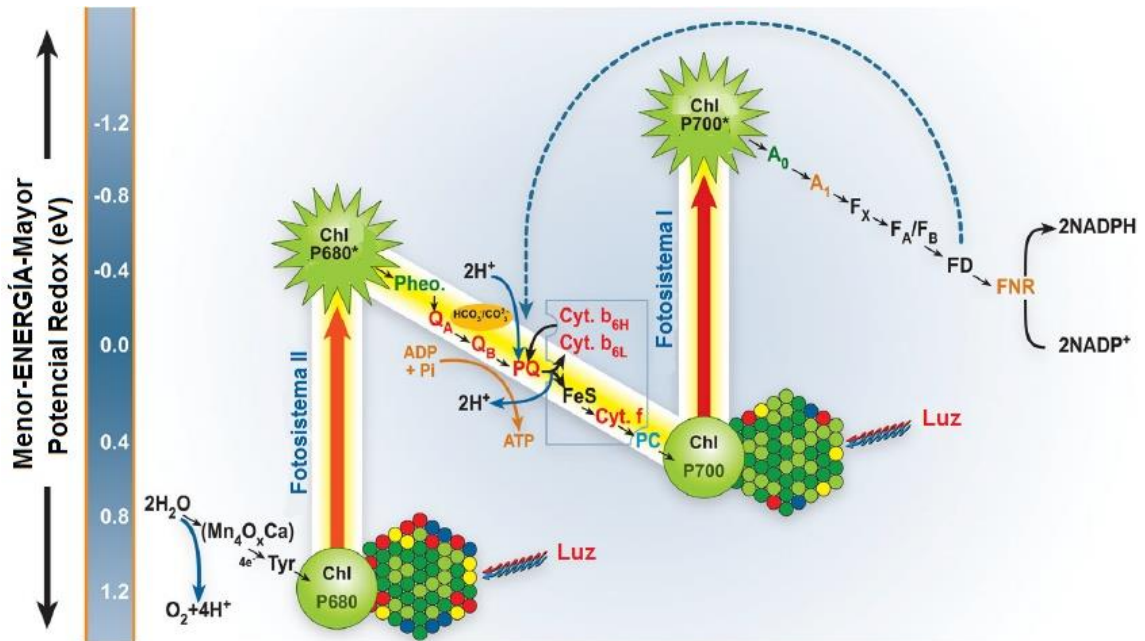


Figura 1.1 Esquema en Z para la fotosíntesis oxigénica, construido usando los estados de los potenciales redox del estado excitado. En la figura se muestra el transporte electrónico desde el agua hasta NADP^+ . Existen dos fotosistemas I (PSI) y II (PSII) conectados en serie, con un complejo citocromo b_6/f en el medio. También ocurre un transporte electrónico alrededor del PSI. En el PSII hay un complejo de Magnesio-Oxígeno-Calcio ($\text{Mn}_4\text{O}_x\text{Ca}$); Tyr: Tirosina-161 en la proteína D1; P680^* : Estado electrónico excitado de P680; Pheo: Feofitina; Q_A : Plastoquinona aceptor de un electrón; Q_B : Plastoquinona aceptor de dos electrones; PQ: Pool de moléculas móviles de plastoquinonas; $\text{Cyt}b_6$: Citocromob₆; FeS Proteína Hierro-Azufre (Proteína Rieske FeS); $\text{Cyt}f$: Citocromo f; PC: Plastocianina; P700: Donor de electrones primario del PSI; P700^* : Estado excitado del P700; A_0 : Aceptor de electrones primario para el PSI (monómero de Chl); A_1 : Vitamina K_1 ; F_x , F_A/F_B : centros Hierro-Azufre; Fd: Ferredoxina; FNR: Ferredoxina NADP reductasa; NADP^+ : Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.⁴ (Imagen extraída y modificada del sitio: http://www.life.illinois.edu/govindjee/2010_z-scheme.pdf)

Cuando un fotón es absorbido por el LHC se produce un estado electrónico excitado singlete de una molécula de clorofila. La energía de este estado excitado es transferida muy eficientemente al centro de reacción que está constituido por pigmentos, proteínas y un par especial de moléculas de clorofila-a que actúa como una trampa que suministra la energía primaria para los procesos fotosintéticos. El estado excitado tiene tres vías internas de desactivación: la primera es la emisión de fluorescencia, la segunda es disipación de calor (quenching no fotoquímico) y la última es proporcionar la energía necesaria para llevar a cabo las reacciones primarias de la fotosíntesis. Cuando el estado excitado no puede desactivarse por ninguna de las vías anteriores ocurre cruce intersistema donde el estado singlete ($^1\text{Chl}^*$) es convertido a un estado triplete ($^3\text{Chl}^*$). Esta vía de desactivación del estado excitado actúa cuando la disipación de energía por los otros caminos no son eficientes y genera la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que a posteriori dañan el aparato fotosintético ^{5,6}(Ver Figura 1.2)⁷

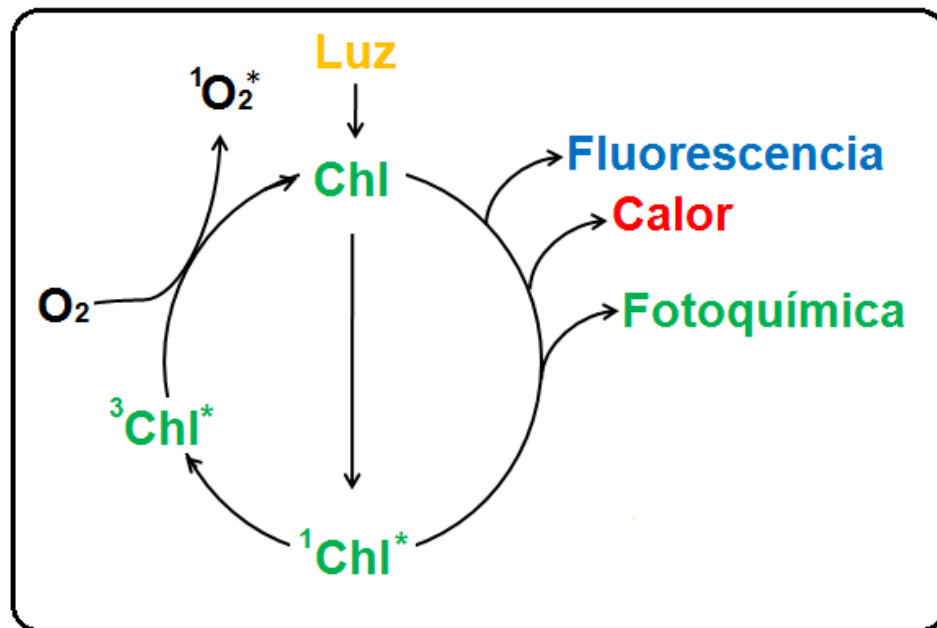


Figura 1.2 Aspectos básicos del origen de la fluorescencia. Chl: Clorofila-a; $^1\text{Chl}^*$: Estado excitado singlete de la clorofila-a; $^3\text{Chl}^*$: Estado excitado triplete de la clorofila-a; O_2 : Oxígeno; $^1\text{O}_2^*$: Estado excitado singlete del Oxígeno.

Los organismos fotosintéticos estudiados en esta tesis presentan fotosíntesis oxigénica.

1.2 Fluorescencia de la clorofila-a

La mayor parte de la fluorescencia de la clorofila-a, se origina en el complejo antena (LHC) del fotosistema II y se emite como fluorescencia a 680 nm.⁸ Este mecanismo de fotoprotección de los organismos fotosintéticos al igual que la disipación de calor siempre están activos evitando que se formen estados triplete ($^3\text{Chl}^*$).⁹ La cantidad de fluorescencia de clorofila-a es sólo 1-2% del total de luz absorbida ⁹ y es fácil de evaluar ya que los espectros de emisión de la fluorescencia son ligeramente diferentes de los de la luz absorbida. Además, debido a la alta sensibilidad que poseen los métodos actuales esta cantidad es suficiente para obtener información relevante del material vegetal y su estado fisiológico de una forma no destructiva.^{9,10}

Básicamente se pueden realizar dos tipos de experimentos para analizar la fluorescencia de la clorofila-a. El primero de ellos consiste en el análisis de la fluorescencia cuando el material fotosintético es previamente adaptado a la oscuridad y posteriormente es iluminado con un flujo de fotones suficientemente bajo ($< 20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) como para no inducir los procesos fotosintéticos. Bajo estas condiciones todos los aceptores de electrones en la cadena fotosintética están abiertos lo que genera un espectro con una distribución constante. Este tipo de espectros generalmente se llaman espectros de fluorescencia basal (F_0) y pueden ser registrados por un fluorímetro de estado estacionario convencional.^{11,12} El segundo método de análisis consiste en inducir la cinética de Kautsky (ver sección 1.2.2) y registrar la fluorescencia variable de clorofila utilizando un equipo de pulso de amplitud modulada (en inglés *Pulse Amplitude Modulated* fluorometer, PAM fluorometer) o mediante un equipo de adquisición rápida de datos.^{9,10,13-19}

1.2.1 Fluorescencia basal de la clorofila-a

Los espectros de fluorescencia basal (F_o) están caracterizados por tener dos bandas, una de ellas en el rojo (alrededor de 680 nm llamada F_{red}) y otra en el rojo lejano (alrededor de 730 nm llamada $F_{far-red}$). Estas bandas representan la emisión de fluorescencia de la clorofila-a de los dos fotosistemas (PSII y PSI). A temperatura ambiente el PSII contribuye en las dos bandas de emisión (F_{red} y $F_{far-red}$) mientras el fotosistema I (PSI) sólo contribuye en la banda $F_{far-red}$ (Figura 1.3).^{20,21}

La relación de intensidades de fluorescencia en el rojo y rojo lejano, $F_{red}/F_{far-red}$, es un parámetro ampliamente utilizado como indicador de estrés en plantas.^{12,22,23} Sin embargo, la interpretación de estos espectros de fluorescencia y la correlación de sus bandas con el estado fisiológico del material fotosintético pueden verse afectadas debido a la interacción de la luz con el material de estudio, generando procesos de reabsorción y re-emisión de luz. Estos procesos ocurren típicamente en muestras que poseen una alta concentración de pigmentos.^{11, 13,24}

En hojas sombreadas y en la parte abaxial de las hojas, se encontró que la relación de fluorescencia corregida es más alta que para hojas crecidas al sol y para las partes adaxiales de las hojas en general.²⁵ También se sabe que las plantas de sombra que crecen en condiciones de poca luz con longitudes de onda enriquecidas en el rojo lejano (preferentemente absorbidas por el PSI), sintetizan cantidades muy grandes de complejo antena II, que está asociado principalmente con el PSII.²⁶ Esto es debido a que la calidad de la luz también determina los estados de transición en el organismo fotosintético, balanceando la energía absorbida entre los dos fotosistemas y, por lo tanto, los tamaños de complejo antena relativos de PSI y PSII y la emisión de fluorescencia de estos.²⁷

Como la emisión de fluorescencia de clorofila en organismos fotosintéticos puede verse distorsionada por los procesos de reabsorción de luz, es importante realizar correcciones a estos espectros mediante el uso de modelos físicos que tienen en cuenta

estos eventos. Cabe destacar que los espectros de cloroplastos aislados se suponen libres de reabsorción de luz y no deben corregirse.^{11,24,28}

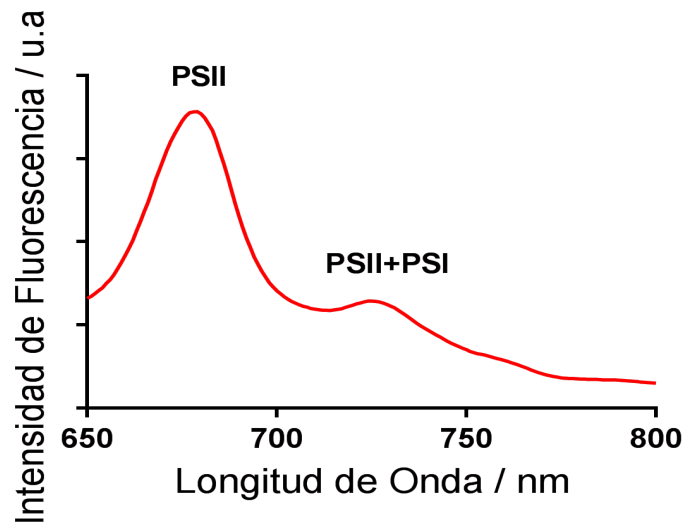


Figura 1.3 Espectro basal típico de fluorescencia de la clorofila-a (F_0) para hojas vegetales a temperatura ambiente. PSII: Fotosistema II; PSI: fotosistema I.

1.2.1.1 Correcciones por reabsorción de luz. Modelos

Las correcciones por procesos de reabsorción de luz deben aplicarse para evitar distorsiones espectrales siempre que se registre la intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda.

Las relaciones de las bandas $F_{red}/F_{far-red}$ de los espectros de fluorescencia basal de la clorofila-a sin corregir, se ven afectadas por el contenido de clorofila en el material fotosintético y también por los procesos de reabsorción de luz. Debido a estos procesos, la banda F_{red} (que se superpone con el espectro de absorción de la clorofila, Figura 1.4) decrece mientras la banda $F_{far-red}$ permanece casi intacta respecto de la emisión original que emerge de los cloroplastos.²⁸

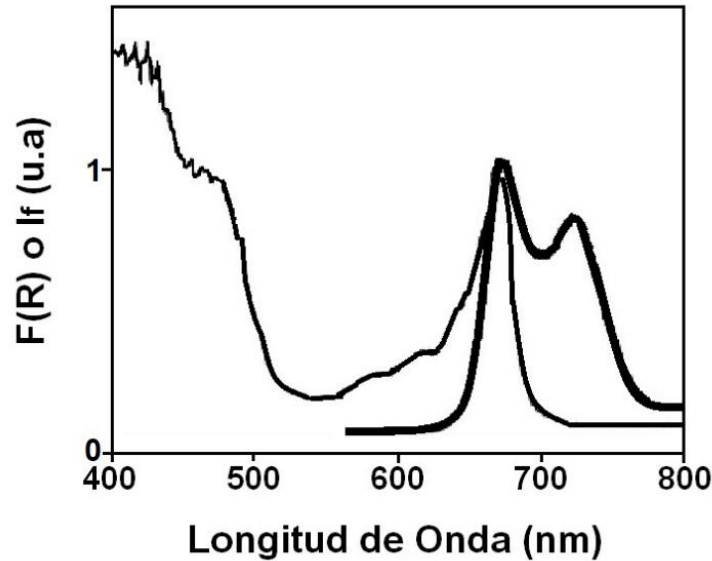


Figura 1.4 Espectros tipo de absorción (línea fina) y de fluorescencia de clorofila (línea gruesa) para hojas vegetales a temperatura ambiente.

Algunos autores sostienen que esta relación depende no sólo de la concentración de clorofila sino también de la contribución particular de cada fotosistema a la fluorescencia.^{20,29,30} El aumento de la relación $F_{red}/F_{far-red}$ (sin corrección) se ha relacionado con estrés fisiológico cuando el estrés ocasiona un descenso en la concentración de clorofila-a. Según estos estudios, la disminución de clorofila-a produce una reducción en los procesos de reabsorción de luz.³¹

No obstante, es relevante corregir adecuadamente los espectros de emisión de fluorescencia de la clorofila-a para poder correlacionar los valores obtenidos con el estado fisiológico del material (independientemente de la concentración de clorofila) y poder analizar el funcionamiento de los fotosistemas I y II.^{20,29,32}

Existen diferentes métodos para corregir los espectros de fluorescencia de la clorofila-a, los cuales han causado mucha controversia en literatura ya que no son equivalentes y producen diferentes resultados entre sí. Esto dificulta la interpretación de las características fisiológicas relacionadas al material fotosintético. Una discusión

exhaustiva de las bases físicas y las diferencias entre métodos está presentada en la referencia 28. En esta tesis se trabajará principalmente con los modelos de capa ópticamente delgada o de Agati *et al.* (MA) y el modelo de capa ópticamente gruesa o de Lagorio *et al.* (LM).^{11,33}

Los espectros experimentales de emisión de fluorescencia de la clorofila-a se corrigen en primer lugar por la respuesta del detector, $I_f^e(\lambda)$, para proceder luego a aplicar la corrección por los procesos de reabsorción de luz, $I_f^c(\lambda)$, usando las diferentes ecuaciones pertenecientes a cada modelo.

El grupo de investigación en el cual se llevó a cabo este trabajo de tesis, desarrolló previamente un modelo de corrección por reabsorción de fluorescencia³⁴, que fue correctamente validado en hojas,³³ y otro para corregir reabsorción de fluorescencia en frutos de manzana Granny Smith.^{33,35}

1.2.1.1.1 Modelo de capa ópticamente delgada

Este modelo de corrección (AM) se basa en una descripción teórica de la interacción entre la luz y la hoja donde se tienen en cuenta las siguientes suposiciones: (i) se considera una capa infinitesimal en la hoja, (ii) el haz de excitación se atenúa exponencialmente dentro de la hoja, (iii) se genera un haz de fluorescencia en la capa infinitesimal y se atenúa exponencialmente por la reabsorción de la luz, (iv) la fluorescencia se emite isotrópicamente dentro de la hoja, (v) la dispersión de la luz se tiene en cuenta al considerar una longitud de trayectoria efectiva, (vi) las pérdidas de luz lateral se desprecian (pequeño espesor de la hoja), (vii) la fracción de radiación no absorbida está relacionada con los datos experimentales $(r_\lambda + t_\lambda)$.¹¹

La validación de este método se realizó en literatura comparando los espectros de emisión corregidos por reabsorción para hojas de tomate que diferían en la concentración de clorofila y la estructura del cloroplasto.

Las correcciones se realizan siguiendo la ecuación 1.1, donde se multiplica el espectro experimental por una función f (ecuación 1.2) donde: r_{λ_0} y t_{λ_0} representan la reflectancia y transmitancia de una hoja respectivamente, a la longitud de onda de excitación mientras que r_{λ} y t_{λ} se refieren a la reflectancia y transmitancia de una hoja, respectivamente, a la longitud de onda de emisión.

$$I_f^c(\lambda) = I_f^e(\lambda)f \quad (1.1)$$

$$f = \frac{\ln^{-1}/(r_{\lambda_0}+t_{\lambda_0}) + \ln^{-1}/(r_{\lambda}+t_{\lambda})}{\ln^{-1}/(r_{\lambda_0}+t_{\lambda_0})} \cdot \frac{1-r_{\lambda_0}-t_{\lambda_0}}{1-(r_{\lambda_0}+t_{\lambda_0})(r_{\lambda}+t_{\lambda})} \quad (1.2)$$

1.2.1.1.2 Modelo de capa ópticamente gruesa

Este modelo de corrección (LM) se basa en una descripción física de la interacción entre la luz y las hojas siguiendo el fundamento general de la teoría de Kubelka-Munk³⁴.

Este enfoque consiste en un modelo de dos flujos basado en los siguientes supuestos: (i) las hojas se comportan como un difusor ideal, (ii) la emisión se produce en cada elemento de volumen y se descompone en dos flujos de fotones que tienen la misma magnitud, pero direcciones opuestas. El modelo se validó en hojas comparando los espectros de fluorescencia de hojas apiladas corregidos por el proceso de reabsorción de luz con los espectros de fluorescencia de una capa delgada de cloroplastos (donde los procesos de reabsorción de luz son despreciables) a diferentes longitudes de onda de excitación.³³

Los espectros de fluorescencia experimentales se corrigen por procesos de reabsorción de luz siguiendo la ecuación 1.3, donde se dividen los espectros experimentales por una función $\gamma(\lambda, \lambda_0)$ (ecuación 1.4) que depende de la longitud de onda de excitación (λ_0) y de emisión (λ).

$$I_f^c(\lambda) = \frac{I_f^e(\lambda)f}{\gamma(\lambda, \lambda_0)} \quad (1.3)$$

$$\gamma(\lambda, \lambda_0) = \frac{1}{1 + \sqrt{\frac{F(R_\lambda)}{F(R_\lambda)+2}}} \cdot \frac{1}{1 + \sqrt{\frac{F(R_\lambda)(F(R_\lambda)+2)}{F(R_{\lambda_0})(F(R_{\lambda_0})+2)}}} \quad (1.4)$$

Donde $F(R_\lambda)$ es la función de re-emisión a la longitud de onda λ , definida por la ecuación 1.5:

$$F(R_\lambda) = \frac{(1-R_\lambda)^2}{2R_\lambda} \quad (1.5)$$

1.2.2 Fluorescencia variable de clorofila-a. Cinética de Kautsky

El análisis de la fluorescencia de la clorofila-a en plantas es una herramienta de alta sensibilidad que nos permite su monitoreo de una manera no destructiva, rápida y eficiente, además de brindar información suficiente sobre la presencia de algún daño antes de que éste pueda observarse a simple vista.³⁶⁻³⁹ De hecho, el análisis de la fluorescencia variable de clorofila (Efecto Kautsky)²³ está vinculado con el proceso de fotosíntesis y ofrece información sobre el funcionamiento operativo del fotosistema II (PSII) y sobre las alteraciones en el mecanismo fotosintético cuando las plantas y/o algas son expuestas a cualquier tipo de estrés.^{40,41}

1.2.2.1 Fluorescencia variable de clorofila. Adquisición rápida de datos OJIP.

Los primeros cambios en la emisión de fluorescencia de la clorofila-a en plantas los observó en 1931 el químico austríaco Hans Kautsky. Este científico registró “a simple vista” una variación en la intensidad de fluorescencia de hojas previamente adaptadas a la

oscuridad, cuando éstas eran irradiadas con luz, acompañando la inducción de la actividad fotosintética (Efecto Kautsky).⁴²

En un análisis típico de la inducción rápida del efecto Kautsky se observa que la fluorescencia de la clorofila-a varía desde un valor mínimo O (origen) hasta un valor máximo P (pico) (Ver Figura 1.5). Entre los puntos O y P se encuentran niveles intermedios J e I. Estos cambios en la fluorescencia se llevan a cabo en una fase rápida y pueden ser correlacionados con los eventos que toman lugar en reducciones sucesivas de los aceptores de electrones en toda la cadena de transporte electrónico de la fotosíntesis.⁴³

En materiales fotosintéticos adaptados a la oscuridad, los aceptores de electrones del PSII están mayormente en estado oxidado, los centros de reacción (CR) abiertos y la fluorescencia en su intensidad mínima F_0 , la cual corresponde al estado O. Al ser irradiados con una luz de alta intensidad (saturante), se aprecia un incremento de la fluorescencia con diferentes puntos de inflexión. La porción que va desde O hasta J, es conocida como la fase fotoquímica y es muy rápida (aproximadamente 2ms). Ésta depende de la intensidad de la luz de excitación y refleja la reducción de la plastoquinona A (Q_A). El siguiente punto de inflexión de J hasta I refleja la reducción del siguiente aceptor de electrones en la cadena, la plastoquinona B (Q_B). Finalmente, cuando se alcanza el máximo de fluorescencia P (también conocido como F_m), el pool de plastoquinonas (PQ) se encuentra totalmente reducido, debido a la reducción total de la cadena de transporte electrónico como resultado de una acumulación de electrones del lado aceptor del PSI.^{44,45}(Ver Figura1.5)

El análisis OJIP dura menos de 1s, que es el tiempo que tarda la fluorescencia de la Chl-a en alcanzar su valor máximo.

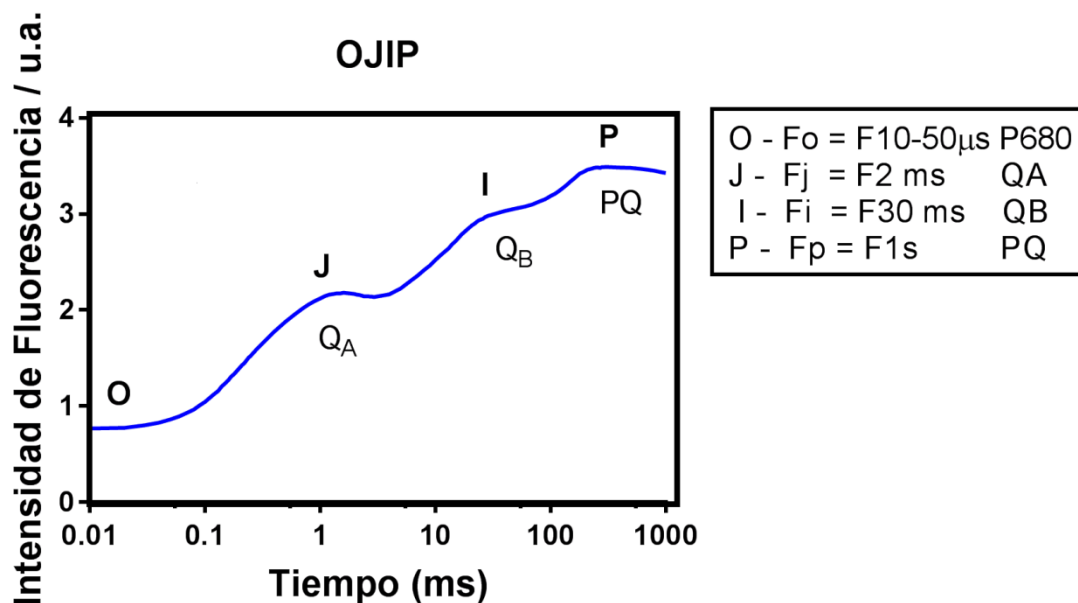


Figura 1.5 Curva OJIP de la fluorescencia de la clorofila-a en escala logarítmica, donde se puede observar los diferentes aceptores de electrones de la cadena fotosintética correspondiente a cada punto de inflexión de la curva. Q_A : Plastoquinona A; Q_B : Plastoquinona B; PQ: Pool de plastoquinonas.

Basado en la teoría de flujos de flujos en biomembranas, se desarrolló un análisis para el aumento rápido de la fluorescencia (OJIP), y se denominó test OJIP. Este ensayo relaciona los diferentes pasos y fases del transiente con estados redox en el PSII y simultáneamente con la eficiencia de la transferencia de electrones dentro la cadena de aceptores electrónicos finales en el lado aceptor del PSI. Las expresiones de los flujos de energía y las fórmulas matemáticas relacionadas con el test OJIP se encuentran en la tabla 1.1.

Tabla 1.1 Definición de términos y fórmulas de los parámetros obtenidos a partir de un test OJIP usados para el análisis de fluorescencia de la clorofila-a emitida por muestras fotosintéticas adaptadas a la oscuridad. La fluorescencia (F) se refiere solo a la fluorescencia inicial y RC a los centros de reacción de PSII activos (reductores de QA).

Datos extraídos del registro del transiente de fluorescencia OJIP	
F_t	Fluorescencia a tiempo t después del encendido de la luz actínica
$F_{20\mu s}$	Primera fluorescencia registrada a 20 μs
$F_{300\mu s}$	Intensidad de fluorescencia a $F_{300\mu s}$
$F_J \equiv F_{2ms}$	Intensidad de Fluorescencia en el paso J (2 ms) de la curva OJIP
$F_I \equiv F_{30ms}$	Intensidad de fluorescencia en el paso I (30 ms) de la curva OJIP
F_P	Máxima intensidad de fluorescencia registrada, en el pico P de la curva OJIP
t_{FM}	Tiempo (en ms) para alcanzar la máxima intensidad de fluorescencia F_M
ΔF	Incremento de fluorescencia por ms
Área	Área complementaria total entre la curva de inducción de fluorescencia
Parámetros de fluorescencia derivados de los datos obtenidos	
$F_0 \cong F_{20\mu s}$	Fluorescencia Mínima, cuando todos los RCs están abiertos
$F_M (= F_P)$	Fluorescencia máxima, cuando todos los RCs están cerrados (= F_P cuando la intensidad de la luz actínica es mayor a 500 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ siempre que todos los RCs están activos como Q_A reducida)
$F_v \equiv F_t - F_0$	Fluorescencia variable en el tiempo t
$F_V \equiv F_M - F_0$	Máxima fluorescencia variable
$S_m \equiv \text{Área}/(F_M - F_0) = \text{Área}/F_V$	Área normalizada
$V_t \equiv F_v/F_V \equiv (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescencia variable relativa en el tiempo t
$V_J = (F_J - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescencia variable relativa en el paso J
$V_I = (F_I - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescencia variable relativa en el paso I

$$M_0 \equiv [(\Delta F/\Delta t)_0 / (F_M - F_{50\mu s})] \equiv 4 (F_{300\mu} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})$$

Pendiente inicial aproximada (en ms⁻¹) del transiente de fluorescencia normalizado en el máximo de fluorescencia variable F_v

Parámetros biofísicos derivados de los parámetros de fluorescencia

$$EC/RC = S_m = \text{Área} / (F_M - F_0)$$

Una medida del total de transportadores de electrones por RC

Constantes de velocidad de desexcitación de la antena PSII

$$k_N = (ABS)k_F (1/F_M)$$

Constante de velocidad de desexcitación no fotoquímica (ABS: flujo de energía absorbida; k_F constante de velocidad para la emisión de fluorescencia)

$$k_P = (ABS)k_F (1/F_0 - 1/F_M) = k_N (F_V/F_0)$$

Constante de velocidad fotoquímica de desexcitación

Parámetros biofísicos derivados de los parámetros de fluorescencia

Flujos de energía específicos (por Q_A reducida del centro de reacción (RC) del PSII)

$$ABS / RC = M_0 (1 / V_J) (1 / \Phi P_0)$$

Flujo de absorción (de la Chl de la antena) por CR (también una medida del tamaño de la antena del PSII)

$$TR_0 / RC = M_0 (1 / V_J)$$

Flujo de energía atrapada (conducido a la reducción Q_A) por CR

$$ET_0 / RC = M_0 (1 / V_J) (1 - V_I)$$

Flujo de transporte electrónico (más allá de Q_A) por CR

$$RE_0 / RC = M_0 (1 / V_J) (1 - V_I)$$

Reducción del flujo de electrones y aceptores de electrones en el lado aceptor del PSI por CR

$DI_0/RC = (ABS/RC - TR_0/RC)$	Flujo de energía disipada por RC (a t = 0)
<i>Rendimiento cuántico y eficiencias / probabilidades</i>	
$\phi_{Pt} \equiv TR_t/ABS = [1 - (F_t / F_M)] = \Delta F_t / F_M$	Rendimiento cuántico para fotoquímica primaria a cualquier tiempo t, de acuerdo a la ecuación general de Pailltin (1976) ⁴⁶
$\phi_{Po} \equiv TR_0 / ABS = [1 - (F_0 / F_M)]$	Máximo rendimiento cuántico de fotoquímica primaria
$\psi_{Eo} \equiv ET_0 / TR_0 = (1 - V_J)$	Eficiencia / probabilidad que un electrón se mueva más allá de Q _A ⁻
$\phi_{Eo} \equiv TR_0 / ABS = [1 - (F_0 / F_M)] = (1 - V_J)$	Rendimiento cuántico para el transporte electrónico (ET)
$\delta_{Ro} \equiv RE_0 / ET_0 = (1 - V_I) (1 - V_J)$	Eficiencia / probabilidad con la cual un electrón del intersistema transportador de electrones es transferido al último aceptor de electrones reducido en el lado aceptor en el PSI (RE)
$\phi_{Ro} \equiv RE_0/ABS = [1 - (F_0 / F_M)] = (1 - V_I)$	Rendimiento cuántico para el último aceptor de electrones reducido en el lado aceptor del PSI (RE)
$\gamma_{RC} = Chl_{RC} / Chl_{total} = RC / (ABS/RC)$	Probabilidad que una molécula de clorofila del PSII funcione como RC
<i>Índice de rendimientos (Productos de términos que expresan potenciales parciales en pasos de bifurcaciones de energía)</i>	
$PI_{ABS} \equiv \frac{\gamma_{RC}}{1 - \gamma_{RC}} \cdot \frac{\phi_{Po}}{1 - \phi_{Po}} \cdot \frac{\psi_{Eo}}{1 - \psi_{Eo}}$	Índice de rendimiento (potencial) para la conservación de la energía de los fotones absorbidos por el PSII para la reducción de los aceptores de electrones del intersistema
$PI_{total} \equiv PI_{ABS} \cdot \frac{\delta_{Ro}}{1 - \delta_{Ro}}$	Índice de rendimiento (potencial) para la conservación de energía de los fotones absorbidos por el PSII para la reducción de los aceptores finales del PSI

El subíndice “0” (o “o” cuando es escrito después de otro subíndice) indica que el parámetro es referido al inicio de la iluminación, cuando todos los RCs se asume que están abiertos.

Modificado de Strasser *et al.*, 2010⁴⁷.

Una descripción detallada y discusión de los parámetros de la Tabla 1.1 pueden encontrarse en las referencias Strasser *et al.*, 2000⁴⁸ y Strasser *et al.*, 2010.⁴⁷

1.2.2.2 Método de pulsos de saturación de Kautsky

Cuando la luz absorbida por los pigmentos fotosintéticos en las plantas y algas es transferida a un par de moléculas de clorofila-a (P680) en el fotosistema II, el P680 excitado puede experimentar tres vías de desactivación: i) transferencia de electrones para realizar la fotosíntesis, ii) disipación de calor y iii) decaimiento por emisión de fluorescencia. Estos tres procesos son competitivos entre sí, por esto, cualquier aumento en la eficiencia de uno de ellos conduce a una disminución en la eficiencia de al menos uno de los otros. De esta manera, la fluorescencia de la clorofila-a se conecta con la fotosíntesis y con la disipación de calor y el análisis del primer proceso proporciona información sobre los otros dos.^{9,49,50}

Cuando el material fotosintético previamente adaptado a la oscuridad es expuesto a la luz, se observa un aumento en el rendimiento cuántico de la fluorescencia de la clorofila-a debido a la saturación de la cadena de transferencia de electrones (centros de reacción cerrados) y se registra la fluorescencia variable. A continuación, la fluorescencia comienza a caer en un proceso llamado "quenching de la fluorescencia" que dura varios minutos para finalmente alcanzar un estado estacionario (Fs). El quenching de la fluorescencia tiene una contribución fotoquímica y otra no fotoquímica. El quenching fotoquímico (qP) se debe a la activación de las enzimas involucradas en el ciclo del carbono inducido por la luz y la apertura de las estomas y el quenching no fotoquímico (qNP) se debe a un aumento en los rendimientos de la disipación de calor.⁹

El fenómeno descrito se conoce como cinética de Kautsky,⁵¹ y permite calcular diferentes parámetros fotosintéticos útiles conectados al estado fisiológico de la planta, así como la partición de la energía absorbida y su distribución en los diferentes mecanismos. Estos parámetros se pueden obtener explícitamente utilizando la aproximación de rendimiento cuántico presentada previamente por Hendrickson *et al.*

(2004)⁵² y por Guadagno *et al.*, (2010).⁵³ Mediante este enfoque es posible realizar una evaluación precisa del reparto de energía en el complejo del PSII, el rendimiento cuántico del decaimiento fotofísico (Φ_C) y el rendimiento cuántico del quenching no fotoquímico (Φ_{NPQ}).

Un registro típico de la cinética de Kautsky para material fotosintético puede observarse en la Figura 1.6. En hojas previamente adaptadas a la oscuridad, el pulso de luz saturante causa un incremento desde un nivel basal de fluorescencia F_o hasta su máximo valor F_m . La altura de este pico desde F_o hasta F_m es llamada F_v y representa la fluorescencia variable. La relación F_v/F_m es igual al valor de la máxima eficiencia fotoquímica del PSII. Después del primer pulso de luz, una luz actínica es activada lo que induce la activación de todos los procesos fotosintéticos y cuando estos llegan a un estado estacionario se obtiene el valor de F_s que representa el valor basal de fluorescencia cuando el material fotosintético es adaptado a la luz. En este momento la aplicación de un pulso de luz saturante da como resultado la emisión máxima de fluorescencia en presencia de luz llamada F_m' .⁵⁴ Estos valores permiten realizar el cálculo de los coeficientes para el quenching fotoquímico (qP) y no fotoquímico (NPQ) mediante las siguientes ecuaciones:

$$qP = \frac{Fm' - Fs}{Fm' - Fo} \quad (1.6)$$

$$NPQ = \frac{Fm - Fm'}{Fm'} \quad (1.7)$$

El valor de F_m representa la cantidad de procesos fotoquímicos, mientras que la diferencia entre F_m y F_m' se refiere a la presencia del proceso de quenching no fotoquímico.

Cuando la luz actínica se desactiva, se observa un nuevo mínimo de fluorescencia F_o' que es medido correctamente aplicando un pulso de luz con una longitud de onda en la región del rojo lejano (730nm) el cual permite re-oxidar rápidamente los centros de reacción.^{9,55}

La cinética se puede registrar por medio de un fluorómetro de clorofila de pulso de amplitud modulado (PAM).⁵⁶ A partir de este experimento, diferentes parámetros fotosintéticos como: la fluorescencia basal en un estado adaptado a la oscuridad (F_o), la fluorescencia basal en un estado adaptado a la luz (F_o'), la fluorescencia máxima en estado de adaptación a la luz (F_m'), el máximo rendimiento cuántico de fotosíntesis del PSII en estado adaptado a la luz (F_v'/F_m' , calculado como $(F_m' - F_o')/F_m'$), la relación entre la fluorescencia variable y la basal en el estado adaptado a la luz (F_v'/F_o'), la eficiencia cuántica de PSII ($\Phi_{PSII} = (F_m' - F_o')/F_m'$), la fluorescencia relativa no quencheada (UQF = $(F_s - F_o')/(F_m - F_o')$), el coeficiente de quenching fotoquímico ($q_P = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o)$), el coeficiente de quenching no fotoquímico ($q_{NP} = (F_m - F_m')/(F_m - F_o)$), y la definición alternativa del quenching no fotoquímico ($NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$), pueden determinarse^{53,56,57}.

La energía absorbida por la planta se reparte entre la fotosíntesis (Φ_{PSII}), la disipación de calor (quenching no fotoquímico, Φ_{NPQ}) y el decaimiento fotofísico (Φ_C) (ver sección 1.4). La suma de estos tres rendimientos cuánticos debe ser igual a la unidad ($\Phi_{PSII} + \Phi_{NPQ} + \Phi_C = 1$).^{53,58}

El conocimiento de la distribución de energía entre los diferentes procesos es relevante ya que permite dilucidar las estrategias que utilizan las plantas frente a diversas condiciones ambientales.

Con respecto al quenching no fotoquímico, presenta tres contribuciones distintas: un componente rápido, q_E , el quenching dependiente de la energía; un quenching intermedio, q_T , relacionado con un estado de transición y un componente lento, q_I , relacionado con el proceso de fotoinhibición.⁵⁹

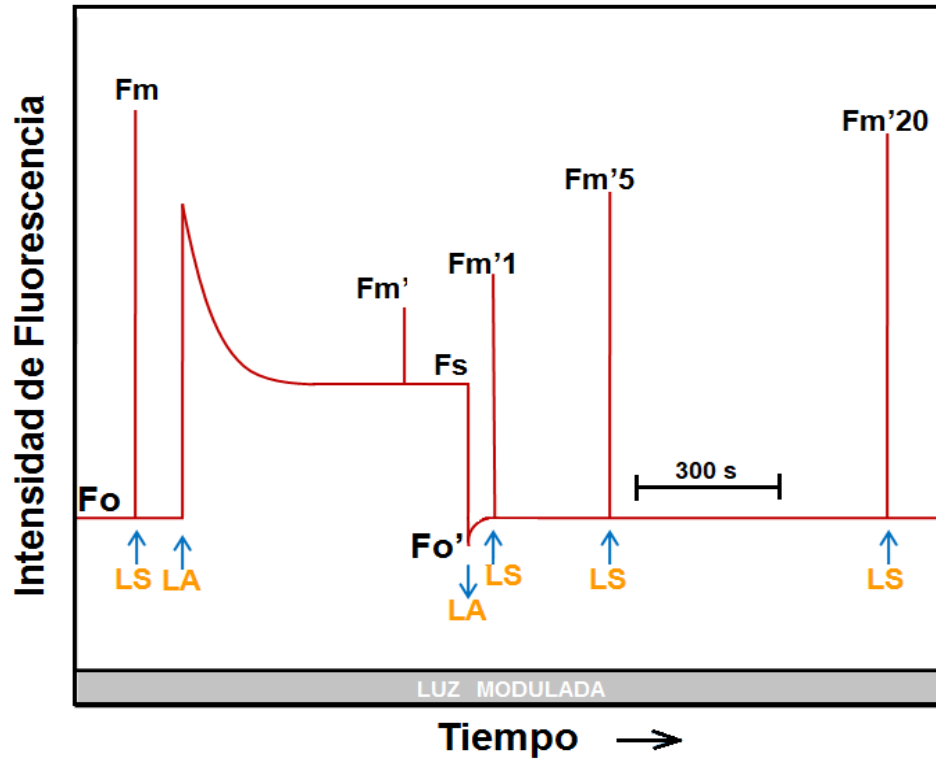


Figura 1.6 Diagrama de la cinética de inducción de fluorescencia de la clorofila-a (Cinética de Kautsky) en hojas previamente adaptadas a la oscuridad registrada con un fluorómetro PAM. La fluorescencia basal F_o es inducida por la luz modulada y el máximo de fluorescencia F_m es obtenido por un pulso de luz saturante (LS). Posteriormente, una luz actínica no saturante (LA) es encendida y la fluorescencia llega a un valor constante. Mediante un nuevo pulso de LS se registra el máximo de fluorescencia cuando el material fotosintético está adaptado a la luz (F_m') que decae a posteriori al estado basal de fluorescencia en presencia de luz (F_s). A continuación, la luz actínica (LA) se apaga y se registra el valor F_o' después de la re-oxidación del pool de plastoquinonas usando radiación en el rojo lejano. Después de apagarse la luz actínica (LA) se aplican pulsos de LS a 1, 5 y 20 min para registrar los máximos de fluorescencia (F_m') de los componentes de relajación.

Cabe destacar que no es necesario realizar la corrección por reabsorción de luz para los experimentos de cinética de Kautsky porque las proporciones se calculan a partir

de la fluorescencia para diferentes tiempos a las mismas longitudes de onda de excitación y emisión y los efectos de reabsorción se cancelan.

1.2.2.2.1 Tratamientos lumínicos

A continuación, se detallan los distintos tratamientos lumínicos que se aplican durante el registro de la Cinética de Kautsky.

Pulso de luz modulada (ML): Es un pulso de 1.8 μs , con una longitud de onda situada en el rojo (650 nm) y de baja irradiación ($<0.05 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) utilizado para inducir una señal pulsada de fluorescencia proveniente de la muestra, la cual se encuentra en oscuridad total. Este pulso modulado es lo suficientemente débil para no inducir un cambio fisiológico significativo en la muestra,⁶⁰ pero lo suficientemente intenso para proporcionar una señal confiable para el análisis de fluorescencia.

Luz Actínica (AL): Es la encargada de inducir los procesos fotosintéticos, pero su intensidad no es lo suficientemente alta para saturar todos los centros de reacción (RC). Es proporcionada por una lámpara halógena y puede iluminar a la muestra por varios minutos, según el procedimiento, con una irradiación que va de 1- 3000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Luz de Saturación (SL): Es un pulso de luz proveniente de la misma lámpara que proporciona la AL, con una duración de 0,3-1 s y una intensidad de 180 – 18000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este haz de luz es tan intenso que consigue saturar completamente los procesos fotoquímicos, donde todas las moléculas de plastoquinona A (Q_A) en los centros de reacción del fotosistema II son reducidas rápidamente (los CR se encuentran cerrados), por lo tanto, el excedente de energía es transferido a los mecanismos de emisión de fluorescencia de la clorofila-a y disipación de calor.

Pulso de luz en el rojo lejano: Es proporcionado por un LED con una longitud de onda de emisión de 735 nm, tiene 5 s de duración y una intensidad de 6 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La irradiación proporcionada en el rojo lejano sólo es absorbida por el fotosistema I (PSI) y remueve los electrones del lado aceptor de los centros de reacción del PSII, así, todas las moléculas de QA en el lado aceptor del PSII quedan totalmente oxidadas (el centro de reacción del PSII es abierto de nuevo). Este pulso es usado para determinar F_o' correctamente después de que se apaga la AL.

1.2.2.2.2 Regulación fotofísica de la antena

Cuando una molécula es excitada por absorción de luz, ésta puede decaer a su estado basal directamente vía fluorescencia (F) y/o conversión interna (IC), también puede sufrir un cruce entre sistema (ISC) en el estado triplete, desde el cual puede decaer a el estado fundamental. Cada uno de estos procesos posee una constante de velocidad intrínseca (k). La fracción de fotones absorbidos que son emitidos como fluorescencia representa el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) del estado excitado singlete más bajo de una molécula. Éste puede ser medido fácilmente y definido en términos de constantes de velocidad como:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{ISC} + k_{IC}} = \frac{k_F}{k_C} \quad (1.8)$$

Donde k_F , k_{IC} y k_{ISC} son las constantes de velocidad correspondientes al decaimiento al estado fundamental a través de fluorescencia, decaimiento mediante conversión interna y de cruce intersistema al estado triplete, respectivamente. La constante k_C se introduce como la suma de todas las constantes.^{58,61}

La técnica de análisis de la fluorescencia de la clorofila-a PAM, permite detectar cambios relativos en el rendimiento cuántico de fluorescencia, además, puede proveer un análisis preciso de las diferentes vías de desactivación de la clorofila excitada.

La relación entre las constantes cinéticas y los parámetros más relevantes de la cinética de Kautsky están dados por las siguientes ecuaciones:

$$F_m = G \frac{k_F}{k_F + k_{ISC} + k_{IC}} = G \frac{k_F}{k_C} \quad (1.9)$$

$$F_S = G \frac{k_F}{k_C + k_{NPQ} + k_P} \quad (1.10)$$

$$F_m' = \frac{k_F}{k_C + k_{NPQ}} \quad (1.11)$$

dónde: k_P , k_{NPQ} y k_C son las constantes de velocidad de reacción fotoquímica, quenching no fotoquímico y decaimiento fotofísico respectivamente, y G es el coeficiente de ganancia instrumental.^{58,62}

El valor de la constante de velocidad de k_{NPQ} está compuesto por la suma de las constantes de sus componentes qE , qT y qI ($k_{NPQ} = k_{qE} + k_T + k_{qI}$). De esta forma es posible definir F_m'' (ecuación 1.12), valor que se refiere al máximo nivel de fluorescencia medido 10 min después de apagar la luz actínica, después de que la componente qE se desactivó, dejando a qT y qI como las únicas componentes activas.⁵⁸

$$F_m'' = \frac{k_F}{k_C + k_{qT} + k_{qI}} \quad (1.12)$$

1.2.2.2.3 Quenching no fotoquímico

El Quenching no fotoquímico es una combinación de procesos de disipación de calor que poseen las plantas y algas para protegerse del exceso de alta irradiación lumínica y así evitar la producción de ROS.^{59,63,64} Este parámetro está compuesto por tres componentes, cada una de ellas con un comportamiento cinético diferente. La primera de ellas es la componente del quenching del exceso de energía de excitación (qE), que abarca procesos no enzimáticos (físicoquímicos) y enzimáticos que conducen a la disipación del exceso de energía como calor. Se activa cuando hay una alta concentración de protones en el lumen, como consecuencia de la ruptura del agua y la transferencia de protones desde el estroma al lumen durante el transporte de electrones. El qE funciona a través de

procesos enzimáticos que registran el nivel de acidez en el lumen y posteriormente conduciendo la disipación del exceso de energía de excitación como calor. La segunda componente es el quenching del estado de transición (qT_{1-2}), debido a la transición del aparato fotosintético del estado T1 (alta fluorescencia) al estado T2 (Baja fluorescencia), seguido de una fosforilación reversible del complejo antena del (LHC) del PSII. Por último, se tiene la componente del quenching de fotoinhibición (qI), que es la componente más lenta, causada por la fotoinhibición del PSII.⁵⁹

1.3 Ciclo de las xantófilas

Las xantófilas abarcan un grupo diverso de carotenoides oxigenados con variedad de estructuras y múltiples funciones.⁶⁵ En la mayoría de organismos eucariotas, las xantófilas se encuentran generalmente con las moléculas de clorofila en los complejos antena, donde funcionan como pigmentos accesorios.^{66,67}

Las xantófilas están involucradas en la desactivación del singlete de clorofila ($^1Chl^*$) que se acumula en los complejos antena bajo condiciones de iluminación excesiva.^{63,68,69} Esta desactivación es medida como quenching no fotoquímico de la fluorescencia de la clorofila-a (NPQ) y depende de un gradiente de protones que se genera por las altas intensidades de luz. El NPQ está correlacionado con el ciclo de las xantófilas VAZ (Violaxantina, Antheraxantina y Zeaxantina) presente en plantas y algas. Éste ayuda a disipar el exceso de excitación electrónica, que momentáneamente se encuentra en la $^1Chl^*$ alrededor de los complejos antena.

Este ciclo se caracteriza por la conversión de violaxantina en antheraxantina y posteriormente en zeaxantina (Figura 1.7), mediante una serie de epoxidaciones inducidas por la luz.⁷⁰

La violaxantina se encuentra cuando la luz que llega a las moléculas de clorofila no es excesiva y la planta no necesita de ningún proceso de fotoprotección, pero a medida que aumenta la intensidad de radiación incidente o por fallas en el aparato fotosintético,

los protones en el lumen comienzan a acumularse haciendo que el pH disminuya. En medios ligeramente ácidos, la enzima violaxantina deepoxidasa se activa y se produce la conversión de violaxantina a anteraxantina y finalmente a zeaxantina. Estos dos productos son xantófilas que poseen un estado singlete más bajo y pueden aceptar energía de excitación directamente del $^1\text{Chl}^*$ ofreciendo un drenaje de energía y protegiendo al CR de una excesiva excitación. Posteriormente, la xantofila retorna a su estado fundamental por disipación no radiativa de calor.⁷¹⁻⁷³

Cuando hay acumulación de $^1\text{Chl}^*$ se favorece el cruce a un estado triplete ($^3\text{Chl}^*$) el cual facilita la formación de moléculas de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2^*$). Estas dos especies pueden ser desactivadas por el estado triplete de las xantofilas.⁷⁴

Cuando las condiciones vuelven a estados más favorables para el fotosistema, la zeaxantina oxidasa hace que la zeaxantina pase a anteraxantina y posteriormente a violaxantina (Figura 1.7).⁷⁵

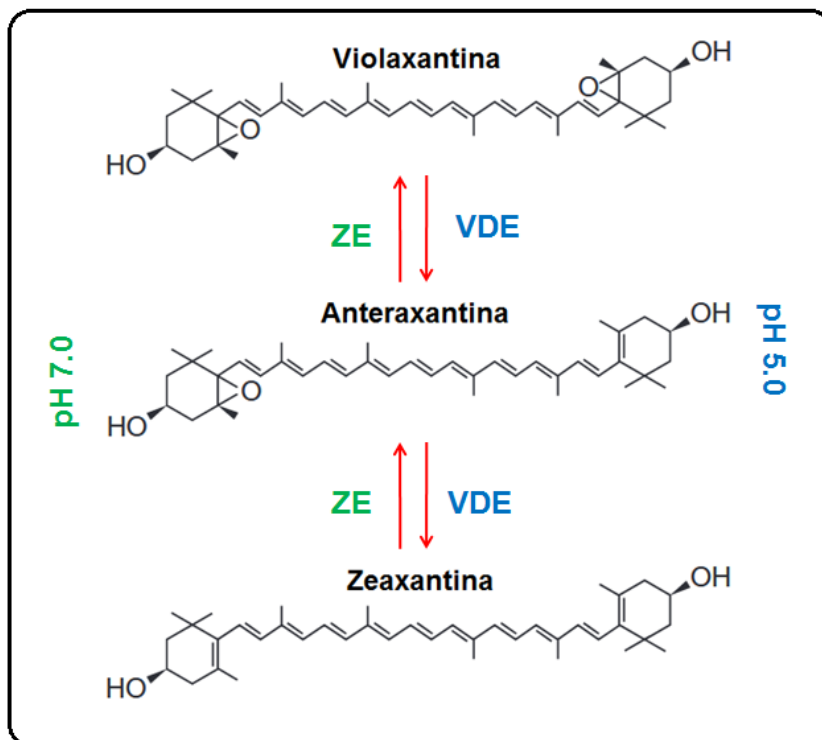


Figura 1.7 Ciclo de las xantofilas. VDE: Violaxantina deepoxidasa; ZE: Zeaxantina epoxidasa.

1.4 Componentes de los rendimientos cuánticos

Utilizando los datos obtenidos de la cinética de Kautsky y las constantes de velocidad se puede representar en ecuaciones los rendimientos cuánticos de las diferentes vías de desactivación de clorofila-a excitada.

Uno de los parámetros más importante y extensamente utilizado es el rendimiento cuántico del PSII (Φ_{PSII}) que ha sido definido como:

$$\Phi_{PSII} = \frac{k_P}{k_C + k_{NPQ} + k_P} = \frac{F'_m - F_s}{F'_m} \quad (1.13)$$

Se puede apreciar en la ecuación 1.13 que todas las constantes de velocidad de los procesos capaces de desactivar el estado singlete excitado ($^1\text{Chl}^*$) en el sistema, aparecen en el denominador.^{52,58,76}

El rendimiento cuántico del quenching no fotoquímico (Φ_{NPQ}), es estimado de una forma similar:^{52,62}

$$\Phi_{NPQ} = \frac{k_{NPQ}}{k_C + k_{NPQ} + k_P} = \frac{F_m - F'_m}{F_m} \cdot \frac{F_s}{F'_m} \quad (1.14)$$

El rendimiento cuántico de decaimiento fotofísico (Φ_C), puede ser obtenido como:

$$\Phi_C = \frac{k_C}{k_C + k_{NPQ} + k_P} = \frac{F_s}{F_m} \quad (1.15)$$

Se pueden obtener también las expresiones de los rendimientos cuánticos para las componentes del NPQ (Φ_{qE} , y $\Phi_{qT} + \Phi_{qI}$) a través de las siguientes expresiones:

$$\Phi_{qE} = \frac{k_{qE}}{k_C + k_{NPQ} + k_P} = \frac{F_m'' - F_m'}{F_m''} \cdot \frac{F_S}{F_m'} \quad (1.16)$$

$$\Phi_{qT+qI} = \frac{k_{qT} + k_{qI}}{k_C + k_{NPQ} + k_P} = \frac{F_m - F_m''}{F_m} \cdot \frac{F_S}{F_m''} \quad (1.17)$$

Se debe destacar que las estimaciones para los rendimientos cuánticos (Φ_{PSII} , Φ_{NPQ} , Φ_C , Φ_{qE} , y $\Phi_{qT} + \Phi_{qI}$), de acuerdo a las ecuaciones 1.13 - 1.17, reflejan los rendimientos cuánticos reales de los procesos respectivos en una hoja bajo condiciones de luz que fluctúan naturalmente, ya que se tiene en cuenta la suposición de que cierta fracción de los centros de reacción permanecen en estado abierto.⁵⁸

Capítulo 2

Objetivos

2.1 Objetivo del trabajo

Este trabajo de tesis se enmarca en un proyecto que se desarrolla en el área de la fotoquímica y fotobiología y que posee como propósito el estudio y modelado de la interacción entre la luz y material biológico para obtener información sobre la muestra en forma no destructiva.

El objetivo general de esta tesis es estudiar en detalle los procesos de transferencia de energía en sistemas fotosintéticos naturales con énfasis en el quenching no fotoquímico y los parámetros fotosintéticos asociados a la fluorescencia de la clorofila-a. Además, se analizan las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de plantas, frutos y algas y su variación como respuesta a factores de estrés para correlacionarlas con el estado fisiológico.

A partir de métodos ópticos y espectroscópicos se explora no sólo la obtención de información básica a nivel fisiológico en los organismos fotosintéticos sino el desarrollo de metodologías aplicadas a la evaluación de salud vegetal, de calidad de alimentos y de diagnóstico ambiental.

2.2 Resumen y objetivo de los experimentos

Esta tesis comienza con el estudio de la influencia de la pigmentación de hojas vegetales sobre la forma en que se reparte la luz absorbida dentro del vegetal. Para ello se realizó el análisis de la fluorescencia de clorofila-a y de la partición de energía en el PSII para dos variedades de *Fittonia albivenis* con contenidos de antocianinas apreciablemente diferentes. Adicionalmente, se sometieron los ejemplares a diferentes intensidades de luz y a estrés hídrico para analizar la posible correlación entre la capacidad de resistencia a estos tipos de estrés y sus respectivas pigmentaciones (**Capítulo 3**).

A continuación, se desarrolló el análisis de fluorescencia de la clorofila-a para plantas con diferentes metabolismos de fijación de CO₂. En este experimento se sometieron a estrés hídrico tres especies de plantas, cada una con un metabolismo de fijación de CO₂ diferente y se observó cómo influía la manera de fijar el carbono sobre los diferentes parámetros fotosintéticos y sobre la partición de energía en el PSII. Adicionalmente, se evaluó cómo se modificaban los parámetros estudiados según el porcentaje de humedad en el suelo. Para complementar este ensayo se realizó un test OJIP sobre 43 especies de plantas que diferían en sus metabolismos de fijación de CO₂. Mediante métodos de análisis multivariado (método de componentes principales) se clasificaron y agruparon los parámetros fotosintéticos vinculándolos con alguno de los tipos de metabolismo. (**Capítulo 4**).

Posteriormente, se estudió la variabilidad en los espectros de fluorescencia de la clorofila-a en frutos de berenjena (*Solanum melongena*) crecidos bajo diferentes distribuciones espectrales de luz solar. Se analizó en detalle la fluorescencia de la clorofila-a presente en la pulpa de frutos de berenjena que recibieron diferentes tipos de luz según los pigmentos de su cáscara que atenuaban diferentes longitudes de onda. Adicionalmente, se desarrolló un método no destructivo basado en el registro de la fluorescencia para monitorear el estado fisiológico de las berenjenas cuando son almacenadas a diferentes temperaturas. (**Capítulo 5**).

Finalmente, se analizó la fluorescencia de la clorofila en el alga unicelular *Parachlorella kessleri* y la variación de los parámetros fotosintéticos en presencia del herbicida Atrazina, que interviene en el transporte electrónico de la cadena fotosintética. Para esto se expusieron algas de *P. kessleri* a diferentes concentraciones de Atrazina a través del tiempo y se realizó un análisis de fluorescencia exhaustivo. (**Capítulo 6**).

Capítulo 3

Análisis de la fluorescencia de clorofila y la partición de energía en el PSII para dos variedades de *Fittonia albivenis* con pigmentaciones diferentes

3.1 Introducción

La respuesta de las plantas a factores ambientales puede depender de diversas características de las mismas. En especial, la composición de pigmentos puede tener un efecto sobre los mecanismos de protección frente a factores agresivos extremos y puede influir en el aumento o disminución del daño en la actividad fotosintética. En particular, se ha demostrado que las antocianinas, pigmentos de color rojo, púrpura o azul, han presentado una acción protectora frente a altas intensidades de luz solar, actuando como una pantalla.^{77,78} Se ha informado en literatura la inducción de la síntesis de antocianinas en plantas como respuesta a distintos factores de tensión: alta intensidad de luz en el visible y en el UVB, bajas temperaturas y sequías.⁷⁹ En un estudio reciente, se encontraron mayores niveles de antocianina en hojas jóvenes de árboles subtropicales sometidas a intensidades de luz solar altas que para aquellas crecidas bajo irradiancias más bajas.⁸⁰

Adicionalmente, el contenido de antocianinas se correlacionó directamente con la capacidad antioxidante en las plantas.⁸⁰

En este capítulo, la hipótesis tentativa es que el diferente contenido de pigmentos para plantas de la misma especie afectará de manera disímil su comportamiento frente a cambios en el ambiente y, consecuentemente, impactará de manera distinta sobre sus propiedades fotofísicas y sobre la partición de energía entre los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos. Dentro de este marco se estudió comparativamente la fluorescencia de clorofila de dos variedades de plantas de *Fittonia albivenis* con diferente pigmentación: *Fittonia albivenis Argyroneura* y *Fittonia albivenis Verschaffeltii* sometidas a varias intensidades luz y contenido de agua en el suelo. Estas plantas son nativas de la selva sur americana. La variedad *Argyroneura* presenta hojas verdes oscuras con venas blancas y la variedad *Verschaffeltii* es caracterizada por sus hojas verdes con puntos y venas rosas/rojas (Figura 3.1). La *Fittonia* pertenece a la familia *Acanthaceae* (American Horticultural Society)⁸¹ y crece en lugares con sombra parcial y suelo húmedo.⁸² Además, en tiempos ancestrales fue usada por tribus indígenas sudamericanas como planta medicinal para dolores de cabeza y musculares.⁸³

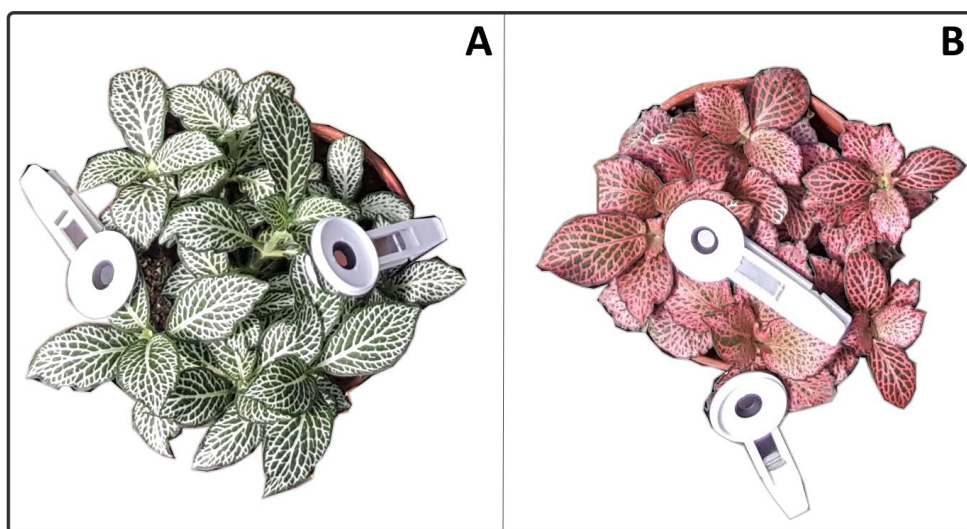


Figura 3.1 *Fittonia albivenis* A) Variedad *Argyroneura* B) Variedad *Verschaffeltii*

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Material Vegetal

Las plantas de *Fittonia albivenis* (Figura 3.1) crecieron en un invernadero en la ciudad de Buenos Aires en macetas de 10 cm de diámetro que contenían alrededor de 500 cm³ de tierra comercial. Las propiedades físico químicas del suelo fueron: pH: 6.3, humedad: 40%, materia orgánica: 20%, C/N: 7.7, conductividad eléctrica: 1.1 mS. cm⁻¹.

Todo el grupo de plantas creció bajo una temperatura promedio de $15 \pm 5^{\circ}\text{C}$ (Temperatura ambiente) y un ciclo de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad, siendo 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ el máximo flujo de fotones recibido. El flujo de fotones se midió con un sensor PAR.

Las plantas de cada variedad se separaron en dos grupos y se expusieron a diferentes regímenes de riego durante 15 días. El primer grupo se mantuvo con una irrigación a capacidad de campo (152 mL) mientras que el segundo grupo se regó inicialmente a capacidad de campo y posteriormente se mantuvo sin suministro de agua para que experimentara un estado de sequía. El contenido de agua en el suelo se determinó en función del tiempo a lo largo del período en el cual se suspendió el riego.

El ensayo se realizó en tres plantas de cada grupo y el análisis de la fluorescencia de clorofila se llevó a cabo sobre tres hojas de cada planta.

3.2.2 Concentración de pigmentos

El contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de *Fittonia albivenis* se determinó por extracción y espectrofotometría. Se pesaron exactamente alrededor de aproximadamente 0,4 g de hojas se maceraron con 5 mL de una solución 80% v/v acetona-agua y se llevó a volumen constante en un matraz de 50 mL. Esta suspensión se filtró por

gravedad y el residuo macerado se extrajo nuevamente con acetona al 80% hasta obtener la extracción total de los pigmentos fotosintéticos de la matriz. La solución obtenida se colocó en una celda de 10 mm y se registró la absorbancia en función de la longitud de onda usando un espectrofotómetro (Shimadzu UV 3101 PC). Con esta técnica se calcularon las concentraciones de clorofila-a (Chla), clorofila-b (Chlb), carotenoides (Car) y antocianinas (Anth) usando las siguientes ecuaciones⁸⁴:

$$Chla (umol * mL^{-1}) = 0.01373 * A_{663} - 0.000897 * A_{537} - 0.003046 * A_{647} \quad (3.1)$$

$$Chlb (umol * mL^{-1}) = 0.02405 A_{647} - 0.004305 * A_{537} - 0.005507 * A_{663} \quad (3.2)$$

$$Car (umol * mL^{-1}) = A_{470} - (17.1 * (Chla + Chlb) - 9.479 * (Anth))/119.26 \quad (3.3)$$

$$Anth(umol * mL^{-1}) = 0.08173 A_{537} - 0.00697 * A_{647} - 0.002228 * A_{663} \quad (3.4)$$

El contenido de pigmento se expresó en $\mu\text{mol/g}$ de hojas frescas.

3.2.3 Humedad de suelo

Se determinó el contenido de agua en suelo por el método de secado en horno. Se tomó aproximadamente 1 gramo de muestra exactamente pesada, se llevó a estufa a una temperatura de 100°C por 24 horas hasta obtener peso constante y posteriormente se calculó el porcentaje de humedad con la ecuación (3.5):

$$\% \text{ Humedad en suelo} = \frac{m-d}{m} \times 100 \quad (3.5)$$

Donde (m) es la masa de suelo antes del secado y (d) es la masa del suelo seco.

Los valores reportados son los promedios de tres determinaciones.

3.2.4 Parámetros fotosintéticos y fluorescencia (Cinética de Kautsky)

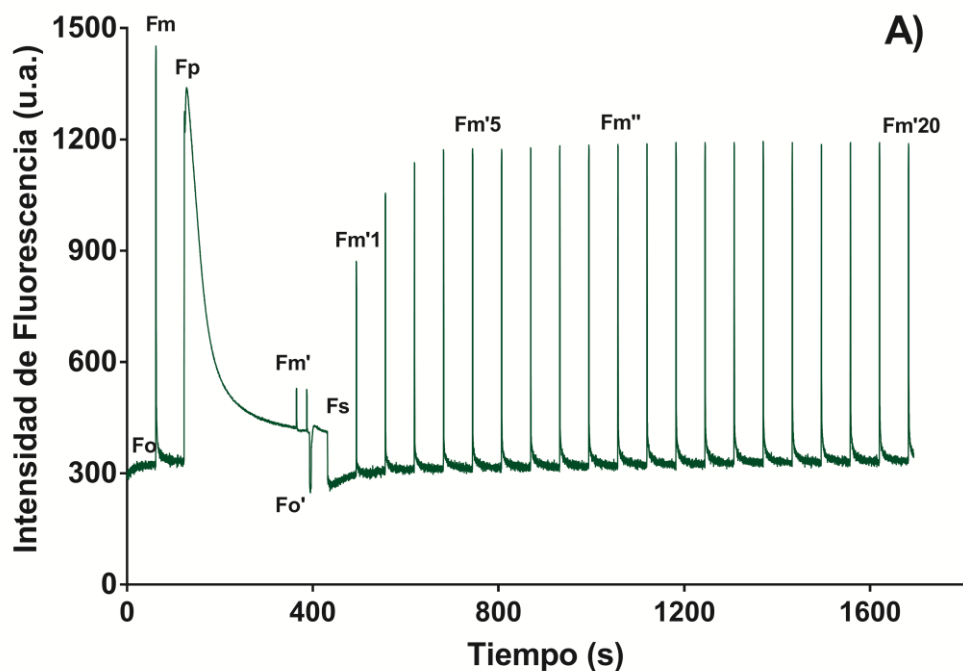
La fluorescencia variable de la clorofila-a (Cinética de Kautsky) se registró en la parte adaxial de las hojas de *Fittonia albivenis* a temperatura ambiente usando un fluorómetro de clorofila de pulso modulado (Hansatech FMS1). Previamente a las mediciones, las hojas se adaptaron a la oscuridad (18 minutos). Las muestras se irradiaron luego con luz modulada para determinar la fluorescencia inicial (F_0) de las hojas adaptadas a la oscuridad (Figura 3.2). Para este propósito, el instrumento tenía un haz de modulación ámbar de 594 nm que indujo una señal de fluorescencia de pulso en condiciones donde se excluía la luz ambiental.⁵⁶ El haz de modulación consistía en pulsos de corta duración (1,8 μ s) con largos períodos de apagado entre pulsos. La cantidad integrada de radiación incidente en la muestra resultó menor que 0.05 μ mol $m^{-2} s^{-1}$, evitando cambios fisiológicos significativos en la muestra durante las mediciones.

Cuando un pulso de luz saturante es aplicado, los aceptores de electrones en la cadena fotosintética se reducen rápidamente y quedan inhabilitados para recibir más electrones hasta que se transfieran al siguiente aceptor. En estas condiciones (con centros de reacción cerrados), la actividad fotosintética del PSII es interrumpida temporalmente y la eficiencia de fluorescencia incrementa hasta su valor máximo (F_m). La diferencia entre la fluorescencia máxima y la inicial con respecto al valor máximo (F_v/F_m) representa el máximo rendimiento cuántico de fotoquímica del PSII.^{49,85}

En nuestro experimento el pulso de luz saturante (luz halógena) tuvo una duración de 0.4 s con una intensidad de 4000 μ mol fotones $m^{-2}s^{-1}$ y mediante este pulso se determinó el valor de F_m . Cuando la fluorescencia decayó (quenching de fluorescencia) hasta su nivel basal, se encendió una luz actínica. Se utilizaron cuatro niveles de intensidad para la luz actínica 12 (Muy Bajo), 97 (Bajo), 302 (Medio), 1072 (Alto) μ mol fotones $m^{-2}s^{-1}$.

Durante la irradiación con luz actínica, la fluorescencia incrementa y posteriormente sufre un decaimiento (aproximadamente 5 min) hasta el estado basal correspondiente al de hojas "adaptadas a la luz" (F_s). La aplicación de un nuevo pulso de luz saturante nos conduce a un nivel F_m' que es menor que F_m . La fluorescencia variable $F_m' - F_o$ con respecto a F_m' representa el máximo rendimiento cuántico de fotosíntesis en hojas adaptadas a la luz, mientras que $F_m' - F_s$ con respecto a F_m' representa el rendimiento cuántico del PSII adaptado a la luz (Φ_{PSII}).

Después de alcanzar el máximo nivel de fluorescencia, éste decae por procesos de quenching fotoquímico y no fotoquímico. El quenching fotoquímico (qP) proviene de la activación de enzimas involucradas en el ciclo del carbono inducido por la luz y la apertura de las estomas. El quenching no fotoquímico (qNP) es debido al incremento en el rendimiento de la disipación de calor.⁸⁶



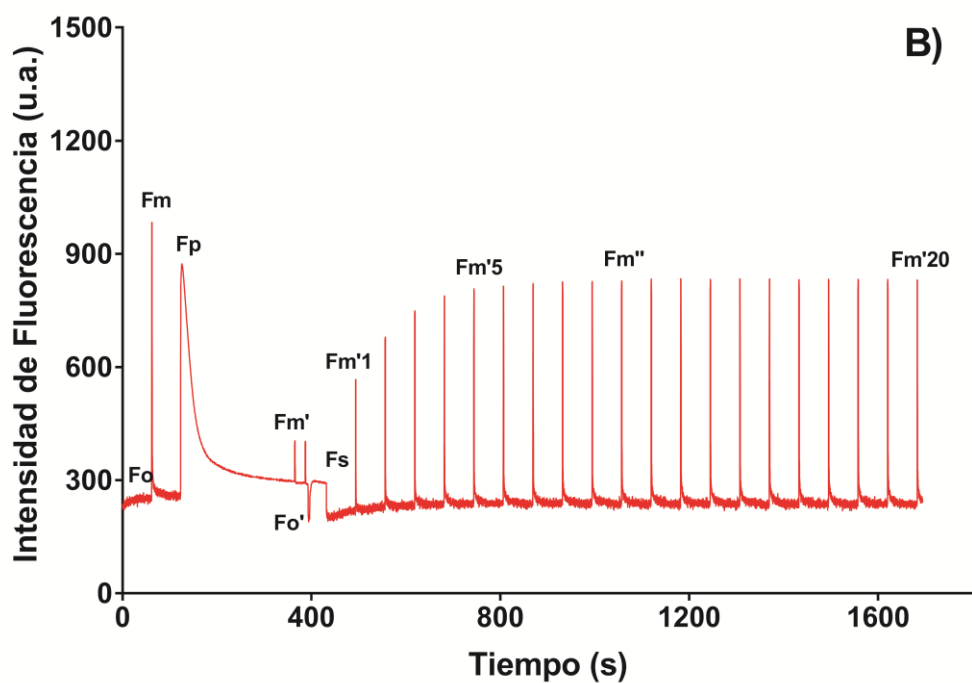


Figura 3.2 Fluorescencia de clorofila variable para hojas de *Fittonia albivenis* utilizando un fluorómetro de pulso modulado. A) Variedad *Argyroneura*. B) Variedad *Verschaffeltii*.

En la parte final de la cinética de Kautsky, se sombreó de forma transitoria la muestra y se aplicó un pulso de luz roja lejana para excitar preferentemente a PSI en relación con PSII. Después del periodo de inducción se monitoreó el proceso de recuperación de la señal de fluorescencia en la oscuridad por 20 minutos, aplicando 1 pulso de luz saturante cada minuto desde el apagado de la luz actínica (Figura 3.2).⁵⁶ Se registró un nivel máximo de fluorescencia (Fm'') a los 10 minutos después de apagar la luz actínica.

La partición de energía en el complejo del PSII se calculó teniendo en cuenta el rendimiento cuántico del PSII, el rendimiento cuántico del quenching no fotoquímico y el rendimiento cuántico del decaimiento fotofísico con las ecuaciones (3.6), (3.7) y (3.8):

$$\Phi_{PSII} = \frac{F_m' - F_s}{F_m'} \quad (3.6)$$

$$\Phi_{NPQ} = \frac{F_m - F_m'}{F_m} \times \frac{F_s}{F_m'} \quad (3.7)$$

$$\Phi_C = \frac{F_s}{F_m} \quad (3.8)$$

El rendimiento cuántico del quenching no fotoquímico se separó en sus componentes, que representan los diferentes procesos involucrados en el quenching no fotoquímico global. El valor para la componente rápida (Φ_{qE}) se calculó con la ecuación (3.9) y la suma de las componentes intermedia (Φ_{qT}) y lenta (Φ_{qI}) a partir de la ecuación (3.10):



$$\Phi_{qE} = \frac{F_m'' - F_m'}{F_m''} \times \frac{F_s}{F_m'} \quad (3.9)$$

$$\Phi_{qT} + \Phi_{qI} = \frac{F_m - F_m''}{F_m} \times \frac{F_s}{F_m''} \quad (3.10)$$

3.3 Resultados y Discusión

Los valores del contenido de pigmentos en las plantas control de *Fittonia albivenis* (*Argyroneura* var y *Verschaffeltii* var) se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Composición de pigmentos fotosintéticos presentes en hojas de *Fittonia albivenis* (Variedad *Argyroneura* y Variedad *Verschaffeltii*). Clorofila-a = Chla, Clorofila-b = Chlb, Carotenoides = Car, Antocianinas = Anth. Los resultados informados resultan del promedio de tres mediciones.

Especie	Chla ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	Chlb ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	Car ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	Anth ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
 <i>Fittonia albivenis</i> (Variedad <i>Argryroneura</i>)	1.286 \pm 0.006	0.56 \pm 0.03	0.499 \pm 0.006	0.071 \pm 0.002
 <i>Fittonia albivenis</i> (Variedad <i>Verschaffeltii</i>)	0.982 \pm 0.001	0.48 \pm 0.02	0.485 \pm 0.005	0.458 \pm 0.003

La diferencia más evidente entre las dos variedades es el alto contenido de antocianinas presente en la variedad *Verschaffeltii* (6.45 veces la concentración presente en variedad *Argryroneura*). El contenido total de clorofila es 26% mayor en la variedad *Argryroneura* y similar a los valores informados para hojas verdes en literatura.⁸⁴ La relación de clorofila a/ clorofila b es ligeramente mayor para la variedad *Argryroneura* (2.3 ± 0.1) que para la variedad *Verschaffeltii* (2.0 ± 0.1). El contenido de carotenoides muestra la misma tendencia con valores menores para la variedad rica en antocianinas.

Se sabe de bibliografía que las altas intensidades de luz inducen la reducción del tamaño de la antena a través de la proteólisis de proteínas del complejo colector de luz (conocido como LHC)⁸⁷, La clorofila b se asocia típicamente a estas proteínas y, por lo tanto, la proporción de clorofila a/b generalmente aumenta cuando la planta crece en condiciones de irradiación de alta intensidad.⁸⁸ Una menor relación de clorofila a/b para la variedad *Verschaffeltii* puede por lo tanto atribuirse a un efecto de filtrado de la luz debida a la absorción por parte de las antocianinas y un consecuente aumento en el tamaño de la antena para esta variedad si es comparada con la variedad *Argryroneura* cuyos cloroplastos no sufren atenuación de la luz recibida.

Con respecto a la fluorescencia de la clorofila-a, se registraron valores más altos para la fluorescencia inicial (F_0) y para fluorescencia máxima (F_m) en la variedad *Argryroneura* que en la variedad *Verschaffeltii*, lo cual es consistente con el mayor contenido de clorofila en la primera. Sin embargo, como era de esperarse para las plantas sanas, la relación F_v/F_m no presentó diferencias significativas entre ellas.

La partición de energía entre fotosíntesis (Φ_{PSII}), quenching no fotoquímico (Φ_{NPQ}) y decaimiento fotofísico (Φ_C) se muestran en la Figura 3.3 para las dos variedades.

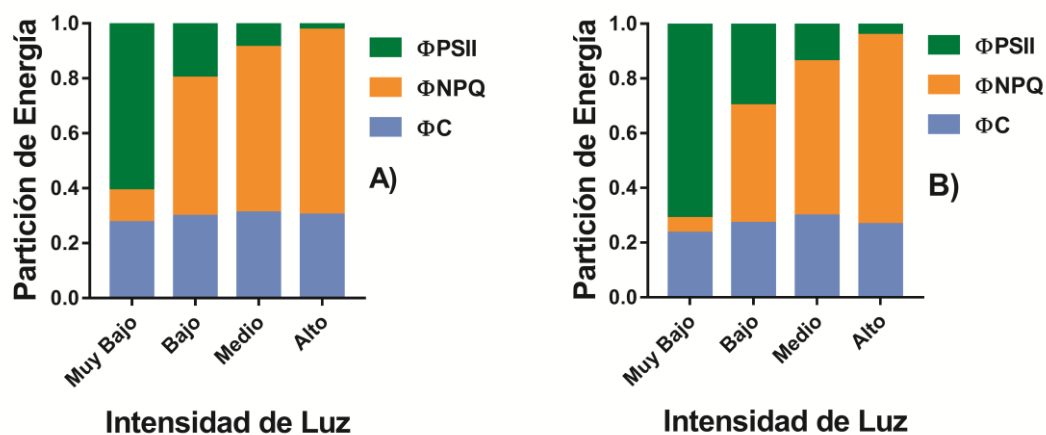


Figura 3.3 Partición de energía para *Fittonia albivenis* (variedad *Argryroneura*) (A) y *Fittonia albivenis* (Variedad *Verschaffeltii*) (B) a diferentes intensidades de luz actínica.

En ambas variedades, a medida que aumenta la intensidad de la luz actínica, se observó una disminución del rendimiento cuántico del PSII (Φ_{PSII}) y un incremento del rendimiento cuántico del quenching no fotoquímico (Φ_{NPQ}). El rendimiento cuántico de decaimiento fotofísico, por su parte, permaneció prácticamente constante. En estos parámetros se encontraron diferencias significativas para los valores de Φ_{PSII} y Φ_{NPQ} a través de las diferentes condiciones lumínicas, mientras que el parámetro Φ_C no presentó ninguna diferencia de significancia. De esta manera, cuando la intensidad de luz actínica es mayor, la fracción de radiación absorbida destinada a la fotosíntesis se vuelve relativamente más pequeña. Esta reducción se produce a expensas de una mayor disipación de calor que actúa como una estrategia protectora contra el exceso de luz y reduce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por tanto, es la disipación de calor y no el proceso de decaimiento fotofísico (C) el proceso dominante en la regulación de la cantidad de energía drenada para el fotosistema II en ambas variedades.

Los rendimientos cuánticos del decaimiento fotofísico Φ_C , registrados para cada valor de intensidad de luz actínica presentaron resultados similares entre las dos variedades de *Fittonia albivenis* (un poco mayor para la variedad *Argyroneura*). Los rendimientos cuánticos de fotosíntesis (Φ_{PSII}) y el de quenching no fotoquímico (Φ_{NPQ}) no presentan diferencias significativas en las intensidades de luz media y alta, pero, a intensidades de luz baja y muy baja el Φ_{PSII} es significativamente menor y el Φ_{NPQ} significativamente mayor en la variedad *Argyroneura*. Este resultado es consistente con la hipótesis razonable de que una hoja que contiene antocianinas no requiere un mecanismo de disipación de calor tan eficiente como una hoja verde, ya que la primera tiene naturalmente otra maquinaria de protección contra la luz intensa y la producción de ROS. De hecho, el efecto de filtro interno (debido a la absorción de luz por las antocianinas entre 500 y 600 nm) y las propiedades de destrucción de especies reactivas de oxígeno son responsables de este mecanismo de protección. De esta forma, la presencia de antocianinas contribuye positivamente como un mecanismo complementario al proceso del quenching no fotoquímico.⁸⁹

En nuestros experimentos, cuando incrementamos las condiciones de intensidad de luz de muy baja a baja, los valores del Φ_{PSII} se redujeron un 68% para la variedad de hojas verdes y un 58% para la variedad de hojas rojas. La misma tendencia se encontró cuando se cambió de una intensidad lumínica muy baja a alta intensidad (96% y 94% respectivamente).

Los diferentes componentes para el rendimiento cuántico del NPQ se muestran en la figura 3.4.

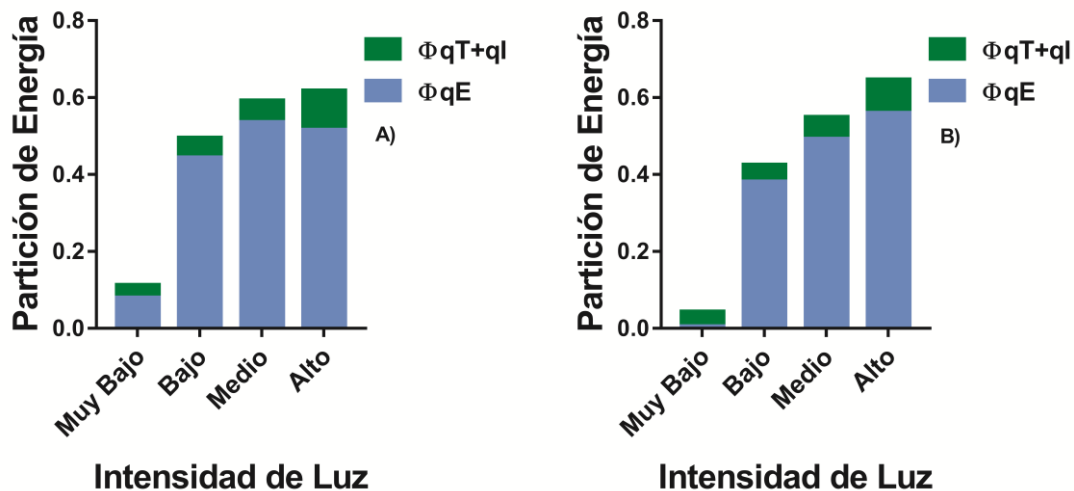


Figura 3.4 Rendimiento cuántico de los componentes del quenching no fotoquímico: Φ_{qE} (quenching dependiente de la energía), Φ_{qT} (quenching del estado de transición) y Φ_{qI} (quenching relacionado con la fotoinhibición) para *Fittonia albivenis* (Variedad *Argyroneura*) (A) y *Fittonia albivenis* (variedad *Verschaffeltii*) (B) a diferentes intensidades de luz actínica.

Como surge claramente de la Figura 3.4, el quenching dependiente de la energía (Φ_{qE}) resultó la principal contribución al NPQ total.

Para la variedad *Argyroneura*, el Φ_{qE} se incrementa con el aumento de la luz intensidad de la luz actínica, Se encontraron diferencias significativas entre la baja irradiación y los otros regímenes de iluminación a los que se expuso. Análogamente, $\Phi_{qT} + \Phi_{qI}$ aumentó con la intensidad de la luz.

En la variedad *Verschaffeltii*, el Φ_{qE} incrementó con la luz actínica en forma análoga a la variedad anterior. Los valores de $\Phi_{qT} + \Phi_{qI}$ en ambas variedades también aumentaron con la luz actínica pero en este caso solo se apreciaron diferencias significativas entre las intensidades de luz muy baja y alta.

Cuando se comparan los valores de las componentes del quenching no fotoquímico a la misma intensidad lumínica entre las dos especies se observa que el Φ_{qE} es mayor para la variedad *Argyroneura*. Estas diferencias son significativas sólo para las intensidades de irradiación muy baja, baja y media. Por otro lado, la suma de $\Phi_{qT} + \Phi_{qI}$ no presenta diferencias importantes entre las dos variedades.

Para analizar la componente rápida del NPQ hay que tener en cuenta que su activación se basa en diferentes procesos como: el ciclo de las xantofilas, el gradiente de pH y la protonación de algunas proteínas del LHC.⁹⁰⁻⁹³ Por otro lado, ya se ha informado en literatura que altos contenidos de antocianinas en planta jóvenes están correlacionados con bajos pools del ciclo de la xantofilas.⁹⁴ La relación entre contenido de antocianinas y el ciclo de las xantofilas se estudió también en cáscara de manzanas y como resultado se encontró que esta relación depende de las condiciones lumínicas.

En nuestros experimentos, el nivel bajo de Φ_{qE} y el menor contenido de carotenoides apunta hacia una reserva de ciclo de las xantofilas más limitada en la planta rica en antocianinas, lo cual es consistente con los trabajos previamente reportados.

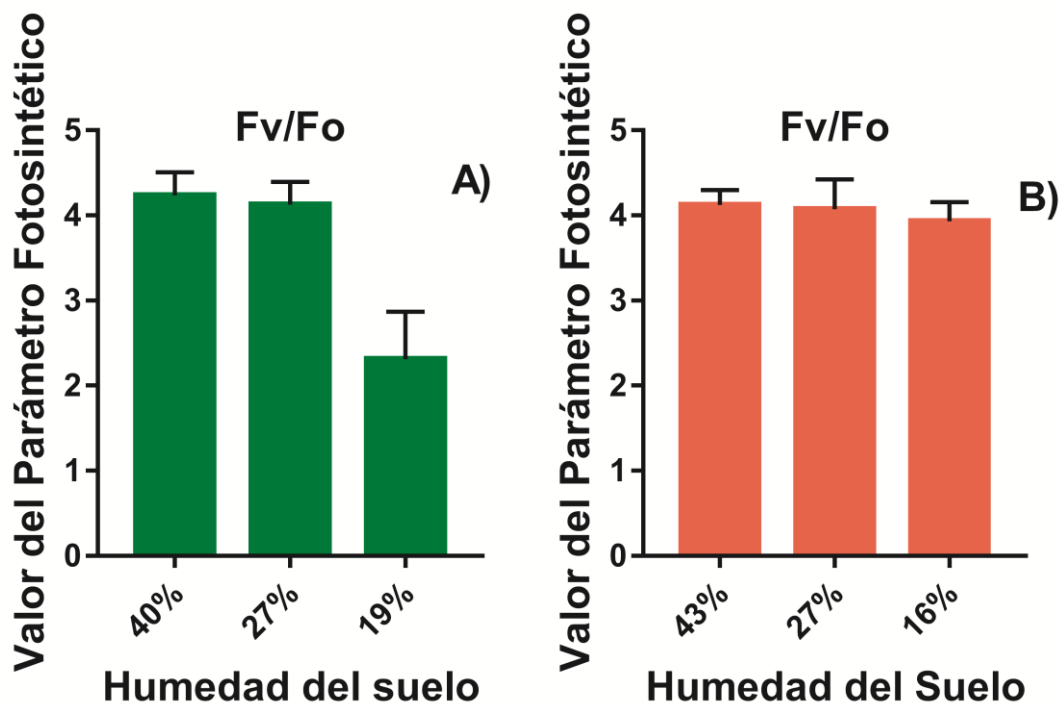


Figura 3.5 Rendimiento fotosintético evaluado a través de la relación Fv/Fo para *Fittonia albivenis* (Variedad *Argyroneura*) (A) y *Fittonia albivenis* (Variedad *Verschaffeltii*) (B), bajo estrés hídrico. Las medidas se realizaron con una luz actínica de intensidad baja. ($97 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Finalmente, cuando las dos variedades se sometieron a estrés hídrico, se observó que el parámetro fotosintético más sensible ante la disminución en la disponibilidad de agua es la relación Fv/Fo. Si se comparan los resultados entre las plantas, la capacidad fotosintética de la variedad *Argyroneura* se vio más afectada mientras que la variedad *Verschaffeltii* se mantuvo notablemente más saludable (ver Figura 3.5).

3.4 Conclusiones del Capítulo 3

La *Fittonia albivenis* variedad *Verschaffeltii*, es más rica en antocianinas, presenta una relación de Chla/Chlb menor, una concentración más baja de carotenoides, una disipación de calor (NPQ) más reducida y un valor más bajo para la componente dependiente de la energía del rendimiento cuántico del NPQ comparada con la *Fittonia albivenis* variedad *Argyroneura*.

Los resultados apuntan a una menor reserva de ciclo de las xantofilas en la variedad roja.

En lo que respecta a la distribución de la energía absorbida, la planta roja asigna una mayor fracción de fotones a la fotosíntesis que la planta verde, ya que la primera no necesita disipar tanto calor para protegerse de la radiación lumínica.

La fracción de energía disipada por procesos fotofísicos (Φ_C) se mantuvo prácticamente igual en ambas plantas y la resistencia efectiva al estrés por sequía fue más acentuada para la planta con mayor concentración de antocianinas.

Capítulo 4

Análisis de fluorescencia de la clorofila-a para plantas con diferentes metabolismos de fijación de CO₂

4.1 Introducción

Las plantas utilizan el CO₂ para producir azúcares en su organismo. La enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa / oxigenasa (Rubisco) está involucrada en el proceso de fijación de CO₂ que tiene lugar durante el ciclo de Calvin en la fase oscura de la fotosíntesis. Esta enzima, además de fijar CO₂, es capaz de unirse al O₂ (actividad tipo oxigenasa). Cuando actúa como oxigenasa no hay fijación de carbono y el proceso se denomina fotorrespiración. La fotorrespiración consume energía, disminuye el rendimiento de fotosíntesis y hace que el proceso de fijación de carbono sea ineficiente. La fotorrespiración está favorecida a bajas concentraciones de CO₂ y altas concentraciones de O₂.

Las plantas presentan tres rutas fotosintéticas para fijar el carbono en su interior. La más común es la ruta C₃ (aproximadamente 85% de las plantas), también llamada ciclo de Calvin-Benson donde la carboxilación inicial resulta en ácido fosfoglicérico, un ácido de tres carbonos. La ruta C₄ o ciclo de Hatch-Slack (aproximadamente 3% de las plantas), es más evolucionada, ya que la carboxilación inicial resulta en un oxalato (un ácido de cuatro carbonos). La última ruta fotosintética es el metabolismo ácido de las crasuláceas

(CAM) (aproximadamente 12% de las plantas), que es bioquímicamente similar al mecanismo C_4 en la carboxilación inicial de un oxalato, pero se diferencia en los componentes estructurales y en la actividad temporal de la carboxilación inicial.^{95,96}

La fijación de O_2 se ve acrecentada en plantas C_3 , generalmente habituadas a los climas templados de su hábitat natural, cuando son sometidas a ambiente cálido y seco. De hecho, alta temperatura y falta de humedad conducen al cierre de las estomas para evitar la pérdida de agua, provocando que el CO_2 no pueda entrar y el O_2 no pueda salir. Como consecuencia, en estos casos, la relación O_2/CO_2 aumenta haciendo que la Rubisco tenga más probabilidades de fijar O_2 que CO_2 .^{97,98}

Algunas plantas han evolucionado para disminuir el proceso de fotorrespiración tornando más eficiente la forma en que fijan el CO_2 . Las rutas C_4 y CAM son adaptaciones evolutivas que las plantas de climas áridos y secos han desarrollado para reducir al mínimo la fotorrespiración, logrando que la concentración de CO_2 siempre sea alta en su interior y desfavoreciendo así la fijación de O_2 .⁹⁹

La captación de CO_2 en organismos C_3 está catalizada por la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/ oxigenasa (Rubisco), que produce el sustrato ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) utilizado para fijar el CO_2 atmosférico y así producir dos moléculas de fosfoglicerato (PGA). El PGA es una molécula de 3 carbonos, que es reducida por el ciclo fotosintético de reducción de carbono (del inglés *Photosynthetic Carbon Reduction*, PCR) en azúcares, los cuales la planta utiliza posteriormente en su metabolismo. La enzima Rubisco también cataliza la oxigenación de la RuBP, donde combina O_2 con RuBP para producir PGA y fosfoglicolato.^{97,98,100} Cuando la planta metaboliza fosfoglicolato da como resultado una expulsión de CO_2 , dando lugar a la fotorrespiración que está controlada por la temperatura. Este proceso está esquematizado en la Figura 4.1:

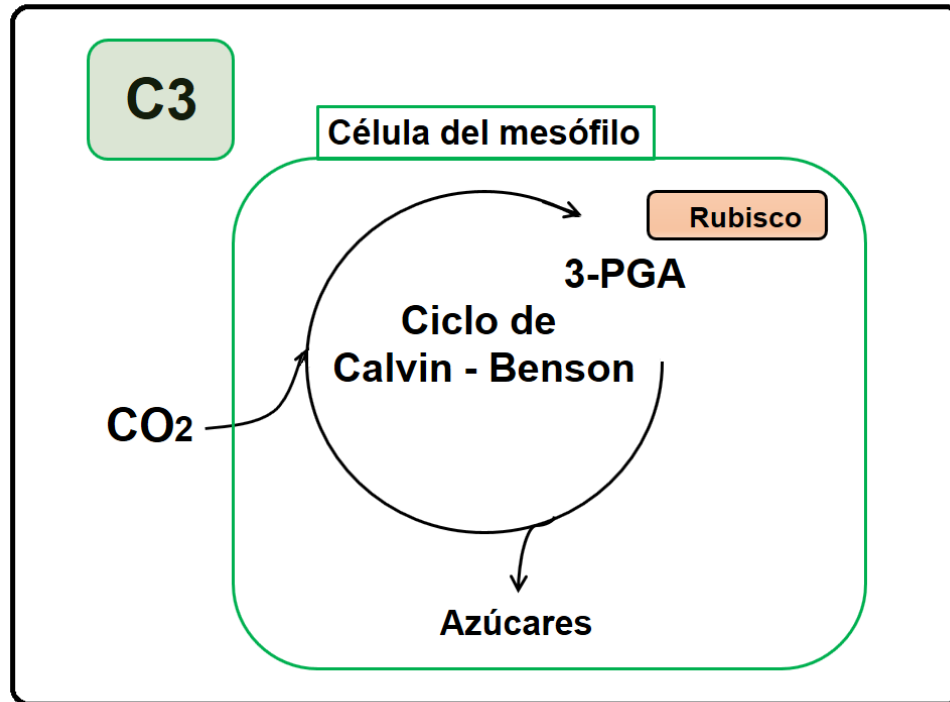


Figura 4.1 Ruta fotosintética de fijación de carbono en plantas C₃ (ciclo de Calvin-Benson).

En plantas C₄ existe un cambio simple para evitar la reducción de la eficiencia fotosintética asociada con la fotorrespiración, en lugar de permitir que se produzca el ciclo de Calvin-Benson (C₃) en todas las células fotosintéticas, el ciclo C₃ sólo se limita a las células internas seleccionadas, normalmente las células del haz vascular (BSC).⁹⁹ Estas células están rodeadas por una capa de células del mesófilo de forma tal que las reacciones dependientes de la luz y el ciclo de Calvin-Benson quedan separadas físicamente. Además, en estas células se encuentra la enzima fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa, encargada de catalizar la reacción fotosintética inicial. Esta reacción utiliza fosfoenolpiruvato y CO₂ atmosférico como sustrato para producir oxalacetato, un ácido de cuatro carbonos (de ahí su nombre fotosíntesis C₄) que es convertido en malato y se difunde desde el mesófilo hasta las células del haz vascular, donde el malato es descarboxilado y libera una molécula de CO₂ que es fijada por la enzima Rubisco en el ciclo de Calvin. La PEP carboxilasa tiene una mayor velocidad y afinidad por su sustrato que la Rubisco lo que hace que la

concentración de CO_2 en las células del haz vascular sea significativamente mayor que en las células del mesófilo o la atmósfera circundante ya que la PEP carboxilasa actúa como una bomba concentradora de CO_2 en las células del haz vascular. Como consecuencia, la reacción de la enzima Rubisco en plantas C_4 tiene lugar en una atmósfera con una alta relación CO_2/O_2 y como resultado la fotorrespiración es prácticamente eliminada. (Ver Figura 4.2)^{101,102}

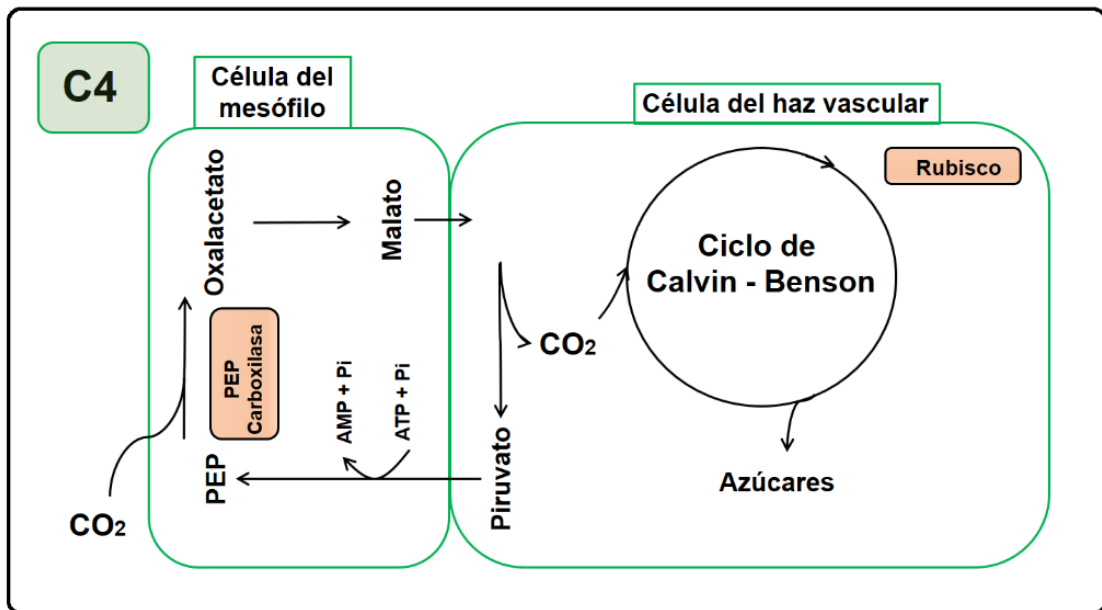


Figura 4.2 Ruta fotosintética de fijación de carbono en plantas C_4 (ciclo de Hatch-Slack).

La fotosíntesis CAM involucra el mismo mecanismo de concentración de CO_2 que la fotosíntesis C_4 (PEP carboxilasa). Sin embargo, en vez de una separación espacial de las dos enzimas encargadas de la carboxilación como en el ciclo C_4 , existe una separación temporal de las dos carboxilasas en el ciclo CAM y ambas reacciones ocurren dentro de la misma célula. En contraste con las plantas C_3 y C_4 , en las plantas CAM ocurre una apertura de las estomas durante la noche y el CO_2 atmosférico es fijado como malato y almacenado dentro de la vacuola de la célula fotosintética. Durante el día, las estomas permanecen cerrados y el malato es descarboxilado para expulsar CO_2 . Esto provoca que

la concentración de CO₂ dentro de la célula permanezca alta y como las estomas están cerrados no puede salir.^{98,103} Como resultado, la enzima Rubisco opera en un ambiente donde posee una alta relación CO₂/O₂ y la fotorrespiración es suprimida. De esta manera es como las plantas CAM separan temporalmente la actividad de la enzima Rubisco durante el día y la PEP carboxilasa durante la noche. (Ver Figura 4.3)

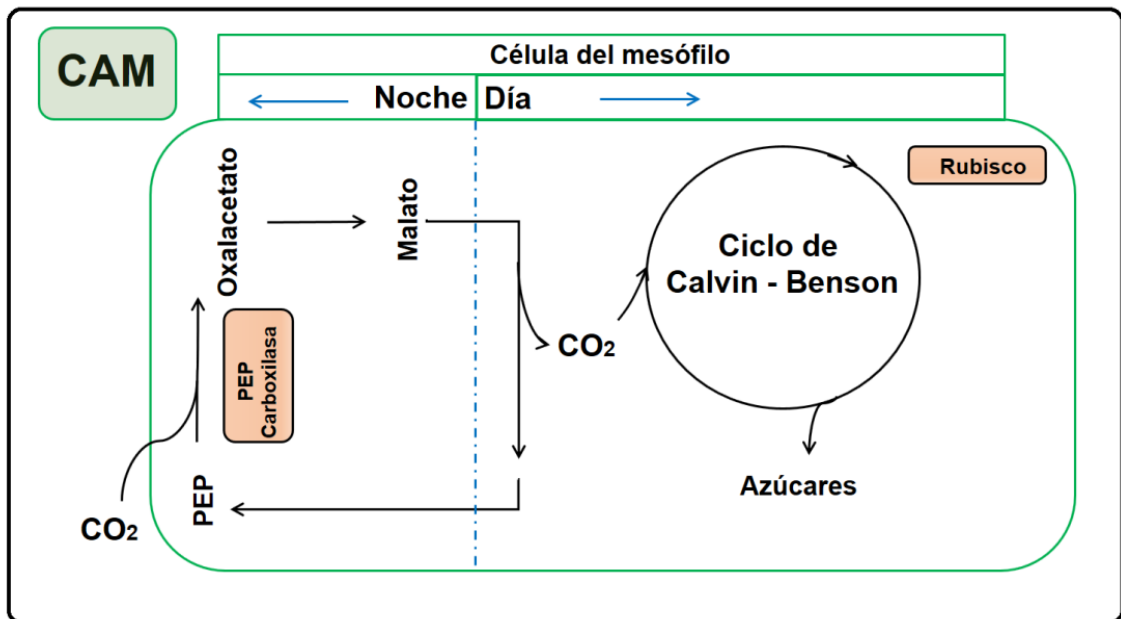


Figura 4.3 Ruta fotosintética de fijación de carbono en plantas CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas).

En este capítulo nuestra hipótesis inicial es que plantas con diferentes rutas de fijación de carbono van a presentar diferencias en la distribución de la energía absorbida y por lo tanto en la emisión de fluorescencia de la clorofila-a y en los parámetros fotosintéticos obtenidos a través de ésta. Dentro de este marco estudiamos comparativamente la fluorescencia de la clorofila-a en distintas especies de plantas que difieren en el mecanismo fotosintético de fijación de carbono (C₃, C₄ y CAM). Para esto se realizaron tres tipos de ensayos individuales donde se estudió: I) la partición de energía

a distintas intensidades de luz para tres variedades de plantas con distinto mecanismo de fijación de carbono, II) la variabilidad de los parámetros espectroscópicos y fotosintéticos provenientes del análisis de la cinética de Kautsky para las plantas estudiadas en I) sometidas a estrés hídrico y III) un análisis de componentes principales (PCA) sobre los parámetros fotosintéticos obtenidos de la porción rápida de la cinética de Kautsky (curva OJIP) para cuarenta y tres variedades de plantas con distinto mecanismo de fijación de carbono.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Experimentos I y II. Análisis de partición de energía y efecto del estrés hídrico en plantas C₃, C₄ y CAM

4.2.1.1 Material Vegetal

Las plantas utilizadas en los experimentos I y II se muestran en la Figura 4.4.

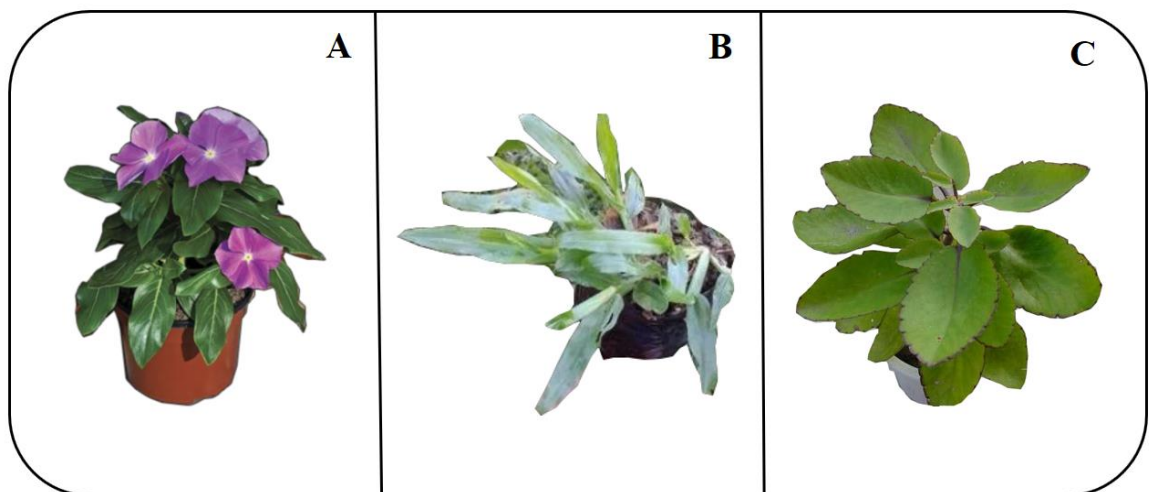


Figura. 4.4 *Vinca minor* (C₃), *Axonopus compressus* (C₄) y *Kalanchoe pinnata* (CAM).

Las plantas de *Vinca minor* (C₃), *Axonopus compressus* (C₄) y *Kalanchoe pinnata* (CAM) crecieron en un invernadero en la ciudad de Buenos Aires en macetas de 10 cm de diámetro y 500 cm³ de tierra comercial. Las propiedades físico químicas del suelo fueron: pH: 6.3, humedad: 40%, materia orgánica: 20%, C/N: 7.7, conductividad eléctrica: 1.1 mS. cm⁻¹.

Todo el grupo de plantas creció bajo una temperatura promedio de 20 ± 5°C (Temperatura ambiente) y un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, siendo 200 μmol.m⁻². s⁻¹ el máximo flujo de fotones recibido.

Las plantas de cada especie inicialmente fueron regadas a capacidad de campo* (aproximadamente 152 mL) cada día durante una semana y después se suspendió el suministro de agua para que experimentara un estado de sequía. Durante el lapso de tiempo durante el cual no se regaron las plantas (aproximadamente 1 semana para *Vinca minor*, 2 para *Axonopus compressus* y 3 para *Kalanchoe pinnata*,) se monitoreó el contenido de agua en el suelo y se determinaron los parámetros fotosintéticos de cada especie.

El ensayo se realizó en tres plantas de cada especie y el análisis de la fluorescencia de clorofila se ejecutó sobre tres hojas de cada planta.

4.2.1.2 Humedad de suelo

Se determinó el contenido de agua en suelo por el método de secado en estufa siguiendo el mismo procedimiento que el detallado en el Capítulo 3, en la sección 3.2.3

4.2.1.3 Espectros de emisión de fluorescencia de la clorofila no variable

Para la parte adaxial de hojas de plantas de *Vinca minor* (C₃), *Axonopus compressus* (C₄) y *Kalanchoe pinnata* (CAM) se registraron los espectros de emisión de fluorescencia (F_o en función de la longitud de onda) a temperatura ambiente con un fluorómetro Quanta Master Photon Technology International PTI (Brunswick, USA). Se excitaron las muestras a una longitud de onda de 460 nm, con un flujo irradiante de fotones

incapaz de inducir los procesos fotosintéticos (flujo de fotones $< 20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Tanto la ranura de excitación como la de emisión se fijaron en 2 nm. Bajo estas condiciones, todos los aceptores de electrones en los centros de fotosíntesis se encontraban abiertos y la fluorescencia registrada se corresponde a la emisión de fluorescencia basal.

Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron para longitudes de onda que comprendidas entre 600 y 800 nm utilizando un espectrofotómetro de estado estacionario en geometría de cara frontal. La longitud de onda de excitación se ajustó en 460 nm, ya que en estas condiciones la emisión de fluorescencia de la clorofila a es más intensa.

Para obtener los espectros de emisión, las hojas se adaptaron previamente a la oscuridad por 20 min. Después de obtenerse los espectros, estos se corrigieron debido a la presencia de procesos de reabsorción de luz.¹¹ Las correcciones se realizaron siguiendo la ecuación 4.2, donde se multiplican los espectros experimentales por una función (ecuación 4.3) dependiente de la reflectancia y transmitancia de la muestra (Ver Capítulo. 1 sección 1.2.1.1.3).

$$I_f^c(\lambda) = I_f^e(\lambda)f \quad (4.2)$$

$$f = \frac{\ln^{-1}/(r_{\lambda_0} + t_{\lambda_0}) + \ln^{-1}/(r_{\lambda} + t_{\lambda})}{\ln^{-1}/(r_{\lambda_0} + t_{\lambda_0})} \cdot \frac{1 - r_{\lambda_0} - t_{\lambda_0}}{1 - (r_{\lambda_0} + t_{\lambda_0})(r_{\lambda} + t_{\lambda})} \quad (4.3)$$

Con los espectros de emisión corregidos por reabsorción se calcularon las relaciones $F_{\text{red}}/F_{\text{far-red}}$ como el cociente entre la intensidad de emisión de la banda a 683 nm y la banda a 730 nm.

4.2.1.4 Espectros de reflectancia y transmitancia

Los espectros de reflectancia y transmitancia se obtuvieron en un espectrofotómetro UV3101PC Shimadzu (Tokio, Japón) equipado con una esfera integradora ISR-3100 Shimadzu (Tokio, Japón). Como blanco de referencia estándar se utilizó Sulfato de Bario para ajustar el 100% del nivel de reflectancia. La reflectancia difusa (R_λ) se registró en función de la longitud de onda de 400 a 800 nm para las hojas de las diferentes especies de plantas. Adicionalmente, se midió la transmitancia difusa (T_λ) a las mismas longitudes de onda. Todas las mediciones se realizaron en condiciones de temperatura ambiente.

4.2.1.5 Fluorescencia variable de la clorofila-a. Adquisición rápida de datos OJIP

Se utilizó un equipo de adquisición rápida de datos Handy-PEA Plant Efficiency Analyser Hansatech Ltd (King's Lynn, Norfolk, UK), el cual mide durante 1s la cinética rápida y polifásica de la fluorescencia de la clorofila-a (Ver Capítulo.1 sección 1.2.2.1). Las hojas de plantas C₃, C₄ y CAM se irradiaron con una luz de 3000 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad, lo que asegura que el máximo de la banda P sea el máximo de fluorescencia de la clorofila ($F_p=F_m$). Además, se evaluaron las intensidades de fluorescencia a 20 μs ($F_{20\mu\text{s}}$), 300 μs ($F_{300\mu\text{s}}$) y 2 ms ($F_{2\text{ms}}$) correspondientes a los diferentes puntos de inflexión de la curva OJIP¹⁰⁴.

4.2.1.6 Parámetros fotosintéticos y fluorescencia (Cinética de Kautsky)

La fluorescencia variable de la clorofila-a (cinética de Kautsky) se registró mediante un fluorómetro de pulso modulado Hansatech FMS1, de igual manera y con las mismas intensidades de radiación que en el capítulo 3 (Sección 3.2.4), para la determinación de la partición de energía a diferentes intensidades de radiación y para las cinéticas de los ensayos de estrés hídrico en plantas C₃, C₄ y CAM.

4.2.2 Experimento III. Clasificación de especies C₃, C₄ y CAM según los parámetros fotosintéticos obtenidos de la adquisición rápida de datos. Fluorescencia variable de la clorofila-a.

4.2.2.1 Material vegetal

Este estudio se llevó a cabo directamente en el vivero de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, donde se analizaron 43 variedades de plantas (Ver Tabla 4.1) con diferentes mecanismos fotosintéticos de fijación de carbono.

Tabla 4.1 Lista de especies C₃ (Color verde), C₄ (Color rojo) y CAM (Color negro) analizadas mediante la adquisición rápida de datos OJIP.

Nombre científico	
<i>Agapanthus africanus</i>	<i>Hypoestes sanguinolenta red</i>
<i>Agave Potatorum</i>	<i>Hypoestes sanguinolenta white</i>
<i>Allamanda cathartica L</i>	<i>Iresine herbstii</i>
<i>Amaranthus quitensis</i>	<i>Kalanchoe pinnata</i>
<i>Axonopus compressus</i>	<i>Musa paradisiaca</i>
<i>Beta vulgaris</i>	<i>Nephrolepis cordifolia</i>
<i>Citrus limon "Genova"</i>	<i>Opuntia jamaicensis</i>
<i>Citrus reticulata "Montenegrina"</i>	<i>Pennisetum setaceum rubrum</i>
<i>Citrus sinensis "Salustiana"</i>	<i>Peperomia caperata</i>
<i>Drácena marginata</i>	<i>Petunia hybrida</i>
<i>Dryopteris filix-mas</i>	<i>Phormium tenax "Purpureum"</i>
<i>Echeveria Perle von Nürnberg</i>	<i>Phormium tenax "Variegata"</i>
<i>Echeveria pulidonis</i>	<i>Platyserium andinum</i>
<i>Echeveria Runyonii</i>	<i>Polypodium formosanum</i>

<i>Ficus Benjamina</i>	<i>Senecium Kaempferis</i>
<i>Fittonia albivenis Argyroneura</i>	<i>Solenostemon blumei</i>
<i>Fittonia albivenis Verschaffeltti</i>	<i>Strelitzia nicolai</i>
<i>Hosta sieboldii</i>	<i>Strelitzia reginae</i>
<i>Hydrangea macrophylla</i>	<i>Tibouchina grandiflora</i>
<i>Hydrangea quercifolia</i>	<i>Tradescantia pallida</i>
<i>Hylotelephium spectabile</i>	<i>Vinca minor</i>
<i>Hypoestes phyllostachya</i>	

El análisis de adquisición rápida de datos se aplicó a 6 plantas de cada variedad y se registró 1 hoja de cada planta. Los parámetros fotosintéticos obtenidos se procesaron con un análisis de componentes principales (del inglés *Principal Component Analysis*, PCA).

Todo el grupo de plantas creció bajo una temperatura promedio de $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ (Temperatura ambiente) y un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, siendo $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ el máximo flujo de fotones recibido estimado.

La medición de los datos se realizó mediante el equipo Handy-PEA Plant Efficiency Analyser Hansatech Ltd (King's Lynn, Norfolk, UK), de igual manera que en el análisis de partición de energía y estrés hídrico en plantas C_3 , C_4 y CAM (Sección 4.2.1.5). Se analizaron los parámetros fotosintéticos mostrados en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Parámetros obtenidos del test OJIP de fluorescencia de la clorofila-a, emitida por hojas previamente adaptadas a la oscuridad.⁴⁷ (Ver Capítulo 1 Sección 1.2.2.1 Figura 1.5 y Tabla 1.1 para más información) Dónde: RC (Centro de reacción), RE (Reducción de electrones), Fv (Fluorescencia variable), Fm (máxima intensidad de fluorescencia en hojas previamente adaptadas a la oscuridad), ET (Transporte Electrónico), ABS (flujo de luz absorbida), TR (Flujo de energía atrapada).

Parámetro	Descripción
RE₀/RC	Reducción del flujo de electrones y aceptores de electrones en el lado aceptor del PSI por RC
Φ(R₀)	Rendimiento cuántico para el último aceptor de electrones reducido en el lado aceptor del PSI (RE)
PI abs	Índice de rendimiento (potencial) para la conservación de la energía de los fotones absorbidos por el PSII para la reducción de los aceptores de electrones del intersistema
ψ(E₀)	Eficiencia / probabilidad que un electrón se mueva más allá Q _A ⁻
ET₀/RC	Flujo de transporte electrónico (más allá de Q _A ⁻) por RC
PI total	Índice de rendimiento (potencial) para la conservación de energía de los fotones absorbidos por el PSII para la reducción de los aceptores finales del PSI
Fv/Fm	Máximo rendimiento cuántico de fotoquímica del PSII (en un estado previamente adaptado a la oscuridad)
TR₀/RC	Flujo de energía atrapada (conducido a la reducción Q _A) por CR
V_J	Fluorescencia variable relativa en el paso J
ABS/RC	Flujo de absorción (de la Chl de la antena) por CR (una medida del tamaño de la antena del PSII)
DI₀/RC	Flujo de energía disipada por RC (a t = 0)
δ(R₀)	Eficiencia / probabilidad con la cual un electrón del intersistema transportador de electrones es transferido al último aceptor de electrones reducido en el lado aceptor en el PSI (RE)

4.2.2.2 Análisis estadístico

Los efectos sobre los parámetros fotosintéticos de la fluorescencia de la clorofila-a de las especies sometidas a estrés hídrico en hojas fueron calculados usando one-way ANOVA, con un índice de diferencias significativas de $p < 0,05$, usando InfoStat versión 2018. Además, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con una matriz de correlación para detectar las variables menos correlacionadas en los valores experimentales.

Los parámetros obtenidos del test OJIP no son totalmente independientes entre sí, ya que son calculados en base a los puntos de una curva experimental de fluorescencia de clorofila-a y algunos de los parámetros están relacionados por expresiones matemáticas. Para reducir el ruido que pueden agregar los parámetros que están aportando la misma información se realizó una matriz de coeficientes de correlación de variables que permitió seleccionar los parámetros menos correlacionados entre sí. El PCA evalúa las variaciones en los valores de los parámetros experimentales y deriva nuevas variables complejas que reflejan los máximos cambios en el set de parámetros. La principal ventaja del PCA es que nos permite transformar los datos experimentales en una cantidad menor de variables denominadas componentes principales que en nuestro caso determinan las diferencias del estado fisiológico de las plantas.¹⁰⁵ Este método, basado en la reducción de variables, es una herramienta muy útil en la interpretación y clasificación de los datos.

Para evitar que alguna variable con varianza mayor dominara erróneamente los componentes principales, se procedió a estandarizar los valores originales a promedio = cero y a varianza = 1.

4.3 Resultados y Discusión

4.3.1 Experimento I. Análisis de partición de energía en plantas C₃, C₄ y CAM. Componentes del quenching no fotoquímico

La partición de energía entre fotosíntesis (Φ_{PSII}), quenching no fotoquímico (Φ_{NPQ}) y decaimiento fotofísico (Φ_C) se muestran en la Figura 4.6 para las tres variedades de plantas sometidas a distintas intensidades de luz actínica. En esta figura C₃, C₄ y CAM se refieren a *Vinca minor*, *Axonopus compressus* y *Kalanchoe pinnata*, respectivamente.

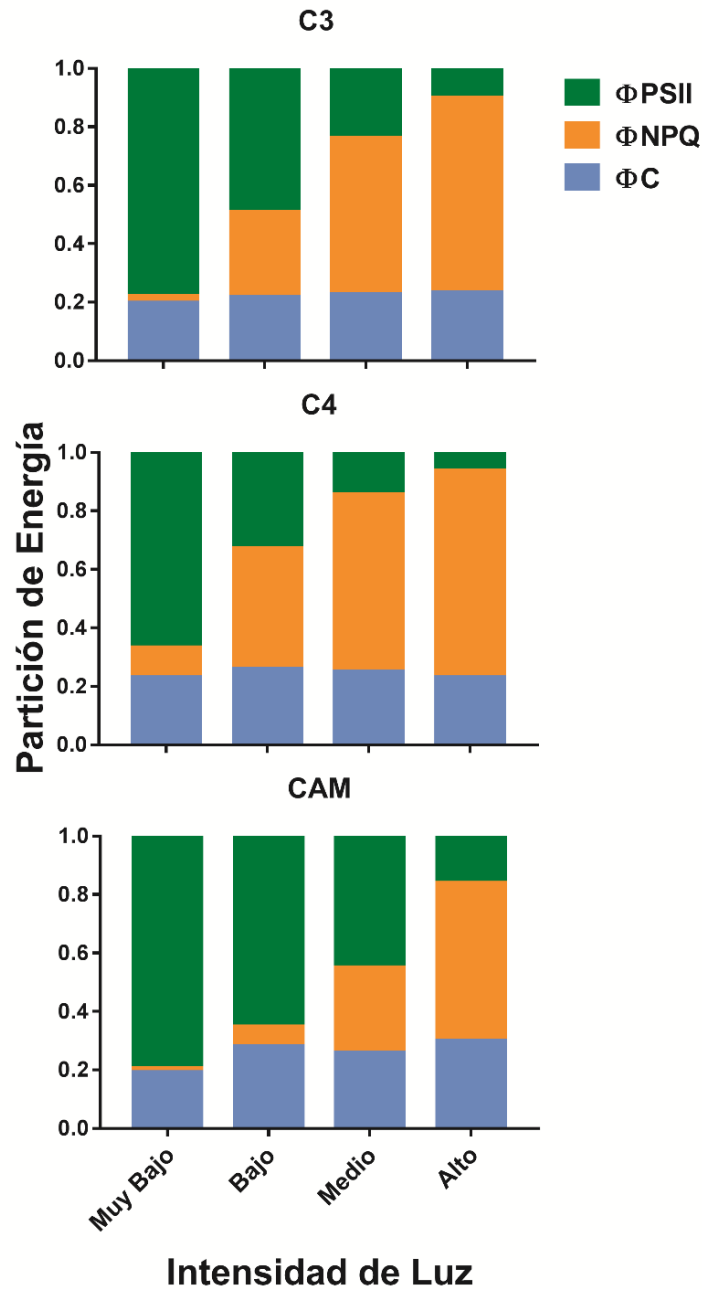


Figura 4.5 Partición de energía para C₃: *Vinca minor*, C₄: *Axonopus compressus* y CAM: *Kalanchoe pinnata* a diferentes irradiaciones de luz actínica.

En las tres variedades de plantas se observó que un aumento en la intensidad de luz actínica repercute en la disminución del rendimiento cuántico del PSII (Φ_{PSII}) y un incremento del rendimiento cuántico del quenching no fotoquímico (Φ_{NPQ}). Este

incremento es atribuido a que el Φ_{NPQ} actúa como mecanismo de protección contra el exceso de luz. Al comparar el valor del Φ_{NPQ} entre las diferentes especies se aprecia que a intensidades de luz alta y media, las especies C_3 y C_4 tienen un comportamiento similar, pero en plantas CAM el quenching no fotoquímico es significativamente menor. A una intensidad baja todas las especies presentan diferencias significativas entre sí para los valores de Φ_{NPQ} y a intensidades muy bajas la planta C_4 presenta diferencias significativas con las otras dos.

El rendimiento cuántico de decaimiento fotofísico (Φ_C) (Figura 4.5), por su parte, permaneció prácticamente constante para los tres mecanismos de fijación de carbono a cada intensidad de luz y no presentó ninguna diferencia significativa. Sin embargo, este parámetro fue ligeramente mayor para la especie CAM irradiada con alta intensidad de luz.

Cuando se incrementa la intensidad de luz actínica de muy baja a alta, los valores de Φ_{PSII} se redujeron en un 87% para la planta C_3 , 90% para C_4 y 80% para CAM. Los valores del Φ_{NPQ} se incrementaron en la misma magnitud para las especies anteriores. Este comportamiento es razonable ya que la fracción de luz derivada a decaimiento fotofísico es prácticamente constante y el quenching no fotoquímico representa al mecanismo de fotoprotección que actúa ante altas intensidades de luz.

Los diferentes componentes para el rendimiento cuántico del NPQ se muestran en la Figura 4.6

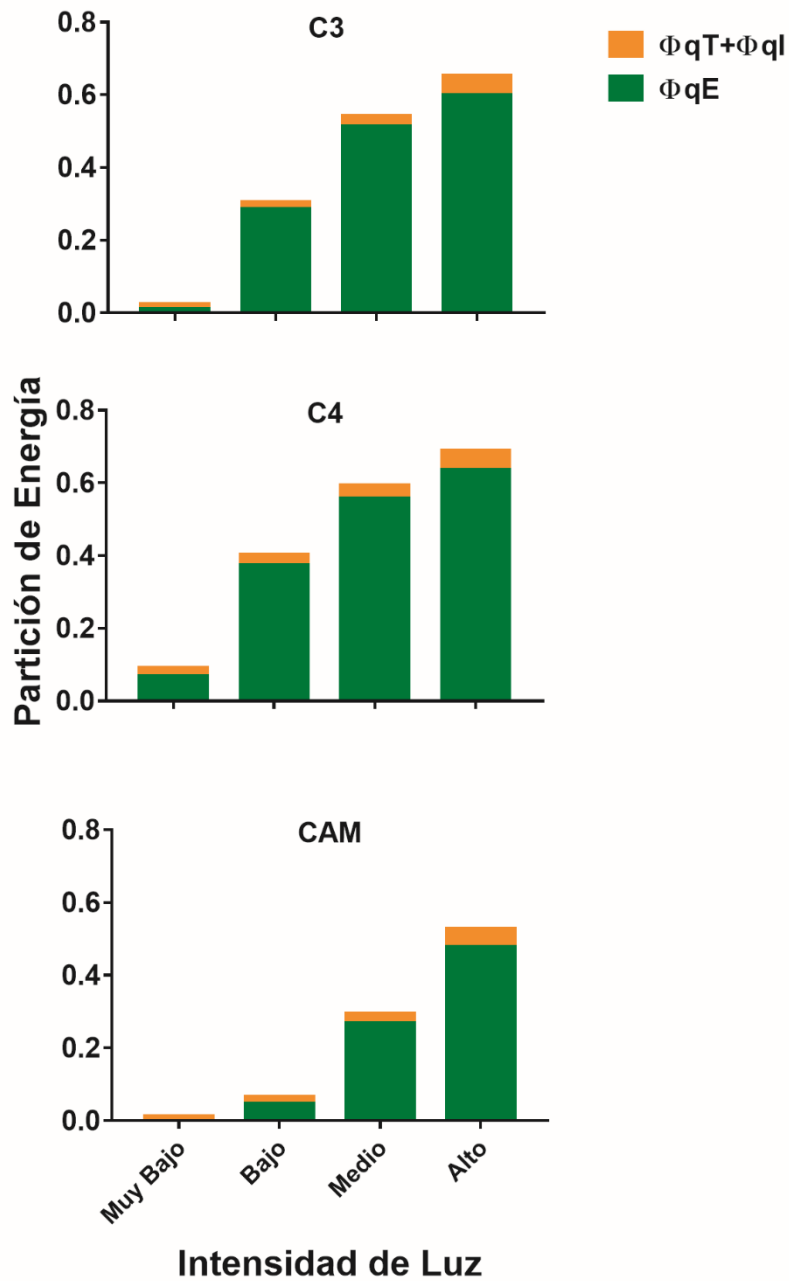


Figura 4.6 Rendimiento cuántico de los componentes del quenching no fotoquímico: Φ_{qE} (quenching dependiente de la energía), Φ_{qT} (quenching del estado de transición) y Φ_{qI} (quenching relacionado con la fotoinhibición) para C₃: *Vinca minor*, C₄: *Axonopus compressus* y CAM: *Kalanchoe epinnata* a diferentes irradiaciones de luz actínica.

Los resultados mostrados en la Figura 4.6 permiten un análisis más profundo sobre las distintas contribuciones al Φ_{NPQ} . En primer lugar, se observa que la contribución del quenching dependiente de la energía (Φ_{qE}) sobre el Φ_{NPQ} total resultó la mayor de todas, exceptuando el caso de Φ_{qE} a una intensidad muy baja para la especie CAM donde la contribución mayoritaria correspondió a Φ_{qT} y al Φ_{qI} . A intensidades muy bajas, para la planta C_3 , Φ_{qE} contribuye con un 47,8% y $\Phi_{qT} + \Phi_{qI}$ con un 52,2% mientras que en la planta CAM las contribuciones son de 13,1% para Φ_{qE} y de 86,9% para $\Phi_{qT} + \Phi_{qI}$. Este resultado indicaría la extremadamente pobre activación del ciclo de las xantofilas para la especie CAM a muy bajas intensidades de luz.

Para las tres especies estudiadas se encontraron diferencias significativas entre el Φ_{qE} de muy baja irradiación y los otros regímenes lumínicos a los que se expusieron. Los valores de $\Phi_{qT} + \Phi_{qI}$ presentaron un incremento con la luz actínica pero sólo se observan diferencias significativas entre las intensidades de luz muy baja y alta para las variedades de plantas.

4.3.2 Experimento II. Efecto del estrés hídrico sobre los parámetros fotosintéticos

La relación de picos (rojo/rojo lejano) obtenidas a partir de los espectros de fluorescencia de clorofila-a inicial (no variable) se muestran en la Figura 4.7 en función de la humedad del suelo.

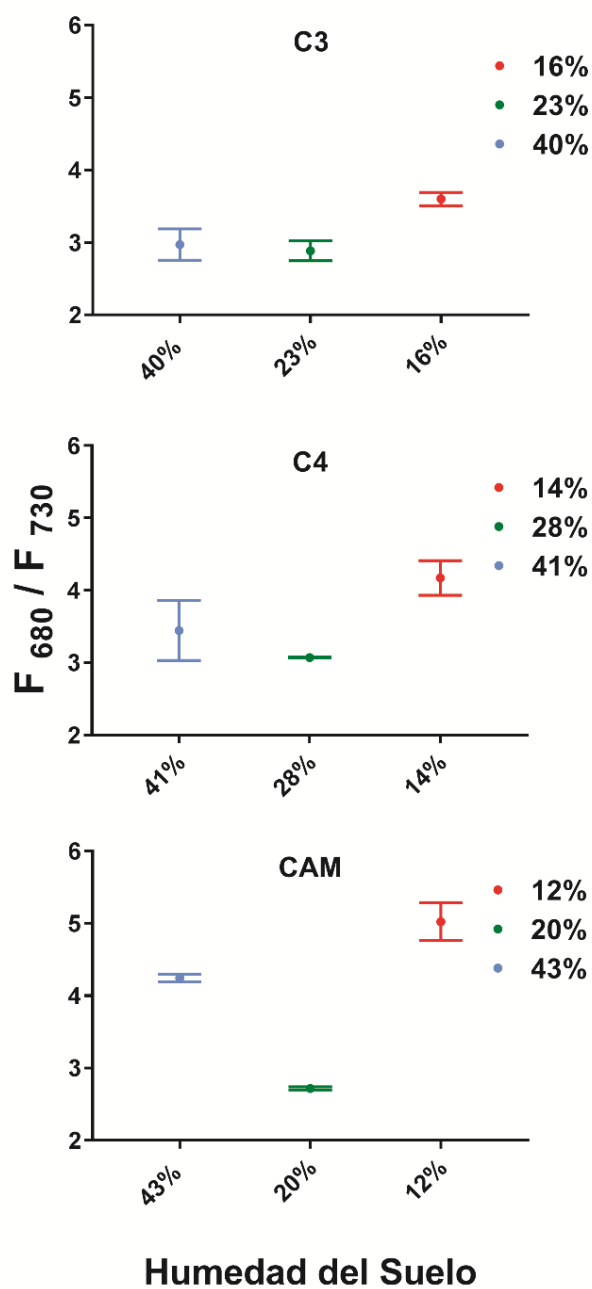


Figura 4.7 Relación de bandas de los espectros de fluorescencia basal (F_o) de clorofila-a (F_{683}/F_{730}) para C3: *Vinca minor*, C4: *Axonopus compressus* y CAM: *Kalanchoe pinnata* a diferentes concentraciones de humedad en el suelo.

Las relaciones $F_{red}/F_{far-red}$ exhibidas ya cuentan con las respectivas correcciones por reabsorción de luz en las bandas de 680 nm (Emisión del PSII) y en la banda de 730

nm (Emisión del PSII + PSI) (Ver sección 4.2.1.3), por lo cual son independientes de la concentración de clorofila en las hojas.

Para los tres tipos de plantas (C_3 , C_4 y CAM) los niveles extremadamente bajos de humedad en suelo tienen como consecuencia un aumento en la relación $F_{red}/F_{far-red}$. Al comparar los dos niveles con mayor porcentaje de humedad en el suelo contra el valor mínimo se observó que presentan diferencias significativas en los tres casos. Sólo en el caso CAM los tres porcentajes de humedad presentaron diferencias significativas entre sí. Se observa así que el cociente de fluorescencia es un indicador sensible al estrés hídrico provocado.

El aumento de la relación de bandas rojo/rojo lejano en los espectros de fluorescencia experimentales (sin corrección por reabsorción de luz) puede deberse a distintos factores: i) disminución de la concentración de clorofila y consecuente decrecimiento de reabsorción de luz, ii) destrucción del PSI relativa al PSII o iii) bloqueo del transporte electrónico asociado al PSII en la cadena fotosintética. Cuando se trabaja con espectros corregidos por reabsorción de luz, como es el caso de los resultados mostrados en la Figura 4.7), la posibilidad i) queda descartada y el incremento observado es atribuible solamente a variaciones a nivel del funcionamiento de los fotosistemas (causas descritas en ii) y/o iii)).

En los últimos años se ha comenzado a incluir en los trabajos de bibliografía la corrección por procesos de reabsorción de luz y se ha reportado variación ante diversas situaciones de estrés en el cociente de fluorescencia corregido.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹

El efecto de la sequía es notablemente mayor en la planta C_3 que ve prácticamente duplicado el valor del cociente de fluorescencia respecto al control inicial. Para la planta C_4 , que incrementa el cociente 1.4 veces, el efecto es menor.

La planta CAM que logra resistencia a la sequía separando las reacciones dependientes de la luz y el uso de CO_2 en el ciclo de Calvin en el tiempo y reduciendo así

al mínimo la fotorrespiración, mostró el menor incremento (1.3 veces) en el cociente de fluorescencia.

Es interesante destacar que en las plantas control no sometidas a estrés, la relación de picos rojo/rojo lejano (corregido por reabsorción de luz) sigue el orden $CAM > C_4 > C_3$. Esto indicaría que la estequiometría de los fotosistemas dada por la relación PSII/PSI probablemente sigue el mismo orden. No se han encontrado trabajos en bibliografía donde se hayan determinado comparativamente la estequiometría de los fotosistemas para plantas con distintos mecanismos de fijación de carbono, lo cual constituye un campo interesante para estudiar en el futuro.

Los resultados del análisis de la curva OJIP para las plantas sometidas a distintos grados de humedad en el suelo se muestran en la Figura 4.8. Este tipo de análisis permite analizar en qué paso del transporte electrónico de la cadena fotosintética se producen alteraciones debidas al estrés.

Las curvas de fluorescencia de la clorofila-a OJIP se construyeron como la relación de fluorescencia al tiempo (F_t) con respecto a la fluorescencia al tiempo $t = 0$ (F_0) de forma que permitiera comparar la variabilidad de la fluorescencia cuando las plantas fueron experimentando diferentes condiciones hídricas como lo muestra la Figura 4.8. Los cambios más acentuados se presentan cuando las plantas se encuentran en los valores mínimos de humedad en el suelo experimentando un estrés elevado. Esto se puede apreciar principalmente en el valor de F_m que disminuye a medida que el estrés hídrico se intensifica, aunque en las especies C_4 y CAM también se puede apreciar una disminución de la señal en la fase J-I.

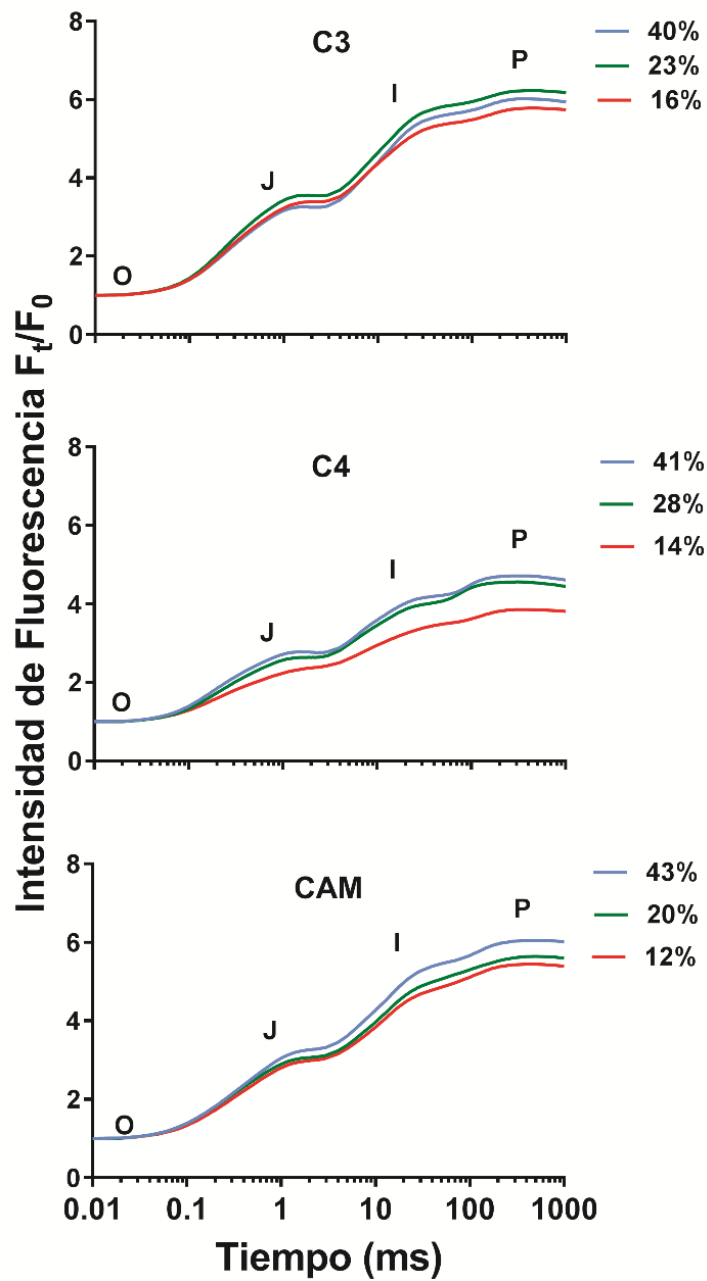


Figura 4.8 Curva OJIP de fluorescencia de la clorofila-a F_v/F_0 para C₃: *Vinca minor*, C₄: *Axonopus compressus* y CAM: *Kalanchoe pinnata* a diferentes concentraciones de humedad en el suelo.

La curva OJIP indica diferentes fenómenos fotosintéticos en sus diferentes puntos de inflexión. La fase O-J denota una reducción gradual de la Q_A , que es el aceptor primario del PSII; la fase J-I está relacionada con la actividad del complejo generador de oxígeno en el lado donador del PSII, y por último la fase I-P indica el grado de reducción de la ferredoxina.^{110,111}

En los tres casos la fase O-J no presentó diferencias importantes, pero a partir de fases posteriores como J-I e I-P se pueden observar diferencias entre el porcentaje de humedad mayor y el menor para los casos C_4 y CAM. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el funcionamiento del PSII y su relación con el complejo generador de oxígeno que se ve alterado frente al estrés hídrico. Es bien conocido en literatura que este complejo es uno de los componentes más sensibles del PSII, lo que se ve reflejado en la cinética OJIP, especialmente en la intensidad máxima de fluorescencia F_m . Efectivamente ante situaciones de estrés, tiende a disminuir la capacidad fotosintética del PSII, se acumulan especies reactivas de oxígeno que degradan la clorofila y se obtiene como resultado una disminución de F_m .¹¹²

El análisis de los registros de la cinética de Kautsky para las muestras estudiadas mostró que el parámetro fotosintético más sensible al estrés aplicado resultó la relación F_v/F_m , que representa el máximo rendimiento cuántico de fotosíntesis (Figura 4.9). Para la especie C_3 , este parámetro disminuyó significativamente entre el estado de mayor humedad y el de menor humedad. Para la especie C_4 , las diferencias significativas se dieron para los tres valores de humedad cayendo notablemente el valor de F_v/F_m ante la situación de mayor sequía. La planta CAM mostró una tendencia ligeramente decreciente en el valor del parámetro frente a la sequía extrema pero no significativa para ninguno de los valores de humedad. El valor elevado de su máximo rendimiento cuántico de fotosíntesis, que se mantiene aún a un 12% de humedad en el suelo, muestra su excelente funcionamiento fotosintético frente a la falta de agua.

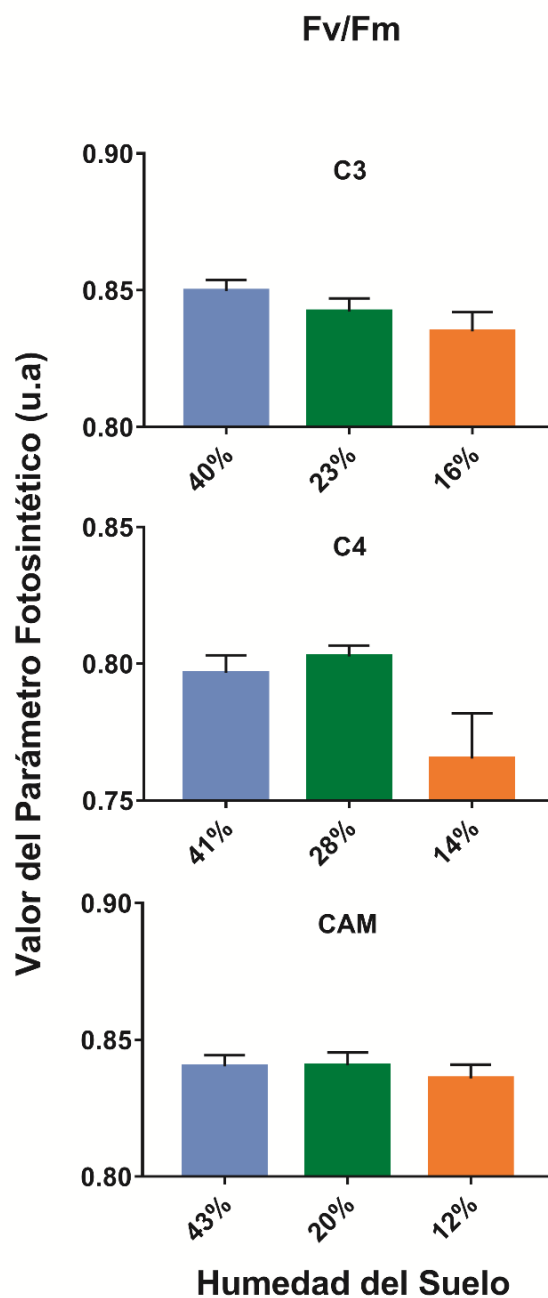


Figura 4.9 Máximo rendimiento cuántico de fotoquímica del PSII (previamente adaptado a la oscuridad) F_v/F_m para C₃: *Vinca minor*, C₄: *Axonopus compressus* y CAM: *Kalanchoe pinnata* a diferentes concentraciones de humedad en el suelo.

Los valores de F_v/F_m para la planta C_4 y CAM resultaron algo mayores para las condiciones de humedad alrededor del 20 al 28%. Para la planta C_3 , los valores mayores se encontraron para 23 y 40% y no presentaron diferencias significativas entre ellos.

Finalmente, el reparto de la energía absorbida por las plantas en función de la humedad del suelo se muestra en la Figura 4.10. Cada uno de los rendimientos mostrados en ella muestra qué fracción de la luz absorbida es destinada a fotosíntesis (Φ_{PSII}), a procesos de disipación fotofísicos que incluyen la fluorescencia (Φ_C) y a disipación de calor por los llamados procesos de quenching no fotoquímico, (Φ_{NPQ}).

La fracción de energía destinada a fotosíntesis (Φ_{PSII}) mostró un mayor valor para todas las especies cuando el porcentaje de humedad se encontraba entre 30-20%, fuera de este rango se obtuvo como resultado una disminución del parámetro. Esto muestra que el aprovechamiento de la energía absorbida por las plantas en el proceso fotosintético es máximo alrededor de esos valores de humedad. Combinando esta observación con el análisis de los datos de la Figura 4.9 surge claramente que contenidos de agua en el suelo entre 20 y 30% son los más adecuados para el correcto desarrollo de los tres tipos de plantas.

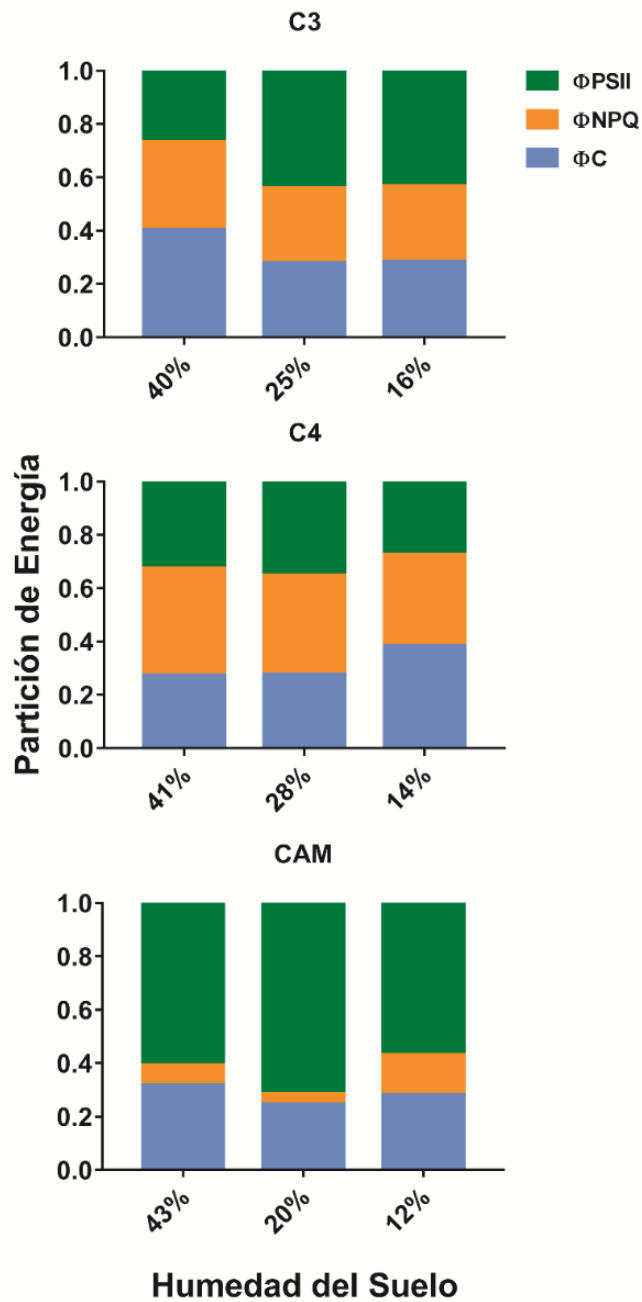


Figura 4.10 Partición de energía a diferentes porcentajes de humedad en suelo para C₃: *Vinca minor*, C₄: *Axonopus compressus* y CAM: *Kalanchoe pinnata*.

Las plantas C₃ y CAM con porcentaje de humedad en suelo cercanos al 40% presentaron diferencias significativas con respecto al valor medio de humedad (entre 30-20%) para todos los parámetros. Para las plantas C₄ y CAM sometidas a estrés hídrico

(porcentajes de humedad en suelo inferiores a un 15%) el valor del Φ PSII disminuyó y presentó diferencias significativas con respecto al obtenido para el valor medio de humedad. Esto es debido a que una disminución de agua en el sistema provoca una inhibición del transporte electrónico a través del PSII, induciendo la caída del valor de Φ PSII.

En la especie CAM, el Φ NPQ fue significativamente mayor con respecto a las otras dos mediciones cuando el porcentaje de humedad llegó a 12%. Esto es debido a que una reducción en el Φ PSII repercute en un aumento del Φ NPQ para disipar el exceso de energía solar que está recibiendo y no puede procesar por la vía fotoquímica. El quenching no fotoquímico es un mecanismo de fotoprotección de la planta.⁹ El aumento apreciable del Φ NPQ cuando la especie CAM experimentó un estrés hídrico, indica que la planta incrementó su capacidad de fotoprotección, lo que podría mejorar la adaptabilidad de la especie a condiciones de poca disponibilidad de agua y altas intensidades de luz, situación a la que las especies CAM en general, están mejor adaptadas

Estos ensayos, que nos ayudan a comprender los mecanismos de transporte electrónico y partición de energía en plantas con diferentes metabolismos de fijación de carbono, muestran en nuestro caso cómo porcentajes altos de agua en el suelo pueden ser perjudiciales para el vegetal. De hecho, las plantas que no están adaptadas a altas concentraciones de agua en el suelo, pueden ver afectado su crecimiento y desarrollo en condiciones de alta humedad. Cuando el suelo se encuentra saturado de agua puede desplazar el oxígeno en los poros del suelo y como consecuencia producir una disminución en la producción de ATP y la acumulación de toxinas en la planta bajo esas condiciones anaeróbicas.¹¹³ Bajo este contexto cuando las tres especies de plantas estaban sobre-irrigadas presentaron una disminución del PSII comparado con el valor presentado para porcentajes de humedad entre 30 y 20%.

Por otro lado, el estrés hídrico o sequía en plantas impide la asimilación de CO₂ dentro de la hoja, ya que las plantas cierran sus estomas para evitar la pérdida de agua por evaporación.¹¹⁴ Esto resulta en que la planta absorbe más energía solar de la que puede procesar a través de los procesos fotoquímicos.¹¹⁵ La respuesta ante este tipo de estrés es

disminuir el flujo de electrones entre el PSII y el PSI. Además, en tiempos relativamente cortos, ocurre una alteración estructural y funcional del PSII para adaptarse y prevenir el efecto de fotoinhibición y estrés oxidativo.¹¹⁶ Estos procesos de adaptación incluyen cambios en la síntesis de clorofila¹¹⁷ y alteración en el desarrollo estructural de los cloroplastos¹¹⁸ que finalmente se va a ver reflejado en la partición de energía interna de la planta.

Estos experimentos muestran claramente la utilidad y fortaleza de las metodologías no destructivas de análisis de fluorescencia, no sólo para obtener información básica sobre la fotosíntesis y los procesos de reparto de energía sino para diagnosticar situaciones de estrés y encontrar las mejores condiciones ambientales para el desarrollo de una especie vegetal.

4.3.3 Experimento III. Clasificación de especies C₃, C₄ y CAM según los parámetros fotosintéticos obtenidos de la adquisición rápida de datos OJIP. Fluorescencia variable de la clorofila-a

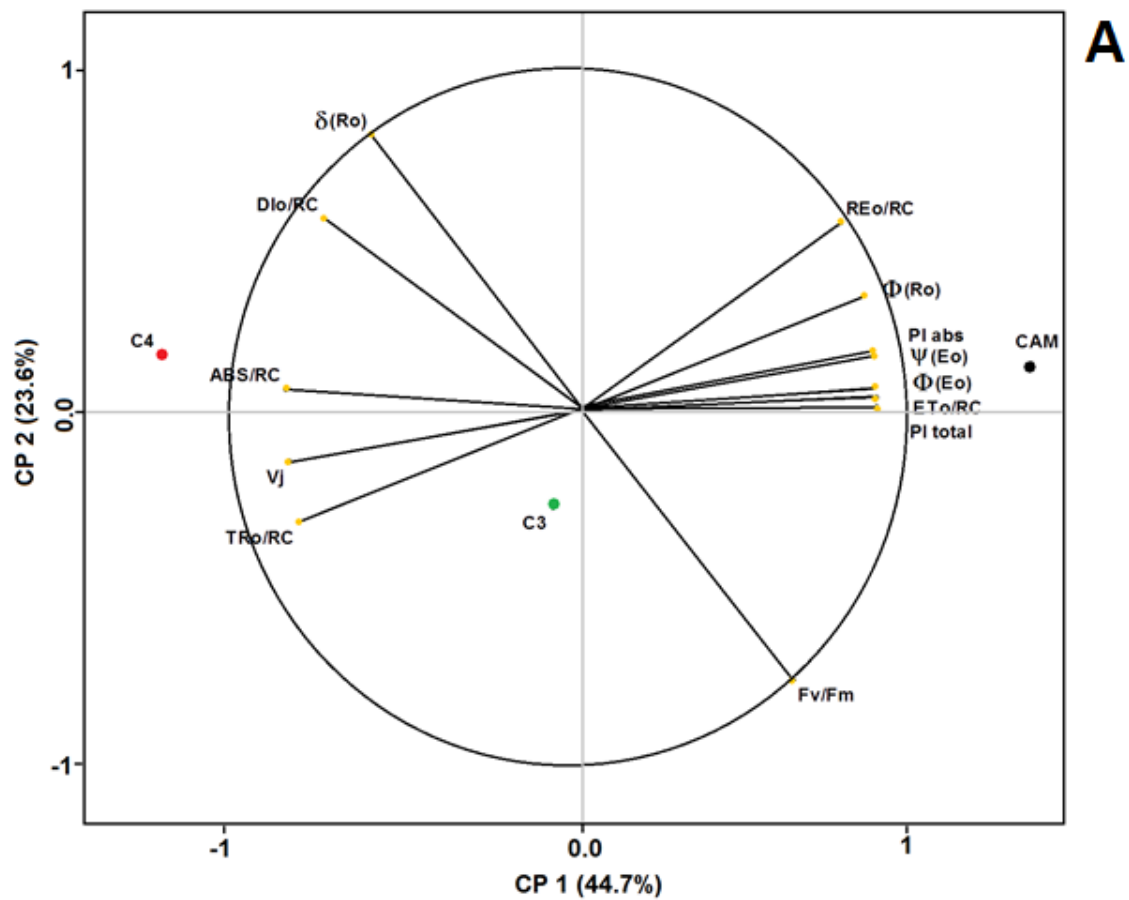
Se registró el test OJIP para 43 especies de plantas (Ver sección 4.2.2.1) con diferentes metabolismos de fijación de carbono.

Tal como se explicó en la sección 4.2.2.2, el método de PCA calcula una matriz de correlación de variables para evitar el ruido que introducen los parámetros correlacionados entre sí, y para permitir la selección de los parámetros menos correlacionados. De acuerdo a esa matriz de correlación, los parámetros fotosintéticos del test OJIP elegidos resultaron: F_v/F_m , V_J , ABS/RC , DI_o/RC , TR_o/RC , ET_o/RC , RE_o/RC , ψE_o , ϕE_o , δR_o , ϕR_o , PI_{abs} , PI_{total} (Ver ANEXO 1). Estos describen el estado fisiológico del mecanismo fotosintético en las especies estudiadas.

Para una mejor comprensión de cual parámetro en la maquinaria fotosintética está variando según la vía de fijación de CO₂, se realizó un gráfico biplot (Figura 4.11), que describe las coordenadas de los puntos, reflejando el estado de las muestras investigadas

y simultáneamente muestra los vectores que representan los parámetros fotosintéticos OJIP. Estos vectores nos brindan información acerca de la contribución relativa de cada variable en la formación de cada componente principal (PC1, PC2 y PC3), siendo la dirección y magnitud de cada vector un indicador de su aporte.

En el análisis de componentes principales (PCA) (Figura 4.11) se observan los vectores que representan los parámetros fotosintéticos seleccionados de la matriz de correlación y los componentes principales 1 (CP1) y 2 (CP2) para cada una de las especies estudiadas (Figura 4.11 B). Además, en la figura 4.11 A se aprecia la relación de los vectores directamente con los componentes principales teniendo en cuenta el metabolismo de fijación de CO₂.



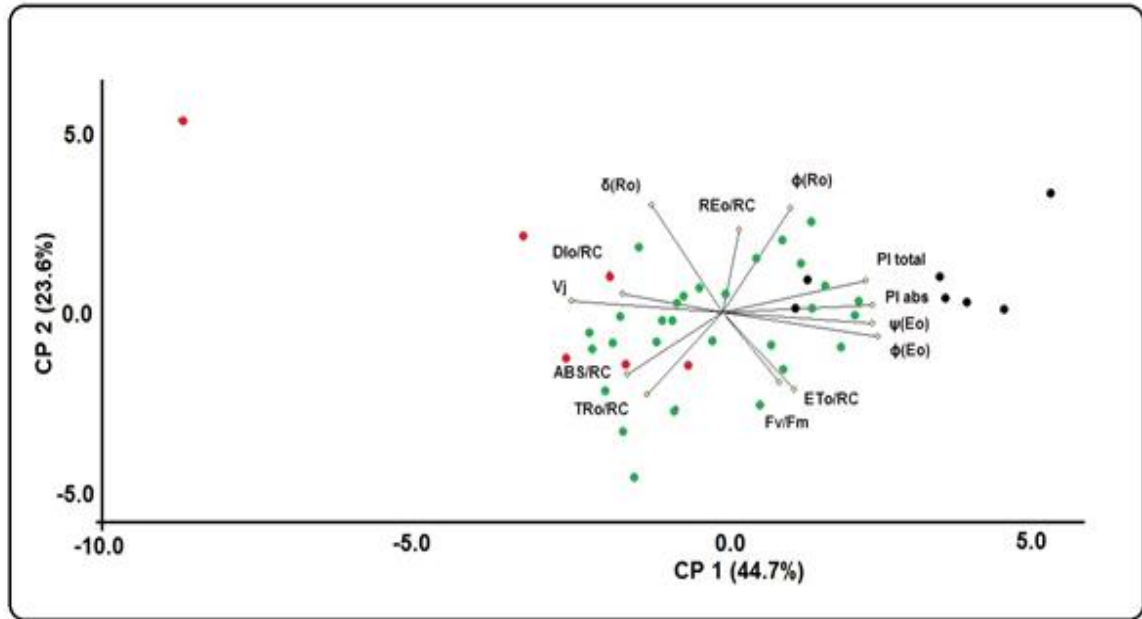


Figura 4.11 Gráfico biplot para el análisis de componentes principales de los parámetros fotosintéticos obtenidos del test OJIP para 43 especies de plantas con diferentes metabolismos de fijación de CO₂. A) Especies agrupadas según su mecanismo de fijación de CO₂. C₃ (Punto verde), C₄ (Punto rojo) y CAM (Punto negro). B) Posición espacial de cada una de las especies donde se incluyen 30 especies C₃ (Puntos verdes), 6 especies C₄ (Puntos rojos) y 7 especies CAM (Puntos negros).

La proximidad de los valores de cada planta con los vectores refleja la importancia que tiene el parámetro fotosintético (asociado al vector) con esa planta en el momento de construir la componente principal. En la figura 4.11 A y B se aprecia que los vectores que representan los parámetros δR_o , $D I_o/R C$, V_j , $A B S/R C$ muestran mayor contribución para plantas C₄ mientras que los vectores $P I$ abs, $P I$ total, ψE_o , ϕE_o para plantas CAM.

El análisis de componentes principales también nos brinda información de la correlación de las variables estudiadas, cuanto menor sea el ángulo entre dos vectores que representan dos variables, mayor será la correlación entre ellos, es el caso de los parámetros fotosintéticos $P I$ abs, ψE_o , ϕE_o .

Cuando un par de vectores que representan dos parámetros fotosintéticos están en posiciones opuestas, significa que el aumento de una de las variables favorece la disminución en la otra variable y viceversa. Esto conduce a pensar que parámetros que son relevantes en el comportamiento de las especies C_4 son inversamente proporcionales a los parámetros de las especies CAM y por esta razón es posible separar estos dos grupos como se aprecia en la figura 4.12.

En la figura 4.12 puede observarse que el componente principal 1 (PC 1) determina el 44.7% de las diferencias totales de los metabolismos C_3 , C_4 y CAM, el componente principal 2 refleja el 23.6% y el tercer componente 20.3%. Esto significa que un 88.6% de la variación entre los metabolismos de estas especies está contenida en estos tres componentes principales. Los parámetros obtenidos del test OJIP tienen diferente sensibilidad a los metabolismos de fijación de carbono, y diferente contribución a la información de cada componente principal.

En la figura 4.12 se observa que el metabolismo CAM tiene un comportamiento fotosintético diferente bien distinguido comparado con los mecanismos C_3 y C_4 los cuales tienen una conducta más relacionada.

La aplicación del PCA permitió, a través de un set de parámetros fotosintéticos OJIP, separar espacialmente los diferentes metabolismos de fijación de carbono. También permitió observar mediante un gráfico biplot los parámetros que contribuyen más al comportamiento de cada especie.

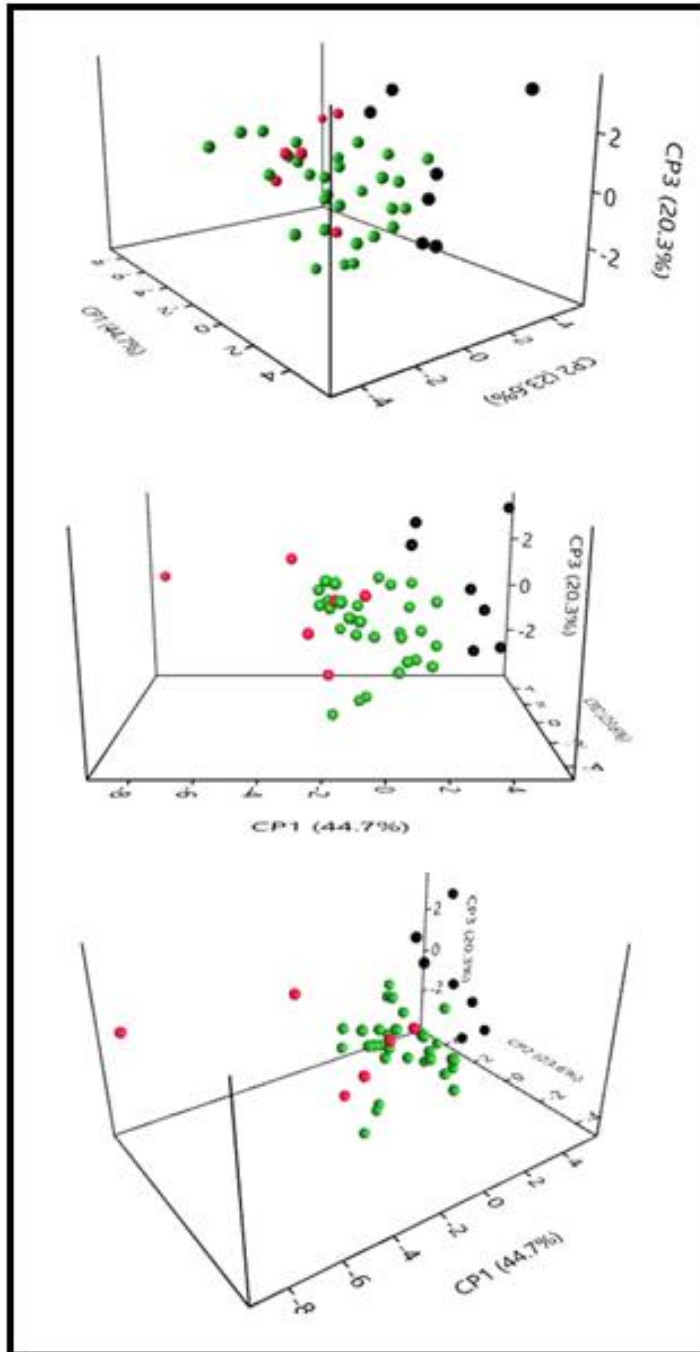


Figura 4.12 Gráfico de coordenadas en tres ejes para el análisis de componentes principales de los parámetros fotosintéticos obtenidos del test OJIP para 43 especies de plantas con diferentes metabolismos de fijación de CO₂ donde se incluyen 30 especies C₃ (Puntos verdes), 6 especies C₄ (Puntos rojos) y 7 especies CAM (Puntos negros).

4.4 Conclusiones del Capítulo 4

Independientemente del mecanismo de fijación de carbono, todas las especies se protegieron del exceso de luz actínica activando el proceso de quenching no fotoquímico, es decir aumentando la fracción de luz absorbida disipada como calor y disminuyendo la fracción de luz destinada a la excitación del PSII. El aumento de la luz actínica condujo a la reducción de la fracción de luz usada en fotosíntesis en todas las plantas, sin embargo, esa disminución resultó menor en el caso del mecanismo CAM. Estos resultados son coherentes con el hecho de que las plantas CAM han evolucionado para presentar mayor resistencia a niveles altos de luz.

A intensidades de luz medias a altas la componente principal del quenching no fotoquímico fue siempre la dependiente de la energía.

Ante la sequía, el cociente de fluorescencia (rojo/rojo lejano) corregido por reabsorción de luz, resultó en todos los casos un buen indicador del estrés aplicado.

Por otro lado, los resultados indican que las plantas son capaces de auto protegerse de la producción de ROS bajo condiciones de estrés hídrico, regulando la transferencia de electrones entre fotosistemas y disipando el excedente de energía como calor a través del mecanismo de quenching no fotoquímico. En la planta CAM se aprecia un quenching no fotoquímico particularmente bajo, haciendo que ésta aproveche en mayor proporción la energía lumínica aún en condiciones de estrés. A diferencia de las plantas C_3 y C_4 , la planta CAM mantiene una actividad fotosintética muy buena ante la falta de agua.

En lo que se refiere al transporte electrónico dentro de la cadena fotosintética, se detectaron daños a nivel de la reducción de Q_B y de PQ provocados por la sequía.

Es interesante observar que, mediante el uso de una metodología no destructiva como es el análisis de la fluorescencia de la clorofila es posible obtener información relevante sobre la salud vegetal. Más aún, contando con el rendimiento máximo de fotosíntesis y el reparto de energía en distintas condiciones (por ejemplo, a distintos grados

de humedad en suelos, como se analizó en este estudio) es posible determinar cuáles son las condiciones óptimas para el correcto funcionamiento fotosintético de las plantas.

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica estadística que permitió ganar información sobre muchos parámetros fotosintéticos obtenidos del test OJIP y encontrar un patrón para así visualizar el total de la variación de los datos en menor cantidad de variables. En este estudio, un 88.6% de la información se pudo explicar con 3 componentes principales y se consiguió agrupar las diferentes especies de plantas según su metabolismo de fijación de carbono, siendo el metabolismo CAM el que más se distingue en comparación con C_3 y C_4 , cuyos parámetros fotosintéticos están más relacionados entre sí.

Capítulo 5

Variabilidad en los espectros de fluorescencia de la clorofila en frutos de berenjena (*Solanum melongena*) crecidos bajo diferentes distribuciones espectrales de luz solar

5.1 Introducción

Algunas frutas contienen cloroplastos que presentan actividad fotosintética similar a la presente en las hojas y muestran emisión de clorofila.¹⁴

Básicamente la fluorescencia de los frutos puede ser analizada por fluorimetría de estado estacionario que nos brinda la distribución espectral de la fluorescencia²⁸ y fluorimetría de pulso de amplitud modulado (PAM) que nos permite analizar si los cloroplastos presentan actividad fotosintética y en caso positivo evaluarla¹⁰. De la distribución espectral de la fluorescencia se suele obtener el cociente de intensidades en los máximos de emisión en el rojo (F_{red} , debida a PSII) y rojo lejano ($F_{\text{far-red}}$, debida a ambos fotosistemas: PSII y PSI), como indicador de situaciones de estrés en vegetales. Sin embargo, este cociente está distorsionado por los efectos de re-absorción de luz dentro del tejido.^{24,35} Al corregir los espectros experimentales por los fenómenos de reabsorción de luz surge una pregunta importante: ¿Debería ser el cociente ($F_{\text{red}}/F_{\text{far-red}}$) un valor constante para todos los tejidos fotosintéticos?

A priori, cabría esperar que esta relación varíe (i) según la relación PSII / PSI en el tejido (estequiometría de los fotosistemas) y/o según los tamaños de sus respectivos complejos de antenas y (ii) siempre que ocurra un bloqueo en la transferencia de electrones desde el PSII hacia los aceptores primarios en la cadena fotosintética.²⁵

En bibliografía, se informaron espectros de fluorescencia corregidos para manzanas Granny Smith ³⁵, y para frutos de kiwi ¹¹⁹. Mientras los espectros de fluorescencia corregidos de cáscara de manzana presentaron similitudes a los espectros de las hojas de plantas que crecieron en el exterior, los espectros corregidos la pulpa del kiwi presentaron un comportamiento similar al de hojas crecidas a la sombra. Se sabe además que las plantas de sombra que crecen en condiciones de lumínicas ricas en longitudes de onda del rojo lejano, sintetizan mayores cantidades del complejo antena asociado con el fotosistema dos. La calidad de la luz determina en general el tamaño relativo de la antena del fotosistema 1 y 2. (PSI y PSII)²⁵.

La evidencia previa encontrada en literatura muestra indicios que la relación de fluorescencia ($F_{red}/F_{far-red}$) libre de reabsorción puede depender de la estequiometría de los fotosistemas y por ende de las condiciones lumínicas en que los cloroplastos crecieron. Sobre esta base formulamos nuestra hipótesis: como ya se sabe que la distribución espectral de la luz durante el desarrollo de los cloroplastos determina la proporción de fotosistemas y/o sus tamaños de antena, la calidad de la luz durante el crecimiento de los cloroplastos influirá en consecuencia sobre la relación de fluorescencia corregida.

Para probar esta hipótesis, se analizó entonces en detalle la fluorescencia de la clorofila presente en la pulpa de frutos de berenjena que recibieron diferentes distribuciones espectrales de luz solar a través de sus cáscaras de distintos colores. En efecto, la diferente pigmentación de la piel del fruto produce una atenuación diferencial de ciertas longitudes de onda proporcionando ambientes lumínicos diferentes para los cloroplastos en cada caso.

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Material Vegetal

Las diferentes especies de Berenjenas (*Solanum melongena* L; *Solanaceae*) se compraron en el mercado local. Las tres especies utilizadas se muestran en la Figura 5.1.

Se realizaron mediciones para el fruto entero, para la cáscara y para la pulpa. La pulpa fue separada de la piel cuidadosamente con un escalpelo y además se realizó un raspado de la cáscara para eliminar residuos de pulpa que pudieran quedar adheridos. Todos los experimentos se realizaron lo más rápido posible después de la separación de las partes de la fruta para evitar la degradación de la muestra.

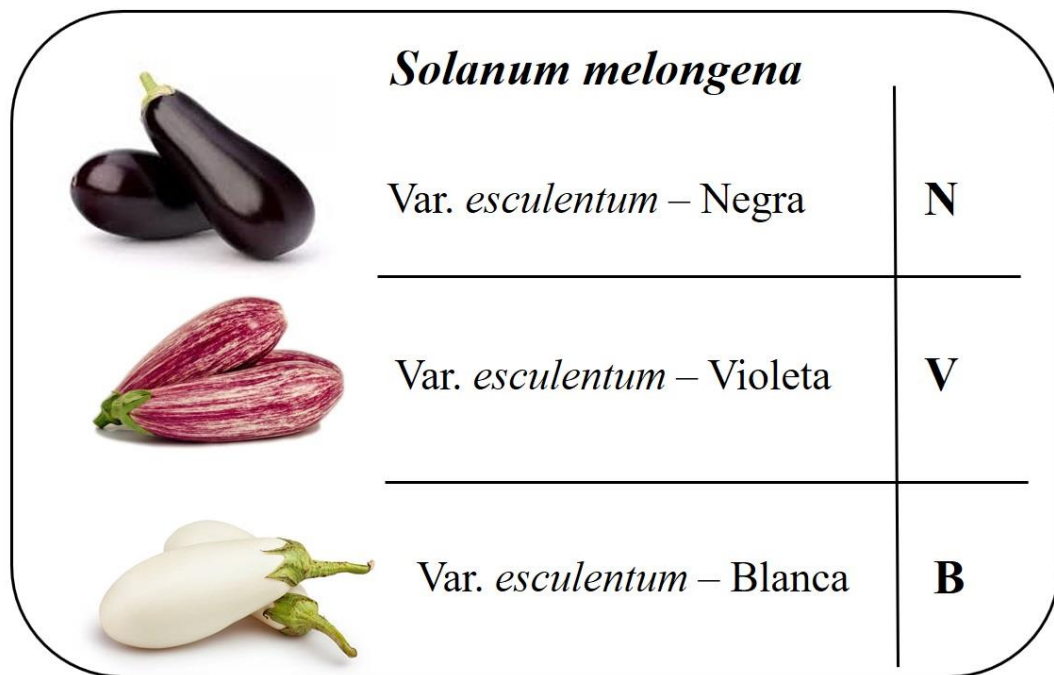


Figura 5.1 Variedades de *Solanum melongena* var. *esculentum* estudiadas, las letras N, V, B son abreviaciones para Negra, Violeta y Blanca para las respectivas especies.

5.2.2 Espectros de reflectancia y transmitancia

Los espectros de reflectancia y transmitancia de las muestras se registraron en un espectrofotómetro (UV3101PC, Shimadzu, Tokio, Japón) equipado con una esfera integradora (ISR-3100, Shimadzu, Tokio, Japón). Como blanco de referencia estándar se usó Sulfato de Bario empleado para ajustar el 100% del nivel de reflectancia. La Reflectancia difusa (R_λ) se registró en función de la longitud de onda de 400 a 800 nm para los frutos enteros, para las pulpas y para el grupo de cáscaras apiladas. Adicionalmente, se midió la transmitancia difusa (T_λ) en las mismas longitudes de onda para cáscaras individuales. Todas las mediciones se realizaron en condiciones de temperatura ambiente.

5.2.3 Fluorescencia de la clorofila no variable

Los espectros de fluorescencia no variable se obtuvieron para el fruto entero, la pulpa y la cáscara de cada especie de berenjena. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, con un flujo incidente de fotones que no inducía la cinética de Kautsky (flujo de fotones $< 20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ranura de excitación = 1 nm, ranura de emisión = 8 nm). Bajo estas condiciones, todos los aceptores de electrones en los centros de fotosíntesis estaban abiertos y la fluorescencia registrada correspondía a la emisión de fluorescencia basal.

Todas las muestras estudiadas se midieron bajo condiciones de transmitancia cero para permitir la aplicación del modelo de corrección por procesos de reabsorción de luz aplicable a capas ópticamente gruesas (ver sección 1.2.1.1). Los espectros se registraron desde 600 hasta 800 nm con un espectro fluorímetro de estado estacionario (Quanta Master, PTI-Photon Technology International-Brunswick, USA) en geometría de cara frontal. La longitud de onda de excitación se ajustó en 460 nm por conducir a espectros de fluorescencia en el rojo y rojo lejano con la mayor intensidad. Los espectros de emisión

se obtuvieron con muestras previamente adaptadas a la oscuridad durante 15 minutos y después se corrigieron por la respuesta del detector a diferentes longitudes de onda.

5.2.4 Correcciones de los espectros de fluorescencia considerando los procesos de reabsorción de luz

Los espectros de fluorescencia experimentales de los frutos enteros y las diferentes partes se corrigieron por procesos de reabsorción de luz, dividiendo los espectros experimentales por una función gama (Ecuación 5.1 y sección 1.2.1.1) la cual depende de la longitud de onda de excitación (λ_0) y de emisión (λ).

$$\gamma(\lambda, \lambda_0) = \frac{1}{1 + \sqrt{\frac{F(R_\lambda)}{F(R_\lambda) + 2}}} \frac{1}{1 + \sqrt{\frac{F(R_\lambda)(F(R_\lambda) + 2)}{F(R_{\lambda_0})(F(R_{\lambda_0}) + 2)}}} \quad (5.1)$$

donde $F(R_\lambda)$ es la función de reemisión a la longitud de onda λ , definida por la ecuación 5.2:

$$F(R_\lambda) = \frac{(1 - R_\lambda)^2}{2R_\lambda} \quad (5.2)$$

La ausencia de luz de transmisión a través de la muestra es una condición necesaria para la aplicación del modelo de corrección.

Este método fue originalmente desarrollado para sistemas inertes³⁴ y ha sido exitosamente aplicado para corregir espectros de fluorescencia de hojas³³, frutas¹¹⁹ y pigmentos inmovilizados en matrices sólidas^{120 121}.

Con los espectros de emisión corregidos por reabsorción de luz se calcularon las relaciones $F_{\text{red}}/F_{\text{far-red}}$ lejano como el cociente entre la intensidad de emisión de la banda a 682 nm (F_{red}) y la banda a 732 nm ($F_{\text{far-red}}$).

5.2.5 Modelado de fluorescencia y reconstrucción de espectros

Mediante el modelado de la interacción entre la luz y el fruto pudo reconstruirse la fluorescencia global observada para las berenjenas en función de los parámetros ópticos y espectroscópicos de sus partes. El modelo utilizado siguió los lineamientos generales usados en bibliografía previamente para el fruto del Kiwi.¹¹⁹

En el marco de este modelo, se plantea que la intensidad de fluorescencia I_f resulta del producto entre el flujo de fotones absorbido y el rendimiento cuántico de fluorescencia del tejido Φ_f (ecuación 5.3).

$$I_f = I_a \cdot \Phi_f \quad (5.3)$$

Para la pulpa sin piel, la intensidad de fluorescencia está dada por la ecuación (5.4).

$$I_f(\text{pulpa sola}) = I_0(\lambda_0) \cdot (1 - R_{\lambda_0}) \cdot \Phi_f \quad (5.4)$$

Donde $I_0(\lambda_0)$ es el flujo de fotones incidente a la longitud de onda de excitación λ_0 y $(1 - R_{\lambda_0})$ representa la fracción de luz incidente absorbida por la pulpa (asumiendo que no hay transmitancia a través de la pulpa).

El producto $I_0(\lambda_0) \cdot T_{\text{cáscara}}(\lambda_0)$ representa el flujo de luz incidente que pasa a través de la cáscara y llega hasta la pulpa. Cuando este producto es multiplicado por la fracción de luz incidente absorbida por la pulpa $(1 - R_{\lambda_0})$ y el rendimiento cuántico de fluorescencia de la pulpa Φ_f , se obtiene el número de fotones de fluorescencia originado por la pulpa (Ecuación 5.5).

$$I_f(\text{pulpa en la fruta}) = I_0(\lambda_0) \cdot T_{\text{cáscara}(\lambda_0)} \cdot (1 - R_{\lambda_0}) \cdot \Phi_f = I_f(\text{pulpa sola}) \cdot T_{\text{cáscara}(\lambda_0)}, \quad (5.5)$$

donde $T_{\text{cáscara}}(\lambda_0)$ es la transmitancia de la cáscara a la longitud de onda de excitación λ_0 .

Finalmente, la intensidad de fluorescencia emitida por la fruta entera tiene una contribución de la pulpa y de la cáscara y puede calcularse mediante la ecuación (5.6).

$$I_f(\text{Fruto entero}) = I_f(\text{pulpa sola}) \cdot T_{\text{cáscara}(\lambda_0)} \cdot T_{\text{cáscara}(\lambda)} + I_f(\text{cáscara}) + I_f(\text{cáscara}) \cdot R_{\text{pulpa}} \cdot T_{\text{cáscara}} \quad (5.6)$$

El primer término de la ecuación (5.6) representa la contribución de fluorescencia generada por la pulpa filtrada por la cáscara cuando sale del fruto, el segundo término es la intensidad de fluorescencia de la piel y el tercer término representa la fluorescencia de la piel generada internamente, reflejada por la pulpa y filtrada por la piel.

La contribución de fluorescencia de la cáscara debido a la absorción de fluorescencia de la pulpa ($I_{f(\text{cáscara})} \cdot (1 - R_{\text{cáscara}(\lambda)} - T_{\text{cáscara}(\lambda)}) \cdot \Phi_{f(\text{cáscara})}$) se consideró despreciable y no se incluyó en la ecuación (5.6). Para estimar la contribución de este término, que era como máximo de un 1%, se asumió un rendimiento cuántico de fluorescencia similar al de las hojas de las plantas (0.01 - 0.02)⁹. La ecuación (5.6) permite una reconstrucción aproximada del espectro de fluorescencia del fruto entero a partir de los espectros experimentales de fluorescencia individuales de la cáscara y la pulpa, del espectro de reflectancia de la pulpa y del de transmitancia de la cáscara. El espectro calculado con este modelo fue comparado en este trabajo con el espectro experimental de fluorescencia del fruto intacto. Lo anterior se encuentra descrito en la figura 5.2.

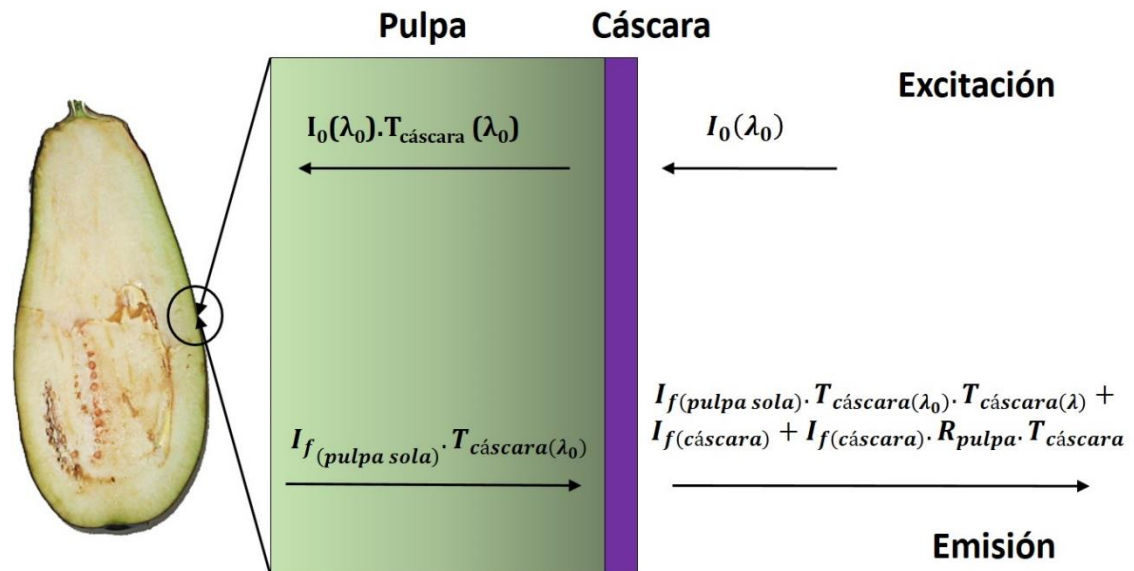


Figura 5.2 Descripción gráfica de los flujos de luz en el fruto de berenjena negra.

5.2.6 Parámetros fotosintéticos y fluorescencia (Cinética de Kautsky)

Se estudió la fluorescencia variable en el fruto entero y en las diferentes partes por separado (pulpa y cáscara) usando un fluorómetro de clorofila de pulso modulado (Hansatech FMS1) de igual manera que en el capítulo 3 (Sección 3.2.4), utilizando un pulso saturante (luz halógena) que tuvo una duración de 0.4 s con una intensidad de $4000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una luz actínica de luz halógena con una intensidad de $600 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En este ensayo a diferencia del capítulo 3, no se monitoreó el proceso de recuperación de la señal de fluorescencia.

A partir de estas mediciones, se calcularon los parámetros: F_v'/F_m' , F_v'/F_o' , ΦPSII , q_p , q_{NP} y NPQ en todos los casos donde se detectará una señal de fluorescencia variable (ver sección 1.2.2.2 y sección 1.4).

Se obtuvieron los parámetros fotosintéticos en función del tiempo de almacenamiento para los frutos intactos de berenjena negra, durante 12 días, a temperatura ambiente y a 4°C.

5.3 Resultados y Discusión

La distribución espectral de la fluorescencia basal fue determinada experimentalmente para la piel, la pulpa y el fruto entero en cada tipo de berenjena y se muestran en la Figura 5.3.

Se pudo observar la emisión de la clorofila producida por las diferentes partes de los tres tipos de berenjenas, con sus bandas características localizadas en el rojo (682 nm) y en el rojo lejano (732 nm). La banda en el rojo es casi imperceptible para la cáscara de la berenjena blanca.

La señal de fluorescencia es mayor para la pulpa de la berenjena negra, seguida en orden decreciente para las pulpas de las berenjenas violeta y la blanca.

Los espectros de fluorescencia corregidos por procesos de reabsorción de luz, libres de cualquier distorsión artificial y representando la distribución espectral real de la emisión de los cloroplastos se muestran en la Figura 5.4:

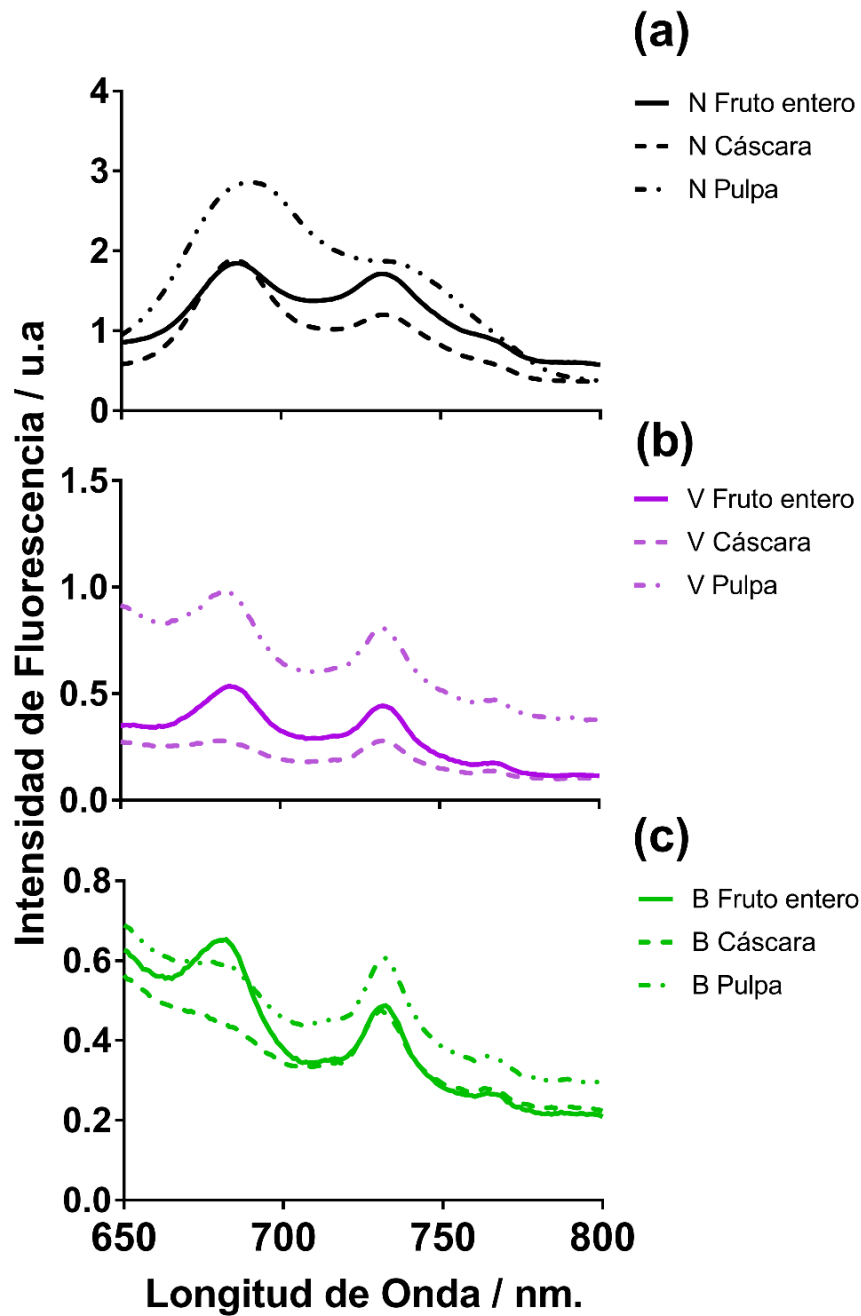


Figura 5.3 Espectro de fluorescencia experimental (F_o) de las diferentes partes de la berenjena negra (a), berenjena violeta (b) y berenjena blanca (c). Fruto entero (—), cáscara (--) y pulpa (-.-). Todos los espectros fueron corregidos por la respuesta del detector.

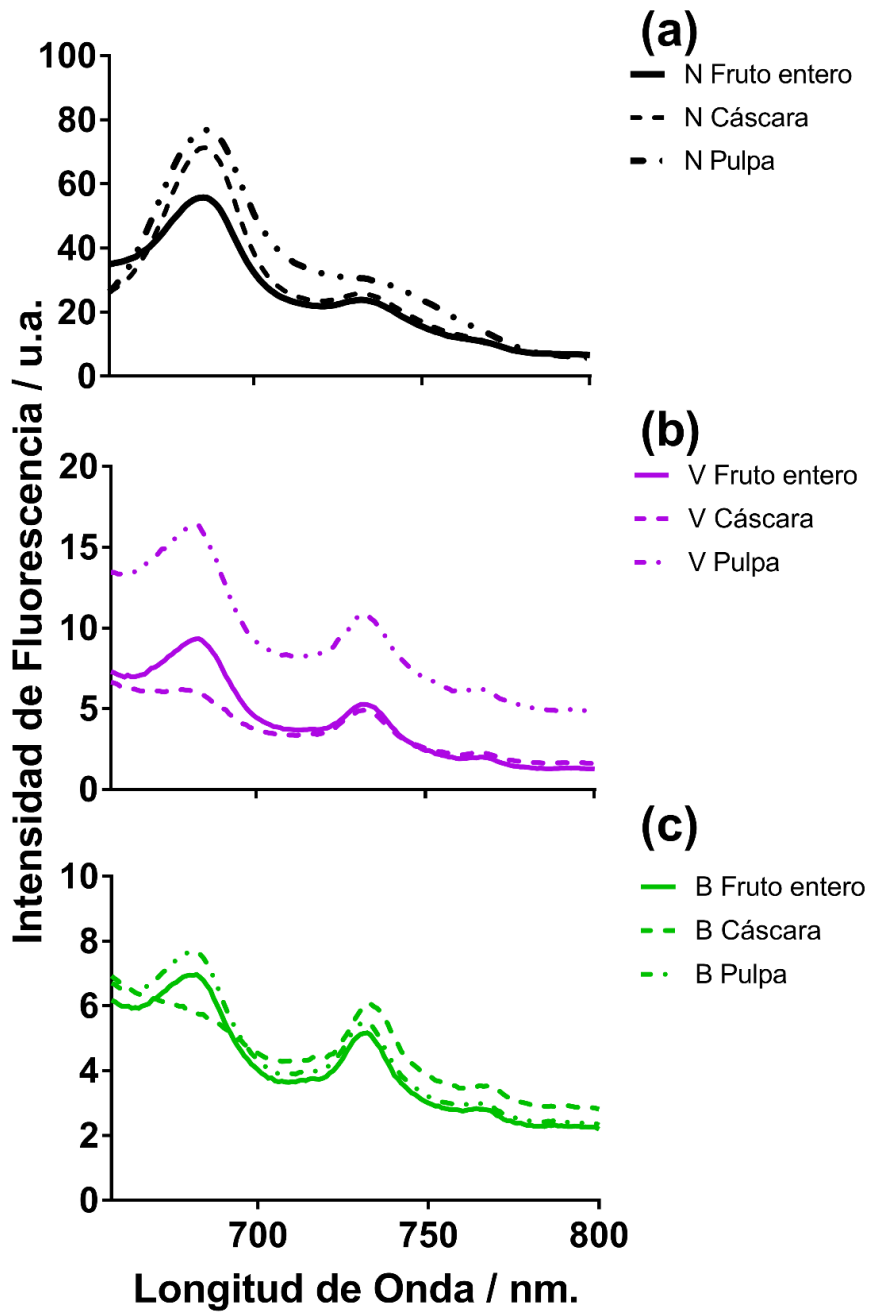


Figura 5.4 Espectros de fluorescencia corregidos por la respuesta del detector (F_0) y adicionalmente corregidos por procesos de reabsorción de luz para de las diferentes partes de la berenjena negra (a), berenjena violeta (b) y berenjena blanca (c). Fruto entero (—), cáscara (--) y pulpa (-.-).

Comparando las Figuras 5.3 y 5.4, puede observarse que las relaciones de $F_{\text{red}}/F_{\text{far-red}}$ experimentales resultaron menores al valor correspondiente corregido teniendo en cuenta los procesos de reabsorción de luz. Adicionalmente, el máximo en el rojo se desplazó a longitudes de onda más cortas después de la corrección. Así, los máximos para la pulpa de la berenjena negra se desplazaron de 691 a 686 nm, para la pulpa de la berenjena violeta de 683 a 682 nm y para la pulpa de la berenjena blanca de 682 a 681 nm.

Los valores para las relaciones de fluorescencia de los espectros corregidos por procesos de reabsorción de luz de las diferentes partes de las tres variedades de frutos de berenjena se muestran en la Tabla 5.1. Esta tabla resume un total de 81 medidas: Se midieron tres frutas de cada tipo y se registraron tres espectros para cada una de sus partes. Cada valor reportado en la tabla es un promedio de las nueve determinaciones.

Tabla 5.1 Relación de fluorescencia (F_{682}/F_{732}) corregida por los procesos de reabsorción de luz para las diferentes partes de las tres variedades de berenjenas. Los valores reportados en esta tabla corresponden a cada parte del fruto y son promedios de 9 espectros de fluorescencia (se tomaron tres frutas para cada tipo de berenjena y se registraron tres espectros para analizar cada parte).

Relación $F_{\text{red}}/F_{\text{far-red}}$ Corregida			
Variedad	Fruto	Cáscara	Pulpa
Negra	2.34 ± 0.04	2.7 ± 0.1	2.51 ± 0.08
Violeta	1.77 ± 0.01	1.26 ± 0.03	1.51 ± 0.01
Blanca	1.35 ± 0.01	0.94 ± 0.01	1.39 ± 0.01

Haciendo foco en las pulpas, que recibieron diferentes distribuciones espectrales de luz durante su crecimiento, se encontró variación en los cocientes $F_{\text{red}}/F_{\text{far-red}}$, resultando en orden decreciente: Negra > Violeta > Blanca. Este orden también fue observado por las otras partes del fruto.

La distribución espectral que alcanza a las pulpas en el fruto intacto puede estimarse siguiendo la distribución de la luz transmitida por sus respectivas cáscaras. Las diferencias en la transmitancia de éstas pueden ser observadas en la Figura 5.5.

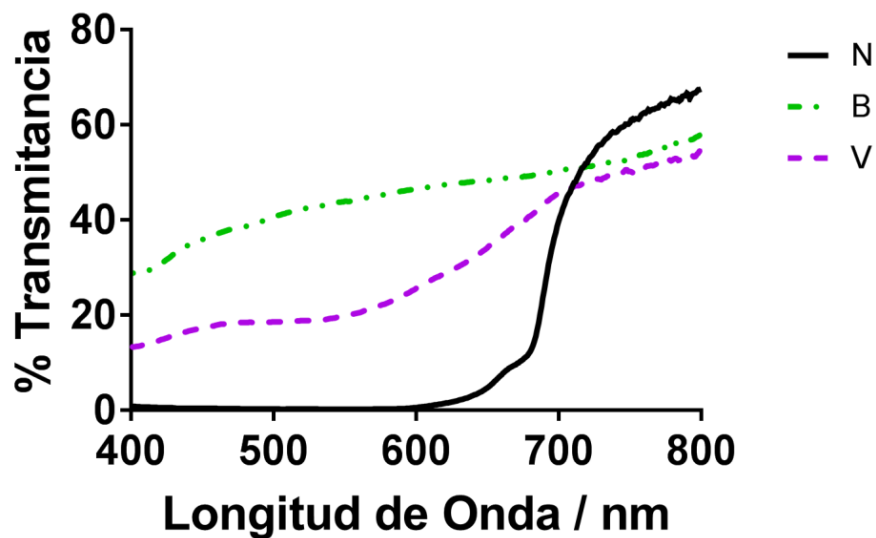


Figura 5.5 Espectro de transmitancia difusa para las cáscaras de berenjena Negra (—), Blanca (--) y Violeta (-.-).

Para la cáscara de berenjena negra, puede observarse una transmitancia casi nula por debajo de 600 nm y un incremento abrupto por encima de 700 nm. Esta cáscara actúa casi como un filtro de corte que permite el paso de la luz roja lejana a través de él. La cáscara blanca tiene una respuesta más constante, sin ningún salto brusco y con una transmitancia similar en las regiones rojas y lejanas. La cáscara de la berenjena violeta, tiene un comportamiento intermedio transmitiendo más luz en el rojo que la cáscara de la

berenjena negra pero menos que la cáscara de la berenjena blanca. Para la luz transmitida a través de la piel el cociente de las contribuciones rojo/rojo lejano siguió el orden: Blanca > Violeta > Negra.

La reconstrucción del espectro de fluorescencia para el fruto entero por la ecuación 5.6 y el espectro experimental promedio de la berenjena negra se muestran en la Figura 5.6. La reconstrucción sólo se realizó para el fruto de la berenjena negra porque los niveles de fluorescencia para los otros tipos de berenjena resultaron demasiado bajos para realizar el modelado con suficiente precisión.

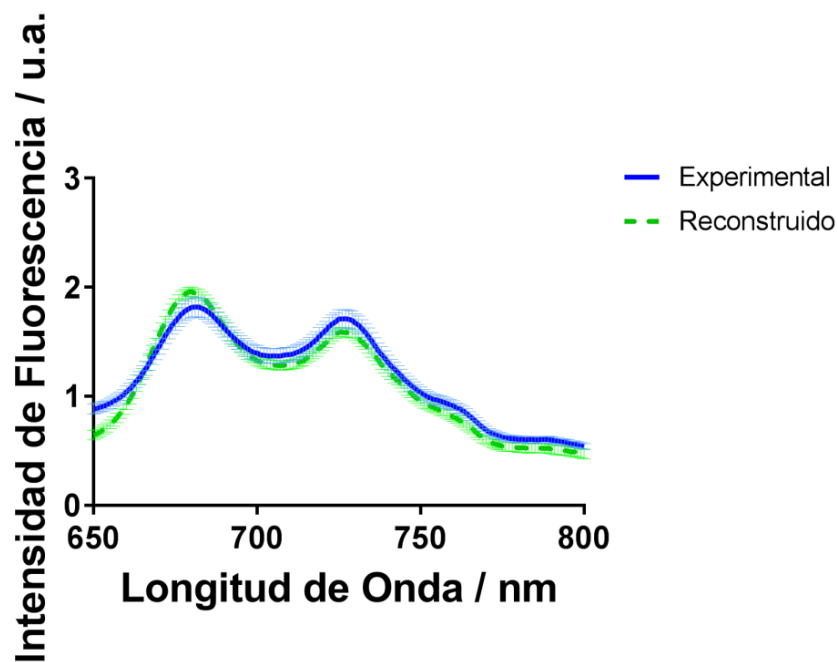


Figura 5.6 Modelado del espectro de fluorescencia reconstruido para el fruto entero (- -) y espectro de fluorescencia experimental para el fruto entero (—). Ambos espectros son de frutos de berenjena negra y presentan sus respectivas barras de error (zona sombreada).

La fluorescencia variable de clorofila se estudió en las diferentes partes de las tres variedades de berenjenas por medio de un fluorómetro de pulso de amplitud modulada (PAM). La fluorescencia variable resultó nula o insignificante para todas las cáscaras, para la pulpa de la especie blanca y para el fruto intacto de las berenjenas violeta y blanca. (ver Tabla 5.2).

Tabla 5.2 Fluorescencia de la clorofila variable en las diferentes partes de los frutos de berenjena. Para las pulpas de las berenjenas Negra y Violeta, la señal de fluorescencia variable fue mayor cerca a la cáscara y fue decreciendo a medida que se acercaba al centro del fruto, siendo casi nula en el centro.

Fluorescencia Variable de la Clorofila			
Variedad	Fruto entero	Pulpa	Cáscara
Negra	SI	SI	NO
Violeta	NO	SI	NO
Blanca	NO	NO	NO

Los parámetros fotosintéticos obtenidos de la fluorescencia variable para las pulpas de las berenjenas negra y violeta se comparan entre sí en la figura 5.7.

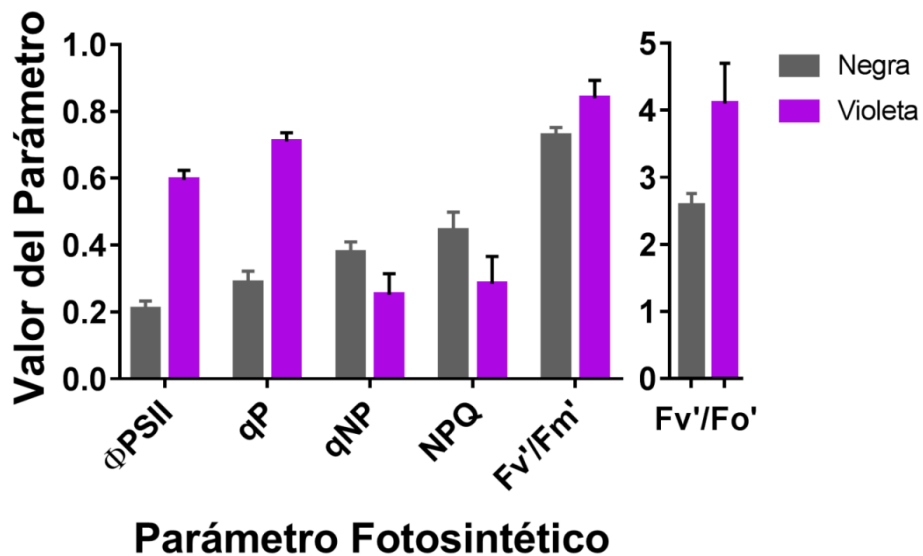


Figura 5.7 Valores de los parámetros fotosintéticos obtenidos de las medidas de fluorescencia variable para las pulpas de las berenjenas Negra y Violeta.

Todos los parámetros excepto los relacionados con el quenching no fotoquímico resultaron menores para la pulpa de la berenjena negra.

Los parámetros fotosintéticos se monitorearon durante el tiempo de almacenamiento para frutos intactos de berenjena negra ya que ésta fue la única que mostró fluorescencia de clorofila variable para el fruto entero. En la Figura 5.8 se muestran los resultados para almacenaje a temperatura ambiente (25°C) y para condiciones de refrigeración (4°C). Se presentan sólo los parámetros que resultaron más sensibles al tiempo de almacenamiento: F_v'/F_m' , Φ_{PSII} and F_v'/F_o' .

Los valores mostraron una variabilidad considerable a temperatura ambiente (especialmente Φ_{PSII} y F_v'/F_o'). Por el contrario, la dispersión en los valores de las muestras refrigeradas fue mucho menor (ver las barras de error en la Figura 5.8). Se observó un fuerte descenso en los parámetros y en la actividad fotosintética para las berenjenas refrigeradas. En cambio, a temperatura ambiente sólo se pudo detectar una pequeña reducción de la eficiencia fotosintética en 12 días de análisis.

La intensidad de la fluorescencia basal experimental de frutos de berenjenas tiene el siguiente orden $N > V > B$ para todas las respectivas partes. Este hecho está de acuerdo con un mayor contenido de clorofila para la variedad N, una concentración intermedia en V y un contenido menor en la variedad B.

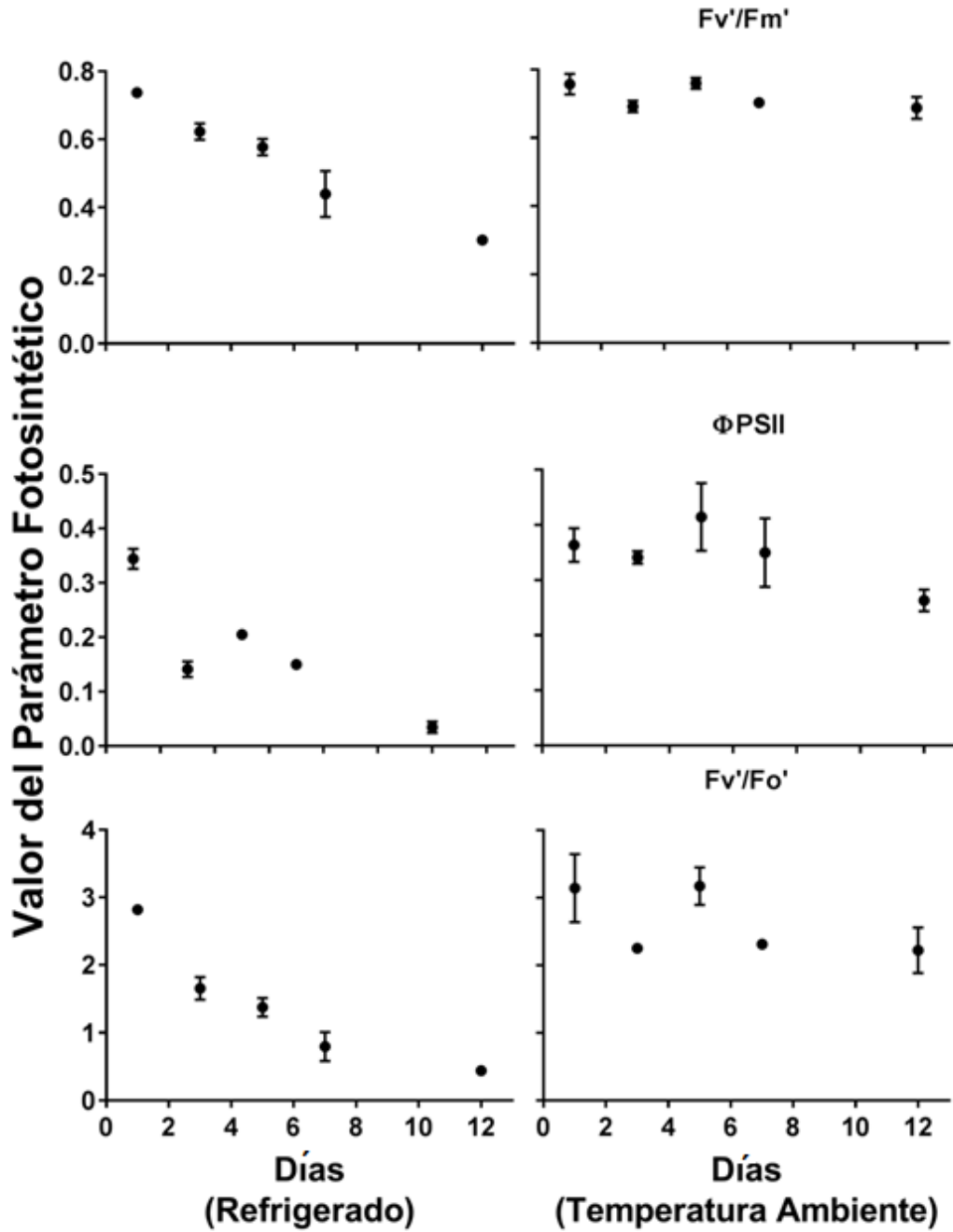


Figura 5.8 Variación de los parámetros fotosintéticos: Fv'/Fm' , $\Phi PSII$ y Fv'/Fo' obtenidos de la fluorescencia de la clorofila variable de frutos intactos de berenjena negra en función del tiempo de almacenamiento. Berenjenas mantenidas a 4°C (izquierda) y a temperatura ambiente 20°C (derecha).

La relación de fluorescencia corregida para las pulpas siguió el orden de $N > V > B$. Esta tendencia puede explicarse tomando en cuenta la distribución espectral de la luz transmitida a través de las cáscaras. La cáscara de berenjena negra, comparada con la blanca y la violeta muestra una menor transmitancia en la región visible y una mayor transmitancia en la zona del rojo lejano.

La variabilidad de la transmitancia de las cáscaras en el visible está relacionada con la concentración respectiva de pigmentos. Por otro lado, en la región del rojo lejano alrededor de 700 nm, se sabe que la transmitancia de los tejidos de las plantas incrementa con la cantidad de aire intracelular presente.¹²² De hecho, una mayor transmitancia en el rojo lejano para la cáscara negra puede deberse a características estructurales como un mayor número de interfaces agua-aire o discontinuidades internas de índice de refracción.

Como se muestra en la Figura 5.5, los espectros de transmitancia de las cáscaras mostraron claramente que las pulpas recibieron una distribución espectral de luz muy diferente. Para N, los fotones que llegaban a la pulpa estaban enriquecidos en rojo lejano. Bajo estas condiciones, ocurre una excitación preferencial del PSI ya que este absorbe principalmente en la región del rojo lejano (absorción máxima en 700 nm) mientras que el PSII absorbe básicamente en el rojo (máximo de absorción en 680 nm)^{123 124-126}. En respuesta a esta distribución de luz, los cloroplastos incrementan el tamaño de la antena del PSII. Como consecuencia, la relación de fluorescencia corregida fue mayor. Por otro lado, la pulpa de la berenjena blanca recibió una proporción más balanceada de longitudes de onda en el rojo y rojo lejano y por lo tanto no hubo una excitación preferencial de alguno de los fotosistemas. En este caso la relación de fluorescencia fue por consiguiente menor. Finalmente, para la berenjena violeta cuya cáscara presentó un valor intermedio entre la berenjena negra y la blanca, la relación de fluorescencia corregida mostró un valor intermedio. Estos resultados confirman nuestra primera hipótesis que establecía que la distribución espectral de la luz durante el desarrollo de los cloroplastos determinaba la proporción de fotosistemas y/o sus tamaños de antena e influía en consecuencia sobre la relación de fluorescencia corregida.

Se ha informado ya en la literatura que las bajas intensidades de luz conducen a un aumento drástico en el tamaño de la unidad de antena de captación de luz de PSII y un ligero aumento de la de PSI.¹²⁷ También se demostró que la intensidad de la luz ambiental modula el contenido de los componentes de los tilacoides, así como la proporción PSII / PSI.¹²⁸

Los resultados obtenidos en este trabajo también complementan otros trabajos previos^{25,35,119} reforzando las evidencias de que cuanto mayor es la relación rojo / rojo lejano en la luz de excitación, mayor será la relación de fluorescencia corregida. Anteriormente se demostró en la literatura que la luz de sombra, rica en longitudes de onda del rojo lejano, induce en las hojas de plantas una tendencia a aumentar el tamaño de la antena del PSII¹²⁹, lo que es consistente con nuestros hallazgos.

Los espectros para la berenjena negra, reconstruidos a partir de la fluorescencia de cada parte y los datos de reflectancia y transmitancia, se ajustaron con éxito dentro del error experimental, a los espectros experimentales. Un modelo físico similar se presentó anteriormente para kiwi¹¹⁹. Sin embargo, en el caso de las berenjenas, como la fluorescencia de la cáscara no es despreciable en comparación con la emisión de pulpa, se incluyó un tercer término (ver ecuación 5.6) para tener en cuenta la fluorescencia de la cáscara generada internamente y reflejada por la pulpa.

La fluorescencia variable de la clorofila que se encuentra en las diferentes partes de los frutos de berenjena es un signo de la presencia de actividad fotosintética.^{14,119}

Para las cáscaras y para la pulpa de la berenjena blanca, los cambios en la fluorescencia tras la aplicación de un pulso de luz saturada fueron tan pequeños que resultó difícil separar las señales del ruido instrumental y, por consiguiente, fue imposible derivar algún parámetro fotosintético de ellos.

El color verde de las pulpas siguió el orden $N > V > B$ que indica el orden de sus contenidos de clorofila. La falta de fluorescencia de clorofila para la berenjena blanca se debió probablemente a su bajo contenido interno de clorofila.

Los parámetros fotosintéticos F_v'/F_m' , F_v'/F_o' , q_p y Φ_{PSII} fueron menores para la pulpa sombreada de berenjena negra que para la pulpa de la berenjena violeta. Estos resultados concuerdan con los conocimientos bibliográficos previos sobre el hecho de que las hojas adaptadas a plena luz solar presentaron mayores valores para los parámetros fotosintéticos^{10,130}.

Por otro lado, los parámetros no fotoquímicos, q_{NP} y NPQ , que representan el calor disipado por el sistema fueron mayores para la variedad negra. De trabajos bibliográficos anteriores, se sabe que la comparación de los parámetros del quenching no fotoquímico entre las hojas de sol y las de sombra ha mostrado un comportamiento variado dependiendo de la intensidad de la luz utilizada para su determinación. Sin embargo, para valores de intensidades de luz similares a las utilizadas en nuestros experimentos, estos coeficientes resultaron mayores para hojas de sombra¹³⁰ en consistencia con nuestros resultados para berenjena. Un valor más bajo para Φ_{PSII} observado en la pulpa de berenjena negra es coherente con sus valores más altos para los parámetros del quenching no fotoquímico. De hecho, una menor eficiencia del Φ_{PSII} puede explicarse por un aumento en la disipación de calor indicado por q_{NP} y NPQ .¹³⁰

El fruto intacto de la berenjena negra mostró una fluorescencia de clorofila variable apreciable y sus parámetros fotosintéticos se pudieron medir de forma no destructiva en función del tiempo de almacenamiento. La variabilidad en los parámetros fotosintéticos a temperatura ambiente se debió a cambios en los valores de F_m' entre las muestras de berenjenas negras. Mientras que los valores de F_o' fueron similares para todas las berenjenas, los valores de F_m' mostraron oscilaciones apreciables. Estas grandes oscilaciones no estaban presentes para las muestras refrigeradas. Los parámetros F_v'/F_m' , F_v'/F_o' y Φ_{PSII} , cuya disminución fue observada especialmente para las berenjenas que se guardaron en el refrigerador a 4°C, resultaron los de mayor sensibilidad para indicar el estado fisiológico de la fruta. La metodología demostró claramente el daño sufrido por las

berenjenas almacenadas en condiciones de enfriamiento y las diferencias con el almacenamiento a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos manifestaron la utilidad del monitoreo de la fluorescencia variable del fruto de berenjena negra como herramienta potencial para detectar su calidad.

5.4 Conclusiones del Capítulo 5

Las principales conclusiones de este capítulo son:

Las berenjenas mostraron emisión de clorofila variable y no variable. La fluorescencia variable, sin embargo, fue prácticamente insignificante para la variedad blanca debido a su muy baja concentración de clorofila.

La presencia de fluorescencia de clorofila variable es un indicador de actividad fotosintética en la fruta.

Los cloroplastos de las frutas de berenjena cultivadas bajo luz enriquecida en longitudes de onda en el rojo lejano mostraron una relación de fluorescencia corregida más alta y mostraron menores valores para los parámetros fotosintéticos.

El estado de los frutos de berenjena durante el período de post cosecha puede monitorearse de forma no destructiva a partir de la fluorescencia variable analizada con un fluorómetro de PAM.

Se presenta una contribución que respalda la afirmación de que la relación de fluorescencia corregida depende de la proporción relativa de los fotosistemas.

Se proporciona una segunda contribución a favor de la aseveración de que los parámetros fotosintéticos son también funciones de las condiciones de iluminación en las que se desarrollaron los cloroplastos.

El trabajo descrito en este capítulo dio lugar a la publicación: Variability in chlorophyll fluorescence spectra of eggplant fruit grown under different light environments: a case study Brian Ospina Calvo, Tamara L. Parapugna and M. Gabriela Lagorio The article was first published on 27 feb. 2017 Photochem. Photobiol. Sci., 2017,16, 711-720.

Capítulo 6

Efecto de la atrazina sobre los parámetros fotosintéticos del alga unicelular *Parachlorella kessleri*

6.1 Introducción

El uso de herbicidas para el control de malezas es cada vez mayor en la producción de alimentos, aunque el efecto de estos agroquímicos sea perjudicial para otras especies a quienes no va dirigido. En ecosistemas acuáticos se ha vuelto progresivamente más frecuente encontrar herbicidas provenientes de la agroindustria, los cuales tienen efectos sobre la biota.^{131,132} Estos llegan a los cuerpos de agua por su proximidad con los cultivos y por las aguas de escorrentía que los conducen hasta los ríos, lagos y fuentes hídricas subterráneas.^{133,134} Este proceso provoca que especies nativas como plantas acuáticas, y micro algas entre otras, se vean afectadas, generándose un detrimento en los productores primarios que son las especies más sensibles, y alterándose en consecuencia toda la estructura del ecosistema.¹³⁵ Además de ser afectadas las especies, las fuentes hídricas también quedan inhabilitadas para el uso doméstico.

En cultivos de canola, maíz, caña de azúcar entre otros, uno de los herbicidas más populares es la atrazina.¹³⁶ Este herbicida es moderadamente soluble en agua y débilmente absorbido por los suelos, lo cual facilita su llegada a fuentes hídricas.¹³⁷

En marzo del 2014 la unión europea prohibió el uso de atrazina debido a su alta toxicidad para la biota acuática.¹³⁸ En países como Argentina su uso es legal y se encuentra en la lista de herbicidas permitidos en la República de Argentina.¹³⁹ Se estima que se utilizan 15 millones de kg al año y se espera que su uso se incremente ya que en cultivos transgénicos (especialmente soja y maíz) la presencia de malezas resistentes al glifosato es cada vez mayor. Esto ha llevado a que se utilice excesivamente este tipo de herbicida y se encuentre hasta en el agua de lluvia.¹⁴⁰

Lamentablemente, su uso es tan popular que en Estados Unidos la atrazina es uno de los herbicidas más utilizados llegando a un consumo de 35 millones de kg año, a pesar de las restricciones que se han impuesto a su uso.¹⁴¹

La atrazina pertenece a los herbicidas inhibidores de la fotosíntesis, los que actúan bloqueando la cadena de transporte electrónico entre el PSII y el PSI, evitando la formación de NADPH y ATP, moléculas necesarias para la fijación de CO₂ y otros procesos bioquímicos de las algas y plantas.¹⁴² (Ver Figura 6.1)

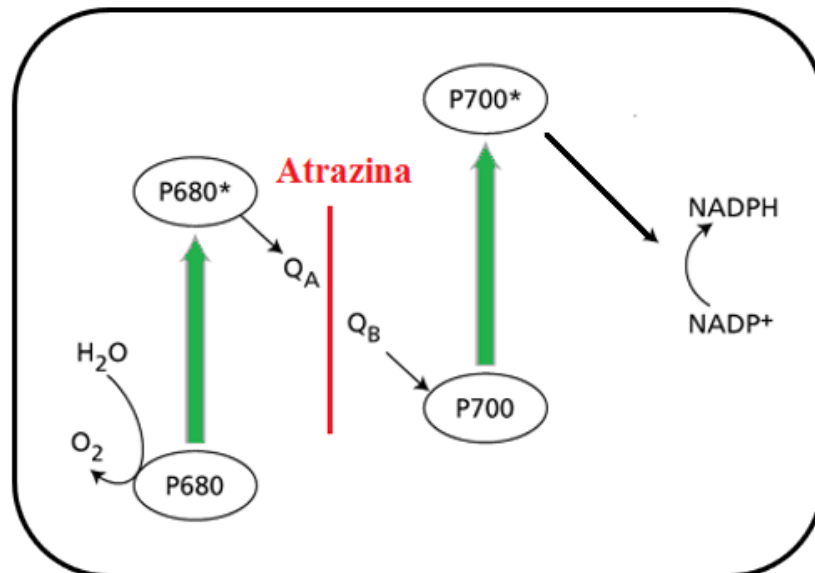


Figura 6.1 Punto de acción de la atrazina dentro de la cadena de transporte electrónico de la fotosíntesis.

Cuando las algas son expuestas a atrazina o a altas intensidades de radiación, el exceso de energía proveniente de la luz incrementa la formación de estado tripletes de la clorofila ($^3\text{Chl}^*$). Estos estados triple pueden conducir a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), en particular oxígeno singlete,¹⁴²⁻¹⁴⁵ y posteriormente dañar al complejo generador de oxígeno y los aceptores de electrones Q_A y/o Q_B dentro de la maquinaria fotosintética.¹⁴⁴

En este capítulo, nuestra hipótesis de partida es que, al verse el transporte electrónico afectado por la atrazina, habrá una repercusión sobre los valores de los parámetros fotosintéticos y sobre la distribución de la partición de energía global entre los procesos de fotosíntesis, fluorescencia y disipación de calor. Para esto se expusieron algas de *P. kessleri* a diferentes concentraciones de atrazina a través del tiempo y se realizó un análisis de fluorescencia exhaustivo.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Cepa y condiciones de cultivo

Las algas verdes unicelulares de agua dulce *Parachlorella kessleri* (*P. kessleri*), se obtuvieron de la colección de cultivos del laboratorio de biología de protistas perteneciente al Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los cultivos se desarrollaron, bajo condiciones anóxicas, en matraces Erlenmeyer de vidrio de 250 ml a partir de 150 ml de una solución de las células en medio de cultivo BBM (Bold's basal medium)¹⁴⁶, a $24\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ bajo agitación e iluminación continua ($80\text{ }\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). El pH se ajustó previamente a 6,3 antes de la esterilización.

Los cultivos madre se incubaron en un agitador orbital (130 rpm) hasta alcanzar una densidad de 30000 células/mL. Para el experimento se utilizaron células de cultivos de 96 h en la fase exponencial de su crecimiento.

6.2.2 Bioensayo de toxicidad

Las soluciones stock de atrazina se prepararon a partir de un formulado comercial (90WG granulado dispersable), el cual se disolvió en medio de cultivo BBM¹⁴⁶ para obtener una solución stock de 75 µg/mL. Se utilizaron 14 erlenmeyers con 150 mL de medio BBM, distribuidos en 6 concentraciones (130, 260, 520, 1040, 2080 y 4160 µg/L de atrazina) y un control con 2 réplicas para cada uno. Se inoculó en cada erlenmeyer con 15×10^6 de células totales y se incubó por 96 horas a $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ bajo agitación e iluminación continua ($80 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Luego del periodo de incubación se determinó el porcentaje de inhibición de cada concentración respecto al control, estimando el número de células en una cámara de Neubauer con un error menor o igual al 10%.

6.2.3 Aplicación de herbicidas

Las muestras celulares se expusieron durante 1 min, 1 hora y 6 horas a diferentes concentraciones de atrazina (260, 520 y 1040 µg/L⁻¹). La concentración inicial de células fue de 3×10^4 células/ mL. La exposición al herbicida se realizó durante la fase estacionaria del ciclo celular.

6.2.4 Preparación preliminar de la muestra para las mediciones de fluorescencia de la clorofila-a

Antes de realizar las mediciones de fluorescencia, las algas se adaptaron a la oscuridad por 20 min para alcanzar el estado basal de los procesos fotoquímicos¹⁴⁷. Se tomaron 30 mL de muestras de algas y se concentraron en un filtro de fibra de vidrio de

47 mm de diámetro (MG-F 0,7 μ m). Este método posibilita la formación de una capa uniforme de algas sobre el filtro, lo que permite obtener medidas reproducibles y adecuar la muestra al equipamiento de medición.

6.2.5 Fluorescencia variable de clorofila. Adquisición rápida de datos

Se utilizó un equipo de adquisición rápida de datos Handy-PEA Plant Efficiency Analyser Hansatech Ltd (King's Lynn, Norfolk, UK), el cual mide durante 1s la cinética rápida y polifásica de la fluorescencia de la clorofila-a. Las algas se irradiaron con una luz de 3000 μ mol fotones $m^{-2} s^{-1}$ de intensidad, lo que aseguró que el máximo de la banda P sea el máximo de fluorescencia de la clorofila (F_m). Además, se evaluaron los rendimientos de fluorescencia a 20 μ s ($F_{20\mu s}$), 300 μ s ($F_{300\mu s}$) y 2 ms (F_{2ms}) correspondientes a los diferentes puntos de inflexión de la curva OJIP.¹⁰⁴ (Ver Figura 6.2).

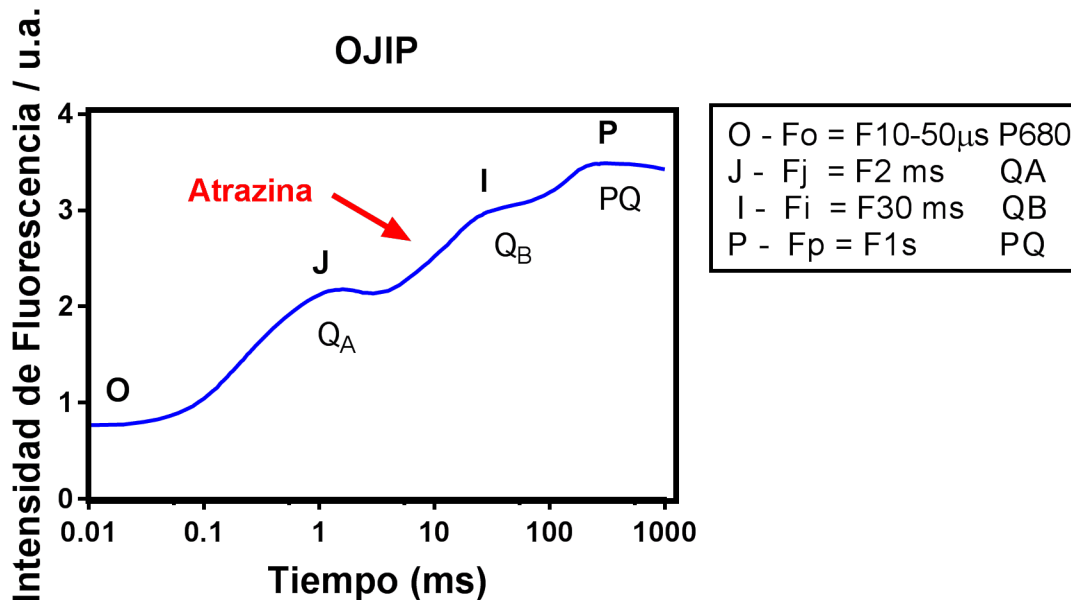


Figura 6.2 Curva OJIP de la fluorescencia de la clorofila-a. Con la flecha roja (\rightarrow) se muestra el punto de acción de la atrazina sobre la cadena de transporte electrónico.

6.2.5 Fluorescencia variable de clorofila. Cinética de Kautsky

Se realizó el análisis de los parámetros fotosintéticos a través de la cinética de Kautsky con un fluorómetro de clorofila de pulso de amplitud modulada PAM FMS1 Hansatech Ltd (King's Lynn, Norfolk, UK), con un haz de excitación de 594 nm que induce una señal pulsada de fluorescencia bajo ambientes donde la luz fue excluida. Este haz tiene un pulso modulado de $0,05 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con corta duración ($1,8 \mu\text{s}$) y con periodos largos de inactividad entre pulsos. Además, se utilizó un pulso de luz saturante de $5000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (duración de $0,4 \text{ s}$) y una luz actínica de $40 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

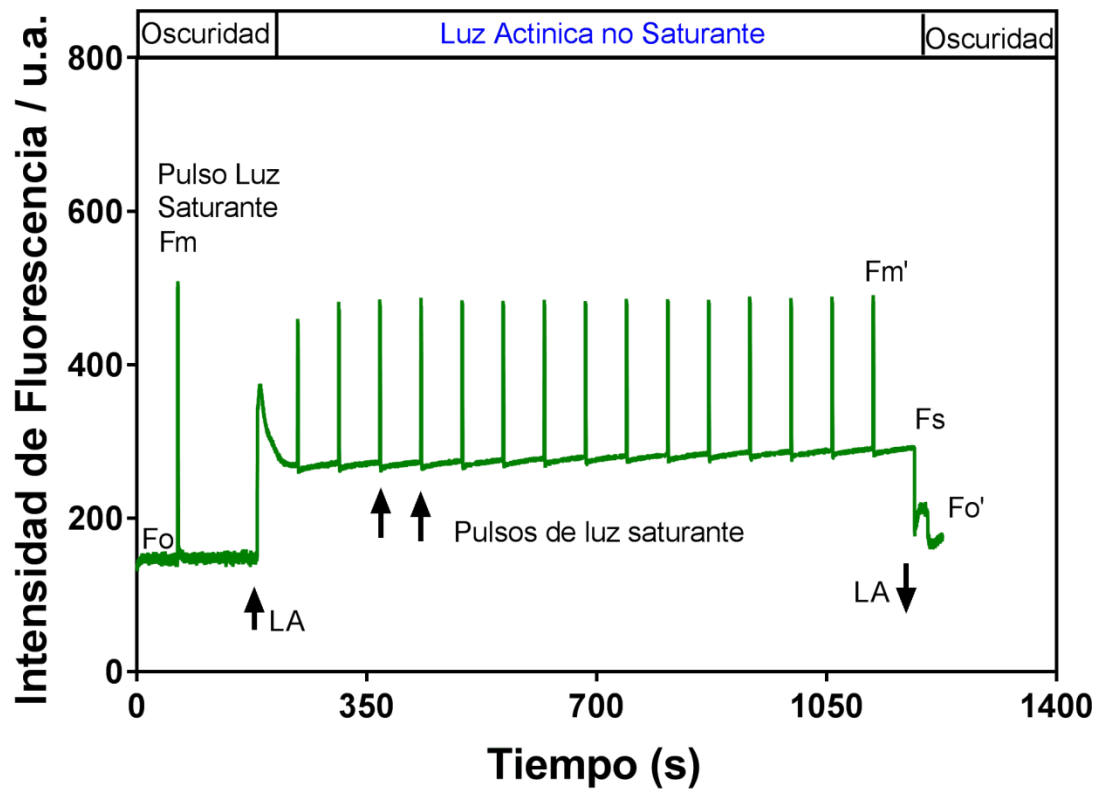


Figura 6.3 Esquema de la cinética de Kautsky para algas de *P. kessleri* adaptadas a la oscuridad.

Al inicio de los experimentos, se registró la señal mínima de fluorescencia (F_o) de las muestras adaptadas a la oscuridad con el haz modulado. A continuación, se aplicó un

pulso de luz saturante y se midió el máximo de fluorescencia (F_m). Posteriormente, las muestras fueron expuestas a luz actínica mientras se aplicaban pulsos de luz saturante con un minuto de diferencia. Luego de 10 min, al alcanzar el estado estable (F_s), se registró el máximo de fluorescencia de la muestra adaptada a la luz (F_m'). A posteriori, se apagó automáticamente la luz actínica y se aplicó un pulso con longitud de onda en el rojo lejano para determinar (F_o'). A partir de estas mediciones, se calcularon los parámetros: F_v'/F_m' , F_v'/F_o' , Φ_{PSII} , q_p , q_{NP} y NPQ .

6.2.6 Espectros de emisión de fluorescencia de la clorofila

Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron a temperatura ambiente con un fluorómetro Quanta Master Photon Technology International PTI (Brunswick, USA). Se excitaron las muestras a una longitud de onda de 460 nm, con un flujo irradiante de fotones incapaz de inducir los procesos fotosintéticos (flujo de fotones $< 20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Tanto la ranura de excitación como la de emisión se fijaron en 2 nm. Bajo estas condiciones, todos los aceptores de electrones en los centros de fotosíntesis se encontraban abiertos y la fluorescencia registrada se corresponde a la emisión de fluorescencia basal.

Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron en longitudes de onda que van desde 600 hasta 800 nm utilizando un espectrofotómetro de estado estacionario en geometría de cara frontal. La longitud de onda de excitación se ajustó a 460 nm, longitud de onda que condujo a la mayor intensidad del espectro de fluorescencia.

Para obtener los espectros de emisión, el material fotosintético se fijó en un filtro de fibra de vidrio y se adaptó a la oscuridad por 20 min. Luego de obtenerse los espectros, estos se corrigieron debido a la presencia de procesos de reabsorción de luz.¹¹ Las correcciones se realizaron siguiendo la ecuación 6.1, multiplicando los espectros experimentales por una función dependiente de la reflectancia y transmitancia de la muestra (ecuación 6.2).

$$I_f^c(\lambda) = I_f^e(\lambda)f \quad (6.1)$$

$$f = \frac{\ln^{-1}/(r_{\lambda_0+t_{\lambda_0}})+\ln^{-1}/(r_{\lambda+t_{\lambda}})}{\ln^{-1}/(r_{\lambda_0+t_{\lambda_0}})} \cdot \frac{1-r_{\lambda_0}-t_{\lambda_0}}{1-(r_{\lambda_0+t_{\lambda_0}})(r_{\lambda+t_{\lambda}})} \quad (6.2)$$

Con los espectros de emisión corregidos por reabsorción se calcularon las relaciones $F_{\text{red}}/F_{\text{far-red}}$ como el cociente entre la intensidad de emisión de la banda a 683 nm y la banda a 730 nm.

6.2.7 Espectros de reflectancia y transmitancia

Los espectros de reflectancia y transmitancia se registraron en un espectrofotómetro UV3101PC Shimadzu (Tokio, Japón) equipado con una esfera integradora ISR-3100 Shimadzu (Tokio, Japón). Como blanco de referencia estándar se utilizó Sulfato de Bario para ajustar el 100% del nivel de reflectancia. La reflectancia difusa (R_{λ}) se midió en función de la longitud de onda de 400 a 800 nm para los filtros que contenían las algas inmovilizadas. Adicionalmente, se midió la transmitancia difusa (T_{λ}) en las mismas longitudes de onda. Todas las mediciones se realizaron en condiciones de temperatura ambiente.

6.2.8 Análisis de datos y estadística

Se realizó un análisis de varianza one-way (ANOVA). Cuando las diferencias observadas fueron significativas (triplicado en muestras individuales de algas) se calcularon las desviaciones estándar y promedios para cada tratamiento.

6.3 Resultados y Discusión

6.3.1 Bioensayo de toxicidad

Los resultados del ensayo de biotoxicidad se muestran en la Figura 6.4.

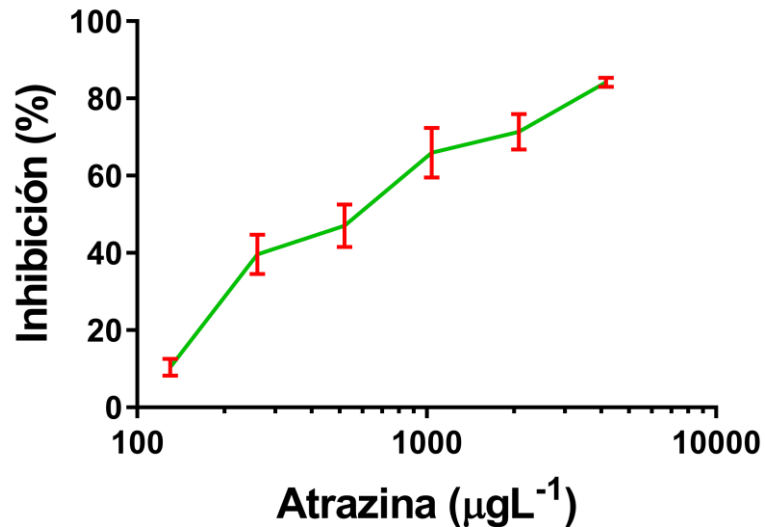


Figura 6.4 Porcentaje de inhibición vs concentración de atrazina para algas de *P. kessleri* expuesta a diferentes concentraciones de atrazina (130, 260, 520, 1040, 2080 y 4160 μgL^{-1}) por 96 horas.

El porcentaje de inhibición de las algas *P. kessleri* aumento junto con la concentración de atrazina aplicada, siendo 520 μgL^{-1} de atrazina, la concentración más próxima a inhibir la mitad del crecimiento de *P. Kessleri*. Por lo tanto, para los ensayos subsiguientes se eligieron concentraciones de atrazina que pudieran generar cambios en el aparato fotosintético (260, 520, 1040 y 2080 μgL^{-1}).

6.3.2 Cinética de Kautsky

Los registros de la cinética de Kautsky para el alga *P. kessleri* a distintas concentraciones de atrazina se presentan en las Figuras 6.5 a 6.7. Los experimentos mostrados en estas figuras se diferencian en el tiempo de exposición del alga a la atrazina. Estos tiempos fueron: 1, 60 y 360 minutos y corresponden a las Figuras 6.5, 6.6 y 6.7 respectivamente.

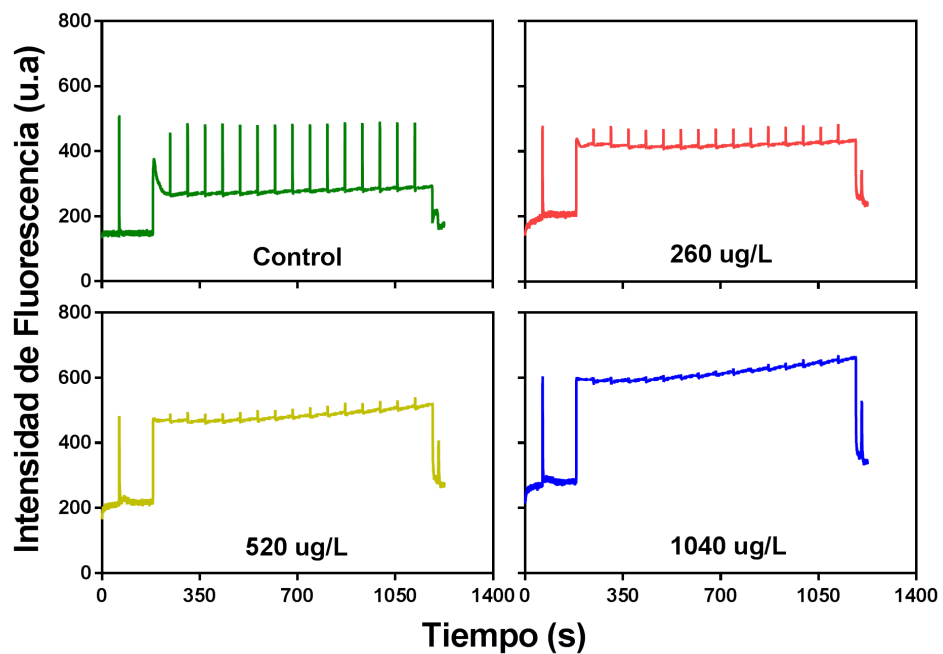


Figura 6.5 Cinética de Kautsky de *P. kessleri* después de ser expuesta a diferentes concentraciones de atrazina durante 1 minuto.

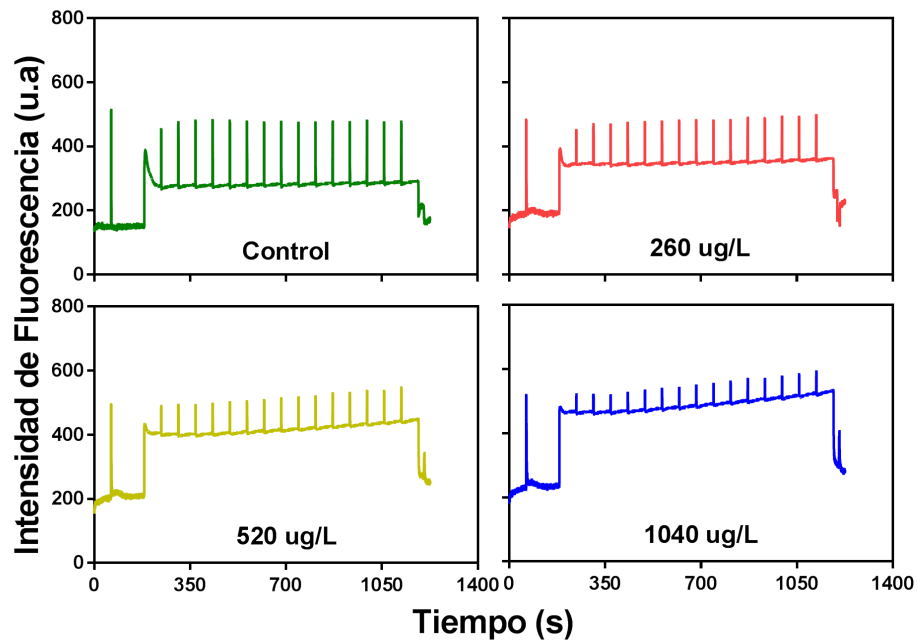


Figura 6.6 Cinética de Kautsky de *P. kessleri* después de ser expuesta a diferentes concentraciones de atrazina durante 60 minutos.

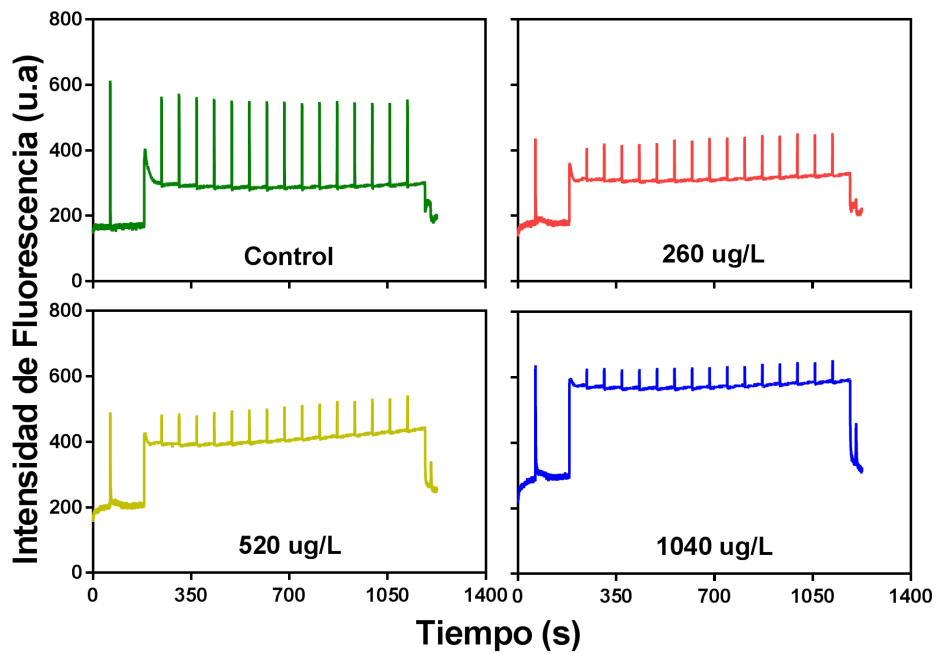


Figura 6.7 Cinética de Kautsky de *P. kessleri* después de ser expuesta a diferentes concentraciones de atrazina durante 360 minutos.

Luego de exponer 1 minuto a atrazina con una concentración de $260 \mu\text{gL}^{-1}$, la respuesta de fluorescencia de la cinética de Kautsky en *P. kessleri* se modificó considerablemente con respecto del control. Este mismo efecto se manifestó a concentraciones de 520 y $1040 \mu\text{gL}^{-1}$ (Figura 6.5) mostrando un aumento en valores de F_s . Este incremento resultó proporcional a la concentración de atrazina utilizada, hasta igualar en intensidad a los valores de F_m . Este comportamiento es debido a que el transporte electrónico del PSII está inhibido por las interacciones de la atrazina con la proteína D1, afectando los procesos fotoquímicos primarios y modificando la fluorescencia de la clorofila-a asociada a la actividad del PSII.¹⁴⁸

Al transcurrir 60 min se observa también el bloqueo parcial del transporte de electrones al comparar las muestras tratadas con atrazina con las muestras control. Sin embargo, en este caso, para todas las concentraciones de atrazina el transporte electrónico a través del PSII aumentó (Figura 6.6) con respecto al resultado obtenido para 1 minuto de exposición (Figura 6.5). En efecto, los valores menores de F_s observados para 60 minutos en las muestras tratadas con atrazina dan el indicio de una ligera recuperación de la transferencia electrónica. Finalmente, al transcurrir 360 min los valores de F_s mostraron una variación mínima con respecto a los valores a 60 min, indicando que no se produjeron alteraciones significativas adicionales (Figura 6.7).

Esto indica un incremento en la desactivación de especies excitadas por la vía del decaimiento fotofísico (Φ_C), (Figura 6.8) provocado por la inhibición de la donación de electrones a través del PSII.

6.3.3 Parámetros Fotosintéticos

La evolución de los parámetros fotosintéticos derivados de la Cinética de Kautsky a distintas concentraciones de atrazina se muestran en la Figura 6.8. a 6.10.

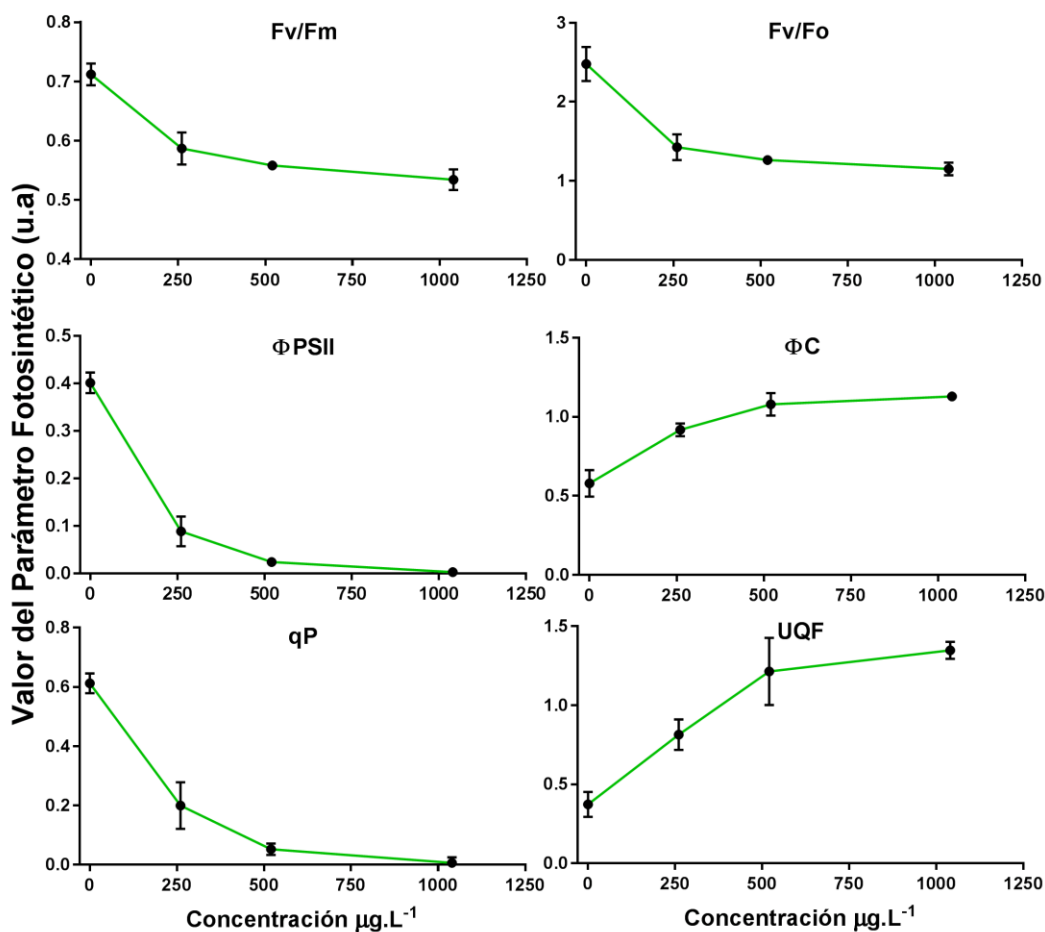


Figura 6.8 Parámetros fotosintéticos calculados a partir de la cinética de Kautsky para las algas de *P. kessleri* expuestas durante 1 min a diferentes concentraciones de atrazina (260, 520 y 1040 µg.L⁻¹). Fv/Fm: Máximo rendimiento cuántico fotoquímico del PSII cuando es adaptado a la oscuridad; Fv/Fo: Máximo rendimiento cuántico fotoquímico del PSII; ΦC: Rendimiento cuántico del decaimiento fotofísico; ΦPSII: Rendimiento cuántico del PSII; qP: quenching fotoquímico; UQF: Fluorescencia relativa no quenchada.

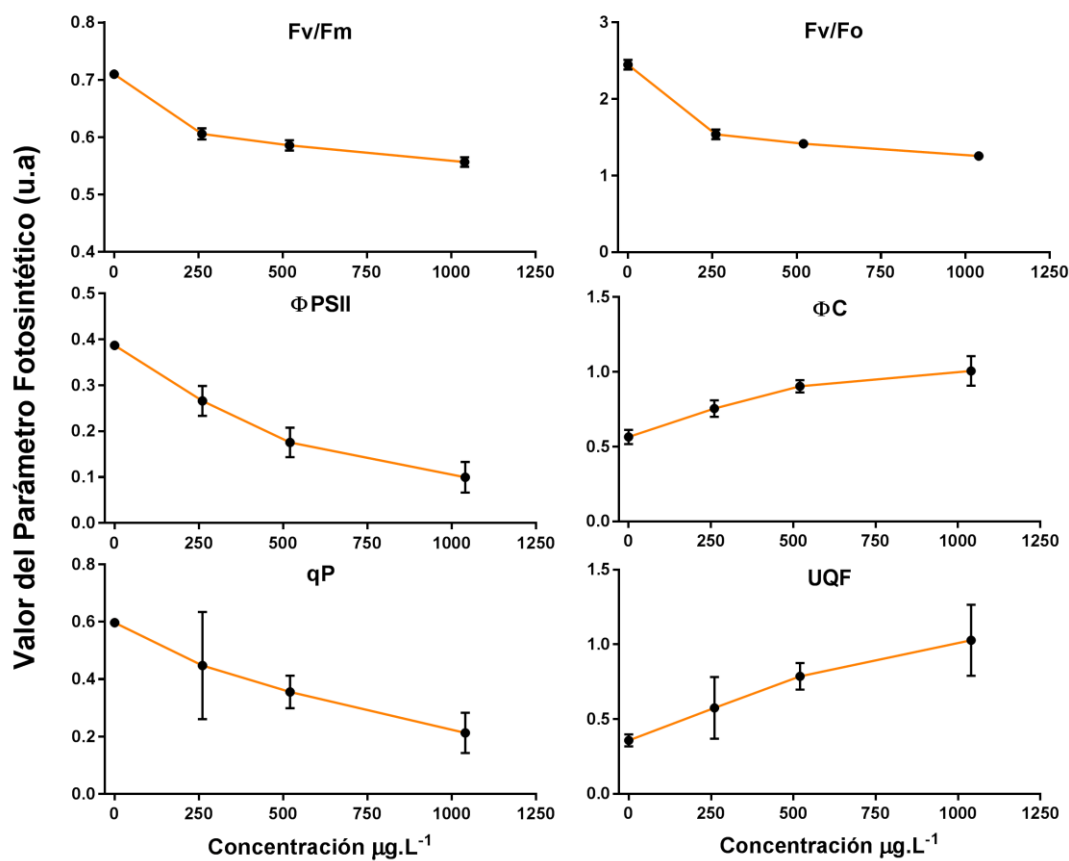


Figura 6.9 Parámetros fotosintéticos calculados a partir de la cinética de Kautsky para las algas de *P. kessleri* expuestas durante 60 min a diferentes concentraciones de atrazina (260, 520 y 1040 µg L⁻¹). Fv/Fm: Máximo rendimiento cuántico fotoquímico del PSII cuando es adaptado a la oscuridad; Fv/Fo: Máximo rendimiento cuántico fotoquímico del PSII; ΦC: Rendimiento cuántico del decaimiento foto físico; ΦPSII: Rendimiento cuántico del PSII; qP: quenching fotoquímico; UQF: Fluorescencia relativa no quencheada.

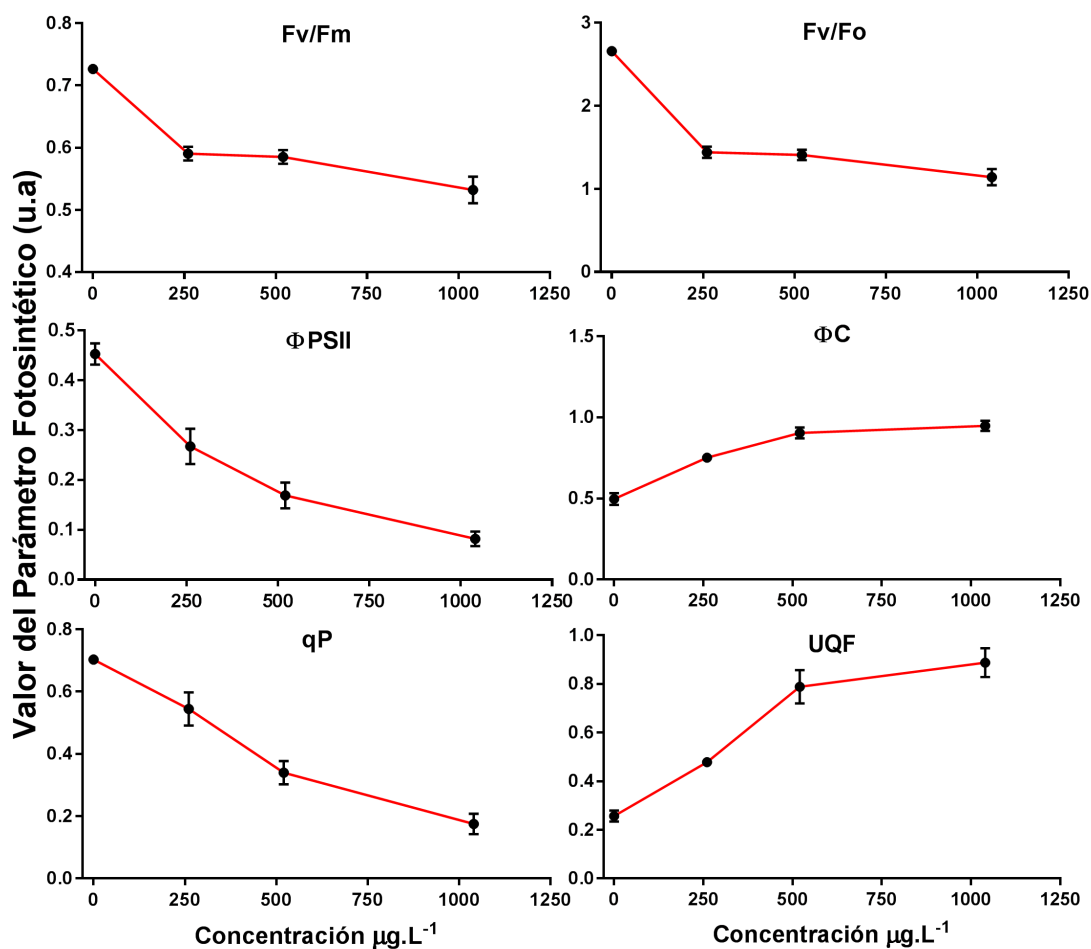


Figura 6.10 Parámetros fotosintéticos calculados a partir de la cinética de Kautsky para las algas de *P. kessleri* expuestas durante 360 min a diferentes concentraciones de atrazina (260, 520 y 1040 µg L⁻¹). Fv/Fm: Máximo rendimiento cuántico fotoquímico del PSII cuando es adaptado a la oscuridad; Fv/Fo: Máximo rendimiento cuántico fotoquímico del PSII; ΦC: Rendimiento cuántico del decaimiento foto físico; ΦPSII: Rendimiento cuántico del PSII; qP: quenching fotoquímico; UQF: Fluorescencia relativa no quencheada.

Los parámetros Fv/Fm, Fv/Fo, ΦPSII, y qP decrecieron en presencia de atrazina. El ΦPSII presentó mayor sensibilidad que los otros parámetros frente a las diferentes concentraciones del herbicida. Por otro lado, los parámetros ΦC y UQF se vieron incrementados en magnitud, resultando ΦC más reproducible que UQF.

Una tendencia decreciente del rendimiento máximo de fotosíntesis (F_v/F_m) en función de la concentración creciente de atrazina, puede deberse a la inhibición del complejo productor de oxígeno en el PSII¹⁴⁹. Sin embargo, el efecto observado en este parámetro es menor que el registrado para el Φ_{PSII} y Φ_C , ya que estos últimos parámetros están íntimamente vinculados a la transferencia de carga desde el PSII^{150,151}. Cuando decrecen el Φ_{PSII} y el F_v/F_m simultáneamente, la fotoinhibición es crónica y los mecanismos son poco eficientes debido a la sobrecarga de excitación de energía.¹⁵²

Los valores de los parámetros Φ_C y UQF mostraron un incremento con tendencia a alcanzar un plateau mientras que los valores de F_v/F_m , F_v/F_o , Φ_{PSII} y qP decrecieron exponencialmente con el aumento de concentración de atrazina.

Los únicos parámetros que no presentaron diferencias significativas con respecto al control fueron qP y UQF, para una concentración de atrazina de $260 \mu\text{gL}^{-1}$, para un tiempo de exposición de 60 min.

En la Figura 6.11 puede observarse el reparto de energía en forma comparativa a los distintos tiempos.

Se observa que el bloqueo a nivel del transporte electrónico en la cadena fotosintética producido por la atrazina provoca que la energía absorbida por las algas se disipe mayoritariamente por procesos fotofísicos que incluyen a la fluorescencia (Φ_C).

Se registra una disminución muy acentuada del (Φ_{PSII}) al aumentar la concentración de atrazina, especialmente a 1 minuto de exposición. A pesar que a tiempos largos se esperaría un mayor daño al aparato fotosintético, ocurre una ligera recuperación respecto a tiempos cortos de exposición.

Por otro lado, es singular la bajísima contribución de los procesos de disipación de calor por quenching no fotoquímico en las algas en comparación con hojas de plantas (Capítulos 3 y 4) y frutos (Capítulo 5). Ante la exposición a atrazina, el (Φ_{PSII}) se torna prácticamente nulo para todas las concentraciones del herbicida.

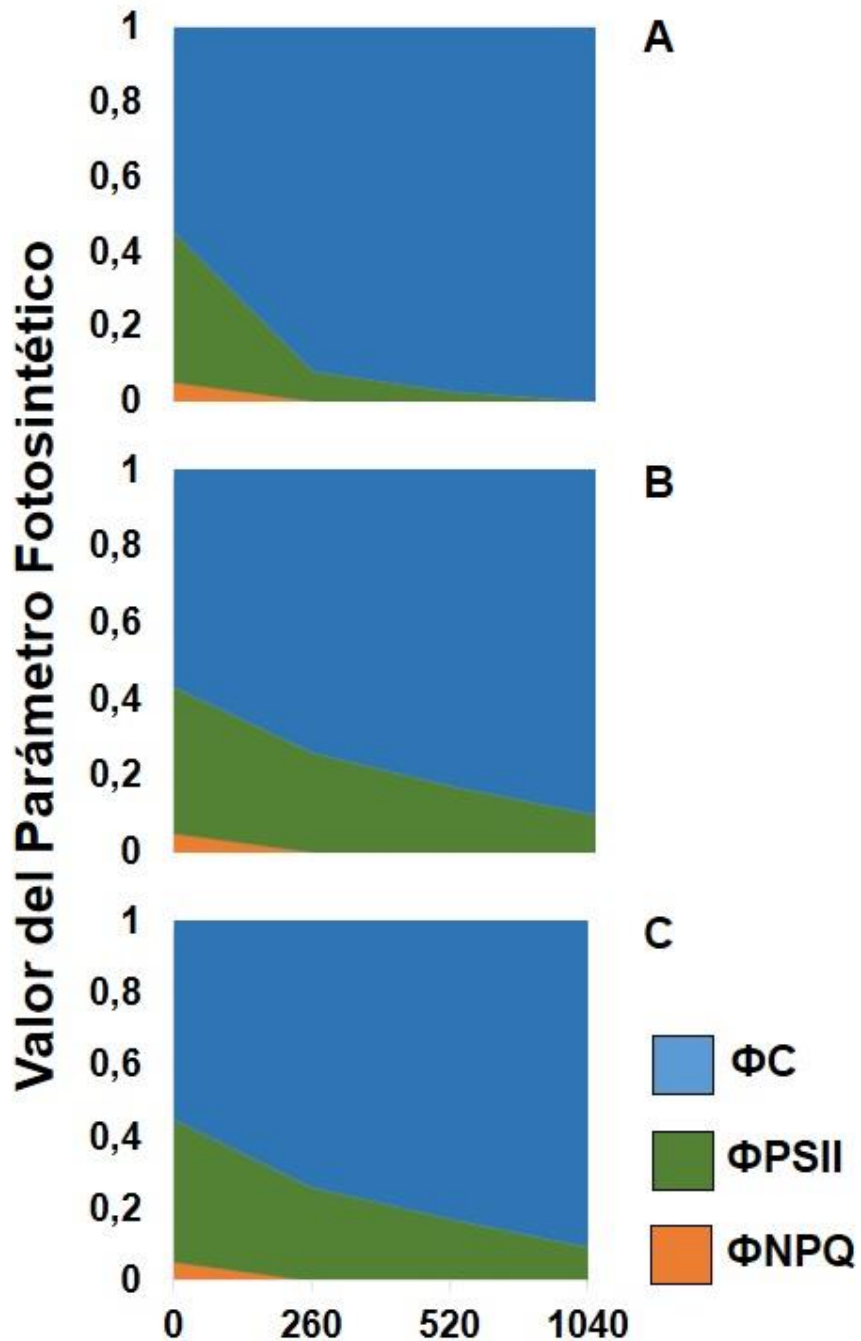


Figura 6.11 Partición de energía para los rendimientos cuánticos del fotosistema II (ΦPSII), quenching no fotoquímico (ΦNPQ) y decaimiento fotofísico (ΦC) para las algas de *P. kessleri* a distintos tiempos. A) 1 min. B) 1 hora y C) 6 horas. Para cada tiempo de exposición se trataron las algas con tres concentraciones de atrazina diferentes. (260, 520 y 1040 $\mu\text{g L}^{-1}$).

6.3.4 Cinética Rápida OJIP

Los registros de la porción rápida de la cinética de Kautsky (OJIP) para las algas control y las expuestas a atrazina se muestran en la Figura 6.12.

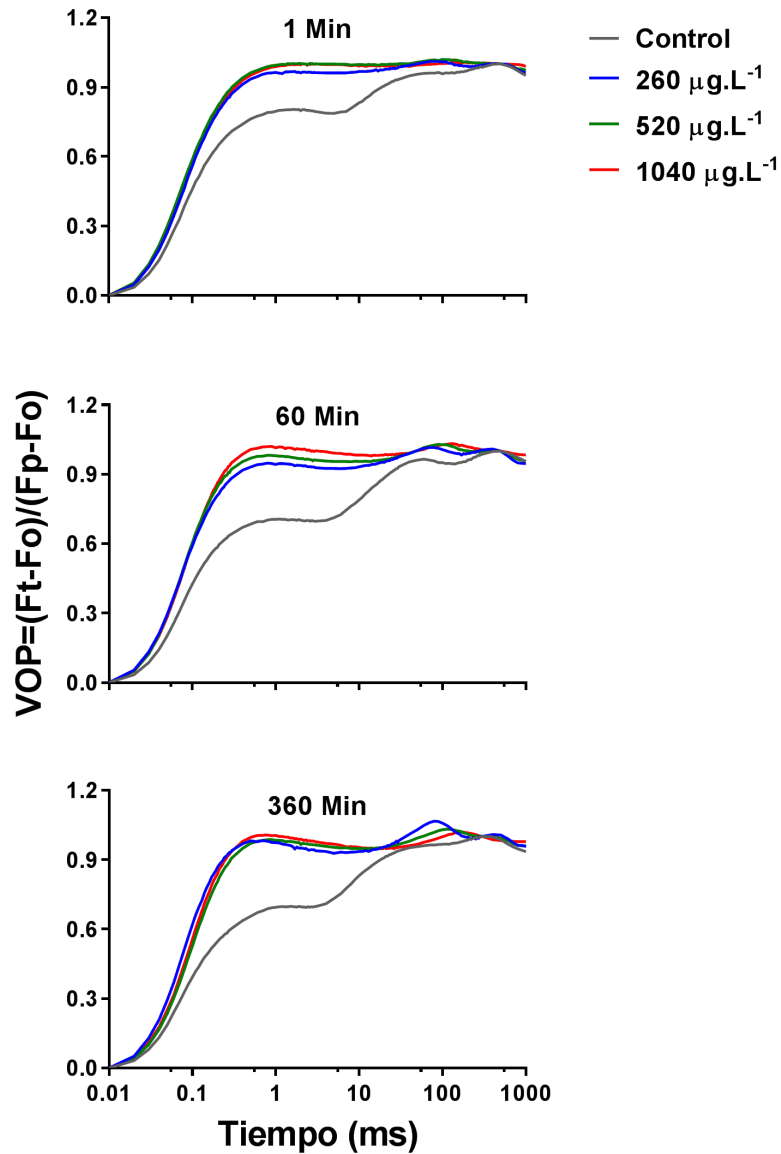


Figura 6.12 Curva OJIP de la fluorescencia de la clorofila normalizada en el origen y en el pico máximo para algas de *P. kessleri* después de ser expuestas a diferentes concentraciones de atrazina (260, 520 y 1040 $\mu\text{g.L}^{-1}$) por 1, 60 y 360 min.

El incremento de la fluorescencia en el transiente J presente en las cinéticas registradas para las algas de *P. kessleri* expuestas al herbicida (260, 520 y 1040 μgL^{-1} de Atrazina), puede interpretarse como un indicador de la inhibición del transporte electrónico en el lado aceptor del PSII. Por lo tanto este incremento nos refleja una acumulación inducida por la luz de plastoquinona A (Q_A^-), mientras las plastoquinonas B (Q_B) permanecen en un estado oxidado en todos los tiempos de tratamiento (1, 60 y 360 min).¹⁵³

Como se mencionó anteriormente, la atrazina interrumpe el transporte electrónico del PSII por la interacción que tiene el herbicida con la proteína D1, afectando al aceptor primario en la cadena de transporte electrónico del PSII¹⁵⁴. La alteración de la función de la proteína D1 conduce a la modificación de la fluorescencia de la clorofila asociada a la actividad del PSII, provocando un aumento de la intensidad del transiente J que sirve como indicador de la inhibición del transporte electrónico del PSII.^{104,155} Este efecto se observa claramente cuando las algas de *P. kessleri* entran en contacto con 260 μgL^{-1} de atrazina, ya que la intensidad del transiente J se incrementa mostrando la inhibición del transporte electrónico en el lado aceptor del PSII. Cuando las concentraciones de atrazina son mayores a 260 μgL^{-1} el incremento del transiente J es el mismo, lo que sugiere que este transiente es muy sensible y se satura con bajas concentraciones del herbicida.

6.3.5 Relación $F_{\text{red}}/F_{\text{far-red}}$

Las relaciones de fluorescencia $F_{\text{red}}/F_{\text{far-red}}$ obtenidas para cada concentración de atrazina en función del tiempo de exposición se muestran en las Figuras 6.13 a 6.15.

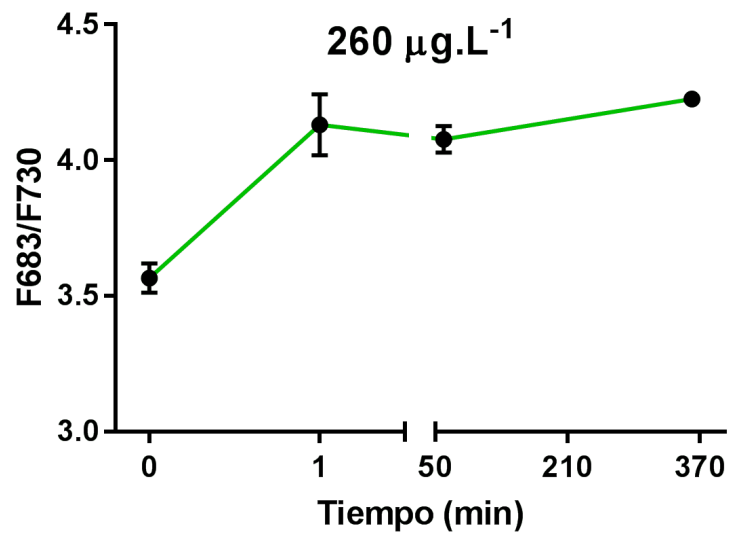


Figura 6.13 Relación de bandas de los espectros de fluorescencia basal (F_o) de clorofila-a (F_{683}/F_{730}) para *P. kessleri* tratada con $260 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina en función del tiempo. La relación está calculada sobre espectros corregidos por procesos de re-absorción de luz.

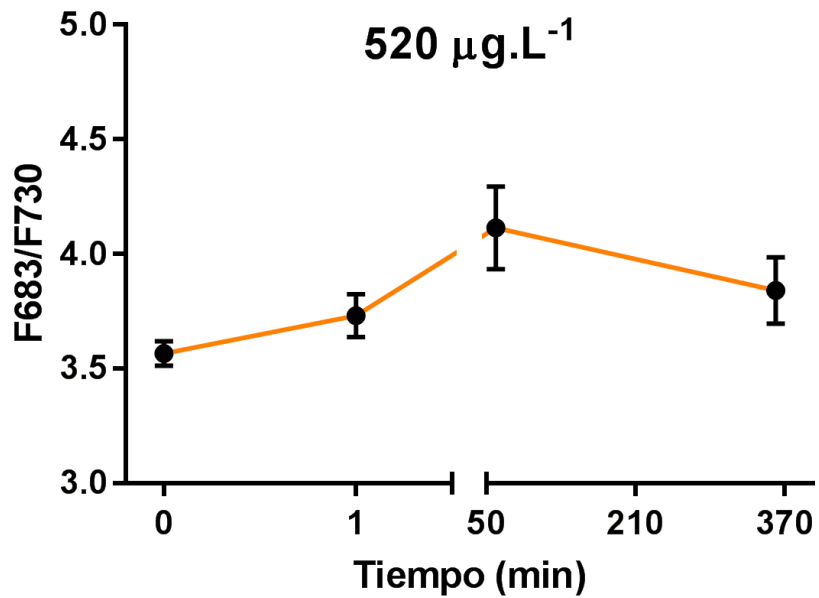


Figura 6.14 Relación de bandas de los espectros de fluorescencia basal (F_o) de clorofila-a (F_{683}/F_{730}) para *P. kessleri* tratada con $520 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina en función del tiempo. La relación está calculada sobre espectros corregidos por procesos de re-absorción de luz.

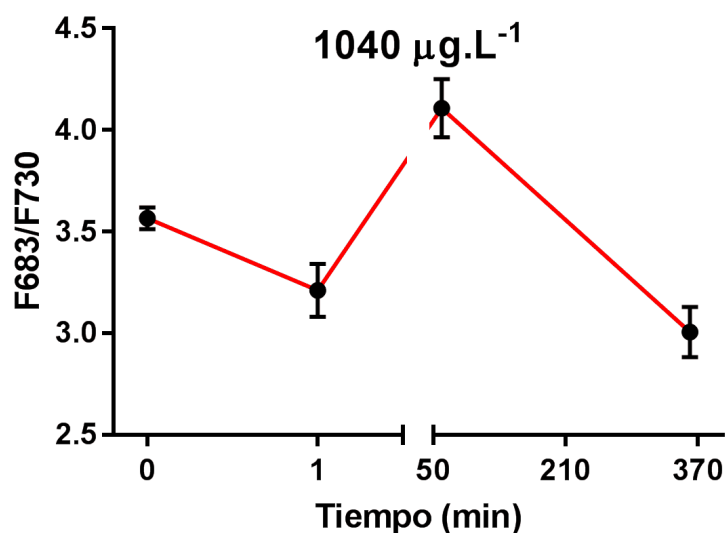


Figura 6.15 Relación de bandas de los espectros de fluorescencia basal (F_o) de clorofila-a (F_{683}/F_{730}) para *P. kessleri* tratada con $1040 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina en función del tiempo. La relación está calculada sobre espectros corregidos por procesos de re-absorción de luz.

Las relaciones $F_{\text{red}}/F_{\text{far-red}}$ exhibidas ya cuentan con las respectivas correcciones por reabsorción de luz en las bandas de 683 nm (emisión del PSII) y en la banda 730 nm (emisión de ambos fotosistemas).

La fluorescencia de la clorofila espectral F_o de *P. kessleri* mostró dos bandas: una en 683 nm y otra en 730 nm, las que fueron corregidas por procesos de reabsorción de luz que afectan principalmente la banda de 683 nm cuya emisión es generada por el PSII^{109,156}.

El análisis de la fluorescencia del rojo y del rojo lejano confirma que cuando las algas cuando son expuestas a herbicidas inhibidores del PSII hay un incremento en la emisión del PSII relativa a la emisión del PSI. Esto se manifiesta con un mayor incremento de la banda de 683 nm (rojo), debida a PSII que en la banda a 730 nm (rojo lejano) correspondiente a la emisión del PSII + PSI.

Variaciones de la relación $F_{683/730}$ usualmente resultan indicativas de alteraciones tempranas en el funcionamiento del aparato fotosintético. Se observó que la atrazina

incrementa la relación $F_{683/730}$, en hojas¹⁰⁹, lo que puede ser atribuido a la inhibición del transporte fotosintético en la reducción del lado del PSII, lo que previene la reducción de NADP^+ requerida para la fijación de CO_2 además de una acumulación de especies reducidas de Q_A^{-157} .

6.4 Conclusiones del Capítulo 6

Las técnicas fluorométricas usadas en este estudio permiten realizar un análisis rápido, de alta sensibilidad y baja contaminación para estudios de ecotoxicidad acuática con equipamiento portátil, donde se puede monitorear la presencia de atrazina en sistemas algares.

Los resultados de este estudio muestran que las algas de *P. kessleri* son sensibles a la atrazina, generando cambios tanto en la cinética de la fluorescencia variable de clorofila como en la distribución espectral de la fluorescencia inicial (F_0). Tanto los parámetros fotosintéticos, F_v/F_m , F_v/F_0 , Φ_C , Φ_{PSII} , qP y UQF como en la relación F_{683}/F_{730} mostraron cambios significativos y podrían ser utilizados como indicadores de ecotoxicidad debida a presencia atrazina. Los cambios en los parámetros, además de estar sujetos a la concentración también lo están con respecto al tiempo de exposición de las algas al contaminante, siendo mayores, algo sorpresivamente, cuando el tiempo de exposición es de 1 min. Al transcurrir 360 min estos cambios disminuyen, pero todavía se pueden observar alteraciones del transporte electrónico del PSII aunque éstas no son tan pronunciadas.

En este estudio pudo demostrarse que en algas de *P. kessleri* el uso de atrazina como un inhibidor del PSII, afecta el flujo de electrones de la cadena de transporte electrónico de la fotosíntesis para concentraciones mayores de $260 \mu\text{gL}^{-1}$.

El proceso de quenching no fotoquímico, que de por sí es poco importante en algas control, se vuelve nulo en presencia de atrazina.

Capítulo 7

Conclusiones Generales

Los experimentos desarrollados en este trabajo permitieron cumplir con el objetivo general planteado inicialmente. Así, se obtuvo información relevante sobre los procesos de absorción y distribución de la energía durante las primeras etapas de la fotosíntesis en diversos sistemas naturales.

La fluorescencia de la clorofila, tanto analizada en forma estacionaria en función de la longitud de onda (distribución espectral de F_0) como en su forma variable en función del tiempo (cinética de Kautsky), está vinculada con el proceso de fotosíntesis y el funcionamiento operativo del PSII y es por ello una herramienta fundamental para la evaluación no destructiva de material fotosintético. En esta tesis se llevaron a cabo distintos experimentos donde se pusieron a punto y se aplicaron las diversas metodologías de análisis de fluorescencia a tres tipos de organismos fotosintéticos: plantas, frutos y algas.

En el Capítulo 3 de esta tesis se estudiaron los efectos sobre la fotosíntesis de la variación de pigmentos presentes en hojas de plantas de la misma especie, pero de diferente variedad. Esto es importante porque permitió analizar cómo la mayor concentración de un pigmento altera la administración de la energía dentro de una planta y le puede brindar mayor resistencia frente algún tipo de estrés, como fue la limitación de riego en el caso estudiado. En particular, se concluyó que la variedad rica en antocianinas

sintetizó menor proporción de clorofila a/b, menor concentración de carotenoides y presentó mayor resistencia ante la sequía. Adicionalmente, ante las mismas condiciones ambientales, la planta roja disipó una menor fracción de energía como calor y destinó una mayor fracción a la fotosíntesis. Se interpretó que la protección brindada por las antocianinas, debida a su acción como filtro solar y antioxidante, hace que el vegetal funcione con una reserva más pequeña de xantofilas y no requiera una gran disipación de calor por quenching no fotoquímico como mecanismo protector frente a un aumento de la intensidad de luz.

En el Capítulo 4, se trabajó con plantas que tenían diferentes mecanismos de asimilación de carbono y se analizaron tanto las diferencias de los parámetros fotosintéticos, como el comportamiento de estos parámetros frente al estrés hídrico. Esto es relevante ya que el mecanismo de fijación de carbono atribuye a las plantas características de resistencia o no a ciertos ambientes climáticos y su relación con la fluorescencia permitió correlacionar varios parámetros fotosintéticos con algún mecanismo de fijación de CO₂. También se apreció cómo diferentes metabolismos de fijación de carbono tienen diferencias en la partición de energía. En particular, se concluyó que la planta CAM disipa una menor fracción como calor por el proceso de quenching no fotoquímico y se pudo evaluar cuantitativamente su resistencia a la sequía mediante los valores sostenidamente elevados de su rendimiento cuántico máximo de fotosíntesis y de PSII.

En el Capítulo 5 se clarificó, como punto teórico importante, la dependencia del cociente de fluorescencia de la calidad de la luz bajo la cual creció el material fotosintético. Para ello, se comparó la fluorescencia de la clorofila-a de cloroplastos crecidos bajo diferentes distribuciones espectrales de luz. Lo interesante de este experimento fue concluir que esas diferentes calidades de luz alteraban la distribución espectral de la fluorescencia de la clorofila-a. Se pudo mostrar claramente que la relación de picos observada en el espectro de fluorescencia de clorofila basal (F_o), corregido por los procesos de reabsorción de luz, depende de la estequiometría de los fotosistemas. Así, cuando el cloroplasto recibió durante su crecimiento luz rica en el rojo lejano, se vio favorecida la absorción del PSI y el material debió sintetizar más PSII y/o su antena para

balancear la fotosíntesis. Como consecuencia, en ese caso, aumentó la relación de picos rojo/ rojo lejano en el espectro de fluorescencia. Adicionalmente y como punto aplicado relevante, se presentó una metodología para monitorear el estado de berenjenas intactas durante el período post cosecha en una forma no destructiva y rápida.

Por último, en el Capítulo 6 se estudió el efecto del herbicida atrazina que bloquea el transporte electrónico entre el PSII y el PSI en algas de *Parachlorella kessleri*. Este experimento facilitó el análisis del comportamiento de los parámetros fotosintéticos cuando una de las vías de desactivación de especies excitadas de clorofila está interrumpida. Se apreció que la presencia de atrazina genera cambios en la distribución de fluorescencia espectral y variable. Se pudo concluir que las técnicas fluorométricas utilizadas permiten un análisis rápido, de alta sensibilidad y baja contaminación para estudios de ecotoxicidad acuática en sistemas algares.

Como se mostró en esta tesis, la estimación de la fotosíntesis mediante la medida de los fotones emitidos puede usarse en la evaluación de la contaminación ambiental, el diagnóstico de la salud de plantas y la optimización de las condiciones de crecimiento de vegetales con aplicación relevante en la producción de alimentos y monitoreo del medio ambiente.

Lista de acrónimos y abreviaturas

¹Chl*: estado singlete de clorofila.

³Chl*: estados triplete de Chl.

A₀: Molécula de Clorofila-a especial.

A₁: Vitamina K₁.

ABS / RC: Flujo de absorción (de la Chl de la antena) por RC (también una medida del tamaño de la antena del PSII).

ABS: flujo de energía absorbida.

Anth: Antocianinas.

Área: Área complementaria total entre la curva de inducción de fluorescencia.

b_{6f}: complejo citocromo.

BBM: Bold's basal médium.

BSC: células del haz vascular.

Car: Carotenos.

Chl: Clorofila.

Chla: Clorofila-a

Chlb: Clorofila-b

Cytb₆: Citocromob₆;

Cytf: Citocromo *f*.

EC/RC: Una medida del total de transportadores de electrones por RC.

ET: transporte electrónico.

ET₀ / RC: Flujo de transporte electrónico (más allá de Q_A⁻) por RC.

F(R): función de remisión.

F₀: Fluorescencia Mínima, cuando todos los RCs están abiertos.

F_{20μs}: Primera fluorescencia registrada fiable a 20 μs.

F_{300μs}: Intensidad de fluorescencia a F_{300μs}.

F_A/F_B: centros Hierro-Azufre.

F_d: Ferredoxina.

F_{eS}: Proteína Hierro-Azufre (Proteína Rieske FeS).

F_{far-red}: máximo de fluorescencia del espectro de emisión de hojas alrededor de 735 nm.

F_I: Intensidad de fluorescencia en el paso I (30 ms) de la curva OJIP.

F_J: Intensidad de Fluorescencia a el paso J (2 ms) de la curva OJIP.

F_m: Máxima fluorescencia de la clorofila-a causada por la aplicación de un pulso de luz saturante sobre material fotosintético previamente adaptado a la oscuridad.

F_m': Máxima fluorescencia de la clorofila-a causada por la aplicación de un pulso de luz saturante sobre material fotosintético adaptado a la luz.

F_o: Fluorescencia de la clorofila-a basal medida en condiciones de adaptación a la oscuridad.

F_P: Máxima intensidad de fluorescencia registrada, en el pico P de la curva OJIP.

F_{red}/F_{far-red}: relación de máximos de intensidad de fluorescencia, se utiliza F_{red}/F_{far-red} como una generalidad porque los máximos de fluorescencia no aparecen siempre en posiciones fijas. Se utiliza red y far-red en lugar de rojo y rojo lejano debido a que es ampliamente difundido en literatura de esta manera.

F_{red}: máximo de fluorescencia del espectro de emisión de hojas alrededor de 685 nm.

F_t: Fluorescencia a tiempo t después del encendido de la luz actínica.

F_v'/F_o': relación entre la fluorescencia variable y la basal en el estado adaptado a la luz.

F_v: Máxima fluorescencia variable.

IC: conversión interna.

ISC: cruce entre sistemas.

k: coeficiente de absorción de las hojas.

k_N: Constante de velocidad de desexcitación no fotoquímica.

LA: luz actínica no saturante.

LHC: complejo antena (en inglés *light harvesting complex*).

LS: luz saturante.

M₀: Pendiente inicial aproximada (en ms⁻¹) del trasiente de fluorescencia normalizado en el máximo de fluorescencia variable F_v.

MFC: metabolismo de fijación de carbono.

ML: Pulso de luz modulada.

Mn₄O_xCa: complejo de Magnesio-Oxígeno-Calcio.

NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NPQ: quenching no fotoquímico.

P680*: Estado electrónico excitado de P680.

P700*: Estado excitado del P700.

P700: Donor de electrones primario del PSI.

PAM: pulso de amplitud modulado.

PC: Plastocianina.

PCA: análisis de componentes principales.

PCR: ciclo fotosintético de reducción de carbono.

PEP: enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.

PGA: moléculas de fosfoglicerato.

Pheo: Feofitina.

PQ: Pool de moléculas móviles de plastoquinonas.

PSI: fotosistema I.

PSII/PSI: relación de fotosistemas, cantidad de fotosistema II respecto del fotosistema I.

PSII: fotosistema II.

Q_A: Plastoquinona aceptor de un electrón.

Q_B: Plastoquinona aceptor de dos electrones.

qE: componente del quenching no fotoquímico dependiente de la energía.

qI: componente del quenching no fotoquímico relacionado con el proceso de fotoinhibición.

qP: quenching fotoquímico.

qT: componente del quenching no fotoquímico relacionado con un estado de transición.

R: fracción de luz reflejada por las hojas, reflectancia.

r: reflectancia correspondiente a una sola hoja.

R_∞: fracción de luz reflejada por un colchón de hojas, reflectancia infinita de las hojas (transmitancia de las hojas nula).

RC: centro de reacción.

r_{corr}: anisotropía de fluorescencia corregida por el factor de sensibilidad del sistema de detección (G).

RE: ultimo aceptor de electrones reducido en el lado aceptor en el PSI.

RE₀ / RC: Flujo de electrones que reducen el ultimo aceptor, en el lado aceptor del PSI por RC.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

Rubisco: enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/ oxigenasa.

RuBP: sustrato ribulosa-1,5-bifosfato.

s: coeficiente de dispersión de las hojas.

Sm: Área normalizada.

T: fracción de luz transmitida por las hojas, transmitancia.

t: transmitancia correspondiente a una sola hoja.

t_{FM}: Tiempo (en ms) para alcanzar la máxima intensidad de fluorescencia F_M.

TR₀ / RC: Flujo de energía atrapada (conducido a la reducción Q_A) por RC.

Tyr: Tirosina-161 en la proteína D1.

UQF: Fluorescencia relativa no quencheada.

VAZ: ciclo de las xantófilas (Violazantina, Anterazantina y Zeaxantina).

VDE: Violazantina deepoxidasa.

V_I: Fluorescencia variable en el paso I.

V_J: Fluorescencia variable en el paso J.

V_t: Fluorescencia variable relativa en el tiempo t.

ZE: Zeaxantina epoxidasa.

γ: función de corrección por procesos de reabsorción y remisión de luz del modelo de Lagorio y colaboradores de 1998.

δR_o: Eficiencia / probabilidad con la cual un electrón del intersistema transportador de electrones es transferido a el ultimo aceptor de electrones reducido en el lado aceptor en el PSI (RE).

λ_{emi}: longitud de onda de emisión.

λ_{exc} : longitud de onda de excitación.

Φ_C : rendimiento cuántico de decaimiento fotoquímico.

Φ_{Eo} : Rendimiento cuántico para el transporte electrónico (ET).

Φ_{NPQ} : rendimiento cuántico de quenching no fotoquímico.

Φ_{Po} : Máximo rendimiento cuántico de fotoquímica primaria.

Φ_{PSII} : rendimiento cuántico del PSII.

Φ_{Pt} : Rendimiento cuántico para fotoquímica primaria a cualquier tiempo t, de acuerdo a la ecuación general of Pailltin (1976)⁴⁶.

Φ_{Ro} : Rendimiento cuántico para el ultimo aceptor de electrones reducido en el lado aceptor del PSI.

ψ_{Eo} : Eficiencia / probabilidad que un electrón se mueva más allá Q_A^- .

Φ_F : rendimiento cuántico de fluorescencia.

Bibliografía

- (1) Rabinowitch, E.: Govindjee: Photosynthesis, 273 pp. New York: Wiley, 1969.
- (2) Misra, A. N.; Misra, M.; Singh, R.: Chlorophyll fluorescence in plant biology. In *Biophysics*; InTech, 2012.
- (3) Kühlbrandt, W.; Wang, D. N.; Fujiyoshi, Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **1994**, *367*, 614.
- (4) Mohapatra, P. K.; Singh, N. R. Teaching the Z-Scheme of electron transport in photosynthesis: a perspective. *Photosynthesis research* **2015**, *123*, 105-114.
- (5) Horton, P.; Ruban, A.; Walters, R. Regulation of light harvesting in green plants. *Annual review of plant biology* **1996**, *47*, 655-684.
- (6) Blankenship, R. E.; Hartman, H. The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends in biochemical sciences* **1998**, *23*, 94-97.
- (7) Whitmarsh, J. a. G. The photosynthetic process. *Concepts in photobiology: photosynthesis and photomorphogenesis* **1999**, 11-51.
- (8) Govindjee, G. Chlorophyll a fluorescence: a bit of basics and history. *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis Springer, Dordrecht* **2004**, 1-42.
- (9) Maxwell, K.; Johnson, G. N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of experimental botany* **2000**, *51*, 659-668.
- (10) Baker, N. R.; Oxborough, K.: Chlorophyll fluorescence as a probe of photosynthetic productivity. In *Chlorophyll a Fluorescence*; Springer, 2004; pp 65-82.

- (11) Agati, G.; Fusi, F.; Mazzinghi, P.; di Paola, M. L. A simple approach to the evaluation of the reabsorption of chlorophyll fluorescence spectra in intact leaves. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1993**, *17*, 163-171.
- (12) Subhash, N.; Wenzel, O.; Lichtenthaler, H. K. Changes in blue-green and chlorophyll fluorescence emission and fluorescence ratios during senescence of tobacco plants. *Remote Sensing of Environment* **1999**, *69*, 215-223.
- (13) Lagorio, M. Chlorophyll fluorescence emission spectra in photosynthetic organisms in Chlorophyll: Structure, Production and Medicinal Uses Nova Science Publishers, New York, USA. ISBN 978-1-61470-974-9,. *Chlorophyll: Structure, Production and Medicinal Uses* **2011**, 115-150.
- (14) DeEll, J. R.; Toivonen, P. M.: Use of chlorophyll fluorescence in postharvest quality assessments of fruits and vegetables. In *Practical applications of Chlorophyll fluorescence in plant biology*; Springer, **2003**; pp 203-242.
- (15) Kalaji, H. M.; Goltsev, V.; Bosa, K.; Allakhverdiev, S. I.; Strasser, R. J. Experimental in vivo measurements of light emission in plants: a perspective dedicated to David Walker. *Photosynthesis Research* **2012**, *114*, 69-96.
- (16) Kalaji, H. M.; Schansker, G.; Brestic, M.; Bussotti, F.; Calatayud, A.; Ferroni, L.; Goltsev, V.; Guidi, L.; Jajoo, A.; Li, P. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynthesis Research* **2017**, *132*, 13-66.
- (17) Kowalczyk, K.; Gajc-Wolska, J.; Marcinkowska, M.; Cetner, M. D.; Kalaji, H. M. Response of growth, quality parameters and photosynthetic apparatus of endive plant to different culture media. *Folia Horticulturae* **2016**, *28*, 25-30.
- (18) Kalaji, H. M.; Jajoo, A.; Oukarroum, A.; Brestic, M.; Zivcak, M.; Samborska, I. A.; Cetner, M. D.; Łukasik, I.; Goltsev, V.; Ladle, R. J. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta physiologiae plantarum* **2016**, *38*, 102-113.
- (19) Kalaji, H. M.; Schansker, G.; Ladle, R. J.; Goltsev, V.; Bosa, K.; Allakhverdiev, S. I.; Brestic, M.; Bussotti, F.; Calatayud, A.; Dąbrowski, P. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis research* **2014**, *122*, 121-158.

- (20) Franck, F.; Juneau, P.; Popovic, R. Resolution of the photosystem I and photosystem II contributions to chlorophyll fluorescence of intact leaves at room temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **2002**, *1556*, 239-246.
- (21) Mazzinghi, P.; Agati, G.; Fusi, F. Interpretation and physiological significance of blue-green and red vegetation fluorescence. *Geoscience and Remote Sensing Symposium* **1994**, *1*, 640-642.
- (22) Agati, G.; Cerovic, Z. G.; Moya, I. The Effect of Decreasing Temperature up to Chilling Values on the in vivo F685/F735 Chlorophyll Fluorescence Ratio in *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*: The Role of the Photosystem I Contribution to the 735 nm Fluorescence Band. *Photochemistry and Photobiology* **2000**, *72*, 75-84.
- (23) Jee, G. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll-a fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology* **1995**, *22*, 131-160.
- (24) Cerdón, G. B.; Lagorio, M. G. Re-absorption of chlorophyll fluorescence in leaves revisited. A comparison of correction models. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2006**, *5*, 735-740.
- (25) Cerdón, G. B.; Lagorio, M. G. Optical properties of the adaxial and abaxial faces of leaves. Chlorophyll fluorescence, absorption and scattering coefficients. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2007**, *6*, 873-882.
- (26) Anderson, J. M.; Horton, P.; Kim, E.-H.; Chow, W. S. Towards elucidation of dynamic structural changes of plant thylakoid architecture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2012**, *367*, 3515.
- (27) Minagawa, J. State transitions—the molecular remodeling of photosynthetic supercomplexes that controls energy flow in the chloroplast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **2011**, *1807*, 897-905.
- (28) Buschmann, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynthesis Research* **2007**, *92*, 261-271.
- (29) Pfündel, E. Estimating the contribution of photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research* **1998**, *56*, 185-195.
- (30) Agati, G. Response of the in vivo chlorophyll fluorescence spectrum to environmental factors and laser excitation wavelength. *Pure and Applied Optics* **1998**, *7*, 797.

- (31) Buschmann, C.; Lichtenthaler, H. K. Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. *Journal of Plant Physiology* **1998**, *152*, 297-314.
- (32) Allen, J. F. State transitions--a question of balance. *Science* **2003**, *299*, 1530-1532.
- (33) Ramos, M. E.; Lagorio, M. G. True fluorescence spectra of leaves. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**, *3*, 1063-1066.
- (34) Lagorio, M. G.; Dicelio, L. E.; Litter, M. I.; San Román, E. Modeling of fluorescence quantum yields of supported dyes Aluminium carboxyphthalocyanine on cellulose. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1998**, *94*, 419-425.
- (35) Ramos, M. E.; Lagorio, M. G. A model considering light reabsorption processes to correct in vivo chlorophyll fluorescence spectra in apples. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2006**, *5*, 508-512.
- (36) Lichtenthaler, H.; Lang, M.; Sowinska, M.; Heisel, F.; Miehe, J. Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *Journal of plant physiology* **1996**, *148*, 599-612.
- (37) Meroni, M.; Rossini, M.; Guanter, L.; Alonso, L.; Rascher, U.; Colombo, R.; Moreno, J. Remote sensing of solar-induced chlorophyll fluorescence: Review of methods and applications. *Remote Sensing of Environment* **2009**, *113*, 2037-2051.
- (38) Mehta, P.; Jajoo, A.; Mathur, S.; Bharti, S. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant physiology and biochemistry* **2010**, *48*, 16-20.
- (39) Nielsen, T.; Orcutt, M. Chapter 7: Herbivory and plant stress. *T. E. Nielsen, and MD Orcutt. The physiology of plant under stress: soil and biotic factors. Canada* **2000**, 112-1124.
- (40) Lichtenthaler, H. Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics. *Photosynthetica* **1992**, *27*, 45-55.
- (41) Brack, W.; Frank, H. ChlorophyllaFluorescence: A Tool for the Investigation of Toxic Effects in the Photosynthetic Apparatus. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **1998**, *40*, 34-41.

- (42) Kautsky, H.; Hirsch, A. Neue Versuche zur Kohlenstoffassimilation. *Naturwissenschaften* **1931**, *19*, 964.
- (43) Papageorgiou, G. C.: *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*; Springer Science & Business Media: Dordrecht, The Netherlands, **2007**; Vol. 19.
- (44) Munday Jr, J. C. Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll a in vivo: III. The dip and the peak in the fluorescence transient of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biophysical Journal* **1969**, *9*, 1-21.
- (45) Schansker, G.; Tóth, S. Z.; Strasser, R. J. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **2005**, *1706*, 250-261.
- (46) Paillotin, G. Movement of excitations in the photosynthetic domains of photosystem II. *Journal of theoretical biology* **1976**, *58*, 237-252.
- (47) Strasser, R. J.; Tsimilli-Michael, M.; Qiang, S.; Goltsev, V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **2010**, *1797*, 1313-1326.
- (48) Strasser, R. J.; Srivastava, A.; Tsimilli-Michael, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation* **2000**, 445-483.
- (49) Baker, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 89-113.
- (50) Papageorgiou, G. Govindjee (2004). *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis* **2000**, *19*, 14-48.
- (51) Kautsky, H.; Appel, W.; Amann, H. Chlorophyll fluorescence and carbon assimilation. Part XIII. The fluorescence and the photochemistry of plants. *Biochemische Zeitschrift* **1960**, *332*, 277-292.
- (52) Hendrickson, L.; Furbank, R. T.; Chow, W. S. A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis research* **2004**, *82*, 73-81.

(53) Guadagno, C.; De Santo, A. V.; D'Ambrosio, N. A revised energy partitioning approach to assess the yields of non-photochemical quenching components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **2010**, *1797*, 525-530.

(54) Schreiber, U.; Bilger, W.; Neubauer, C.: Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In *Ecophysiology of photosynthesis*; Springer, **1995**; pp 49-70.

(55) Schreiber, U.; Bilger, W.: Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. In *Progress in Botany/Fortschritte der Botanik*; Springer, **1993**; pp 151-173.

(56) Lichtenthaler, H.; Buschmann, C.; Knapp, M. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{Fd} of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* **2005**, *43*, 379-393.

(57) Juneau, P.; Green, B.; Harrison, P. Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. *Photosynthetica* **2005**, *43*, 75-83.

(58) Ahn, T. K.; Avenson, T. J.; Peers, G.; Li, Z.; Dall'Osto, L.; Bassi, R.; Niyogi, K. K.; Fleming, G. R. Investigating energy partitioning during photosynthesis using an expanded quantum yield convention. *Chemical Physics* **2009**, *357*, 151-158.

(59) Eberhard, S.; Finazzi, G.; Wollman, F.-A. The dynamics of photosynthesis. *Annual review of genetics* **2008**, *42*, 463-515.

(60) Schreiber, U.; Schliwa, U.; Bilger, W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis research* **1986**, *10*, 51-62.

(61) Turro, N. J.: *Modern molecular photochemistry*; University science books, **1991**.

(62) Hendrickson, L.; Förster, B.; Pogson, B. J.; Chow, W. S. A simple chlorophyll fluorescence parameter that correlates with the rate coefficient of photoinactivation of photosystem II. *Photosynthesis Research* **2005**, *84*, 43-49.

(63) Demmig-Adams, B.; Adams Iii, W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual review of plant biology* **1992**, *43*, 599-626.

- (64) Szabó, I.; Bergantino, E.; Giacometti, G. M. Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO reports* **2005**, *6*, 629-634.
- (65) Britton, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal* **1995**, *9*, 1551-1558.
- (66) Green, B. R.; Durnford, D. G. The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annual review of plant biology* **1996**, *47*, 685-714.
- (67) Grossman, A. R.; Bhaya, D.; Apt, K. E.; Kehoe, D. M. Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control, and evolution. *Annual review of genetics* **1995**, *29*, 231-288.
- (68) Demmig-Adams, B. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1990**, *1020*, 1-24.
- (69) Demmig-Adams, B.; Gilmore, A. M.; Adams 3rd, W. Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal* **1996**, *10*, 403-412.
- (70) Eskling, M.; Arvidsson, P. O.; Åkerlund, H. E. The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum* **1997**, *100*, 806-816.
- (71) Owens, T. G. Photoinhibition of Photosynthesis: from Molecular Mechanisms to the Field, eds Baker NR & Bowyer JR. (Oxford: BIOS Oxford). *The Journal of Agricultural Science* **1994**, *124*, 95-109.
- (72) Frank, H. A.; Cua, A.; Chynwat, V.; Young, A.; Gosztola, D.; Wasielewski, M. R. Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynthesis Research* **1994**, *41*, 389-395.
- (73) Chow, W.: Photoprotection and photoinhibitory damage. In *Advances in molecular and cell biology*; Elsevier, **1994**; Vol. 10; pp 151-196.
- (74) Frank, H. A.; Cogdell, R. J. Carotenoids in photosynthesis. *Photochemistry and photobiology* **1996**, *63*, 257-264.
- (75) Demmig-Adams, B.; Adams, W. I. Capacity for energy dissipation in the pigment bed in leaves with different xanthophyll cycle pools. *Functional Plant Biology* **1994**, *21*, 575-588.

- (76) Kramer, D. M.; Johnson, G.; Kiirats, O.; Edwards, G. E. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis research* **2004**, *79*, 209-218.
- (77) Steyn, W.; Wand, S.; Holcroft, D.; Jacobs, G. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* **2002**, *155*, 349-361.
- (78) Zhang, K.-M.; Yu, H.-J.; Shi, K.; Zhou, Y.-H.; Yu, J.-Q.; Xia, X.-J. Photoprotective roles of anthocyanins in *Begonia semperflorens*. *Plant science* **2010**, *179*, 202-208.
- (79) Chalker-Scott, L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and photobiology* **1999**, *70*, 1-9.
- (80) Zhu, H.; Zhang, T.; Zhang, P.; Peng, C. Pigment patterns and photoprotection of anthocyanins in the young leaves of four dominant subtropical forest tree species in two successional stages under contrasting light conditions. *Tree physiology* **2016**, *36*, 1092-1104.
- (81) Society., A. H. Encyclopedia of Plants and Flowers. <http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=260587&isprofile=0&> (accessed November **2018**).
- (82) Llamas, K. a. **2003**: tropical flowering plants: a guide to identification and cultivation. *Portland: timber*.
- (83) Vickers, W. T.; Plowman, T. Useful plants of the Siona and Secoya Indians of eastern Ecuador. **1984**. Field Museum of Natural History.
- (84) Sims, D. A.; Gamon, J. A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote sensing of environment* **2002**, *81*, 337-354.
- (85) Lagorio, M. Chlorophyll fluorescence emission spectra in photosynthetic organisms. *Chlorophyll: Structure, Production and Medicinal Uses* **2011**, 115-150.
- (86) Müller, P.; Li, X.-P.; Niyogi, K. K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant physiology* **2001**, *125*, 1558-1566.
- (87) Lindahl, M.; Yang, D. H.; Andersson, B. Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II by a light-induced

membrane-associated enzymic system. *European journal of biochemistry* **1995**, *231*, 503-509.

(88) Yang, D.-H.; Webster, J.; Adam, Z.; Lindahl, M.; Andersson, B. Induction of acclimative proteolysis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II in response to elevated light intensities. *Plant physiology* **1998**, *118*, 827-834.

(89) Neill, S. O.; Gould, K. S. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology* **2003**, *30*, 865-873.

(90) Li, X.-P.; Müller-Moulé, P.; Gilmore, A. M.; Niyogi, K. K. PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 15222-15227.

(91) Li, X.-P.; Phippard, A.; Pasari, J.; Niyogi, K. K. Structure–function analysis of photosystem II subunit S (PsbS) in vivo. *Functional Plant Biology* **2002**, *29*, 1131-1139.

(92) Pascal, A. A.; Liu, Z.; Broess, K.; van Oort, B.; van Amerongen, H.; Wang, C.; Horton, P.; Robert, B.; Chang, W.; Ruban, A. Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting. *Nature* **2005**, *436*, 134.

(93) Sylak-Glassman, E. J.; Malnoë, A.; De Re, E.; Brooks, M. D.; Fischer, A. L.; Niyogi, K. K.; Fleming, G. R. Distinct roles of the photosystem II protein PsbS and zeaxanthin in the regulation of light harvesting in plants revealed by fluorescence lifetime snapshots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111*, 17498-17503.

(94) Manetas, Y.; Drinia, A.; Petropoulou, Y. High contents of anthocyanins in young leaves are correlated with low pools of xanthophyll cycle components and low risk of photoinhibition. *Photosynthetica* **2002**, *40*, 349-354.

(95) Dodd, A. N.; Borland, A. M.; Haslam, R. P.; Griffiths, H.; Maxwell, K. Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. *Journal of experimental botany* **2002**, *53*, 569-580.

(96) Sage, R. F.; Wedin, D. A.; Li, M. The biogeography of C4 photosynthesis: patterns and controlling factors. *C4 plant biology* **1999**, 313-373.

- (97) Benson, A.; Bassham, J.; Calvin, M.; Goodale, T. C.; Haas, V.; Stepka, W. The path of carbon in photosynthesis. V. Paper chromatography and radioautography of the products¹. *Journal of the American chemical society* **1950**, *72*, 1710-1718.
- (98) Ehleringer, J. R.; Monson, R. K. Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1993**, *24*, 411-439.
- (99) Hatch, M. D.: C 4 photosynthesis: discovery and resolution. In *Discoveries in Photosynthesis*; Springer, **2005**; pp 875-880.
- (100) Sharkey, T. D. Photosynthesis in intact leaves of C 3 plants: physics, physiology and rate limitations. *The Botanical Review* **1985**, *51*, 53-105.
- (101) Edwards, E. J.; Smith, S. A. Phylogenetic analyses reveal the shady history of C₄ grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 2532-2537.
- (102) Holaday, A. S.; Bowes, G. C₄ acid metabolism and dark CO₂ fixation in a submersed aquatic macrophyte (*Hydrilla verticillata*). *Plant physiology* **1980**, *65*, 331-335.
- (103) Keiller, D.; Slocombe, S.; Cockburn, W. Analysis of chlorophyll a fluorescence in C₃ and CAM forms of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Journal of Experimental Botany* **1994**, *45*, 325-334.
- (104) Strasser, B. a. S. R. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questionsL; the JIP-test. *Photosynthesis: from light to biosphere* **1995**, 977-980.
- (105) Jolliffe, I. T. Graphical representation of data using principal components. *Principal component analysis* **2002**, 78-110.
- (106) Cordon, G.; Iriel, A.; Cirelli, A. F.; Lagorio, M. G. Arsenic effects on some photophysical parameters of *Cichorium intybus* under different radiation and water irrigation regimes. *Chemosphere* **2018**, *204*, 398-404.
- (107) Torres, R.; Diz, V. E.; Lagorio, M. G. Effects of gold nanoparticles on the photophysical and photosynthetic parameters of leaves and chloroplasts. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2018**, *17*, 505-516.

- (108) Iriel, A.; Dundas, G.; Cirelli, A. F.; Lagorio, M. G. Effect of arsenic on reflectance spectra and chlorophyll fluorescence of aquatic plants. *Chemosphere* **2015**, *119*, 697-703.
- (109) Iriel, A.; Novo, J. M.; Cordon, G. B.; Lagorio, M. G. Atrazine and Methyl Viologen Effects on Chlorophyll-a Fluorescence Revisited—Implications in Photosystems Emission and Ecotoxicity Assessment. *Photochemistry and photobiology* **2014**, *90*, 107-112.
- (110) Oukarroum, A.; El Madidi, S.; Schansker, G.; Strasser, R. J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany* **2007**, *60*, 438-446.
- (111) Cascio, C.; Schaub, M.; Novak, K.; Desotgiu, R.; Bussotti, F.; Strasser, R. J. Foliar responses to ozone of *Fagus sylvatica* L. seedlings grown in shaded and in full sunlight conditions. *Environmental and Experimental Botany* **2010**, *68*, 188-197.
- (112) Srivastava, A.; Guisse, B.; Greppin, H.; Strasser, R. J. Regulation of antenna structure and electron transport in photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1997**, *1320*, 95-106.
- (113) Drew, M.; Lynch, J. M. Soil anaerobiosis, microorganisms, and root function. *Annual Review of Phytopathology* **1980**, *18*, 37-66.
- (114) Ortiz-Lopez, A.; Ort, D. R.; Boyer, J. S. Photophosphorylation in attached leaves of *Helianthus annuus* at low water potentials. *Plant Physiology* **1991**, *96*, 1018-1025.
- (115) Smirnoff, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New phytologist* **1993**, *125*, 27-58.
- (116) Aro, E.-M.; Virgin, I.; Andersson, B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1993**, *1143*, 113-134.
- (117) Virgin, H. I. Chlorophyll formation and water deficit. *Physiologia Plantarum* **1965**, *18*, 994-1000.

- (118) Bourque, D. P.; McMillan, P. N.; Clingenpeel, W. J.; Naylor, A. W. Ultrastructural effects of water stress on chloroplast development in jack bean (*Canavalia ensiformis* [L.] DC). *Plant physiology* **1975**, *56*, 160-163.
- (119) Novo, J. M.; Iriel, A.; Lagorio, M. G. Modelling chlorophyll fluorescence of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). *Photochemical & Photobiological Sciences* **2012**, *11*, 724-730.
- (120) Rodríguez, H. B.; Lagorio, M. G.; San Román, E. Rose Bengal adsorbed on microgranular cellulose: evidence on fluorescent dimers. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**, *3*, 674-680.
- (121) Lagorio, M. G.; San Román, E.; Zeug, A.; Zimmermann, J.; Röder, B. Photophysics on surfaces: Absorption and luminescence properties of Pheophorbide-a on cellulose. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2001**, *3*, 1524-1529.
- (122) Gausman, H.; Allen, W. Optical parameters of leaves of 30 plant species. *Plant Physiology* **1973**, *52*, 57-62.
- (123) Lagorio, M. Chlorophyll fluorescence emission spectra in photosynthetic organisms in Chlorophyll: Structure, Production and Medicinal Uses Nova Science Publishers, New York, USA ISBN 978-1-61470-974-9,. *Chlorophyll: Structure, Production and Medicinal Uses* **2011**, 115-150.
- (124) Barber, J.: *The photosystems: Structure, function and molecular biology*; Elsevier, **2015**; Vol. 11.
- (125) Nanba, O.; Satoh, K. Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1987**, *84*, 109-112.
- (126) Deisenhofer, J.; Norris, J. R.: *Photosynthetic Reaction Center*; Academic Press, 2013; Vol. 2.
- (127) Leong, T.-Y.; Anderson, J. M. Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. I. Study on the distribution of chlorophyll-protein complexes. *Photosynthesis Research* **1984**, *5*, 105-115.
- (128) Leong, T.-Y.; Anderson, J. M. Light-quality and irradiance adaptation of the composition and function of pea-thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1986**, *850*, 57-63.

(129) McDonald, M. S.: *Photobiology of higher plants*; John Wiley & Sons, **2003**. pp. 121-122.

(130) Brugnoli, E.; Scartazza, A.; De Tullio, M. C.; Monteverdi, M. C.; Lauteri, M.; Augusti, A. Zeaxanthin and non-photochemical quenching in sun and shade leaves of C3 and C4 plants. *Physiologia Plantarum* **1998**, *104*, 727-734.

(131) Runday, R.; Aalderink, G.; Crum, S. Application methods of pesticides to an aquatic mesocosm in order to simulate effects of spray drift. *Water Research* **1998**, *32*, 147-153.

(132) Liess, M.; Schulz, R. Linking insecticide contamination and population response in an agricultural stream. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* **1999**, *18*, 1948-1955.

(133) Krieger, K. A.; Baker, D. B.; Kramer, J. W. Effects of herbicides on stream Aufwuchs productivity and nutrient uptake. *Archives of environmental contamination and toxicology* **1988**, *17*, 299-306.

(134) Richards, R. P.; Baker, D. B. Pesticide concentration patterns in agricultural drainage networks in the Lake Erie basin. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1993**, *12*, 13-26.

(135) Gustavson, K.; Møhlenberg, F.; Schlüter, L. Effects of exposure duration of herbicides on natural stream periphyton communities and recovery. *Archives of environmental contamination and toxicology* **2003**, *45*, 0048-0058.

(136) Graymore, M.; Stagnitti, F.; Allinson, G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment international* **2001**, *26*, 483-495.

(137) Belluck, D. Groundwater contamination by atrazine and its metabolites: risk assessment, policy, and legal implications. *Pesticide transformation products: fate and significance in the environment* **1991**, 255-273.

(138) EUR-Lex. Commission Decision of 10 March 2004 concerning the non-inclusion of atrazine in Annex I to Council Directive <https://eur-lex.europa.eu/eli/dec/2004/248/oj>. **2004**.

(139) CIAFA. LMR de principios activos por cultivo <https://www.ciafa.org.ar/files/25ZfSUTziuefpbmsnfcW3U6AlitWMYgc89ueuRnC.xls>. *Camara de la Industria Argentina de Fertilizantes y Agroquimicos* **2017**.

(140) Alonso, L. L.; Demetrio, P. M.; Etchegoyen, M. A.; Marino, D. J. Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Science of the Total Environment* **2018**, *645*, 89-96.

(141) Pubchem. Atrazine
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/atrazine#section=Top>. *National Center for Biotechnology Information* **2018**.

(142) Fai, P. B.; Grant, A.; Reid, B. Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* **2007**, *26*, 1520-1531.

(143) Dodge, A. D. The role of light and oxygen in the action of photosynthetic inhibitor herbicides. *ACS Publications* **1982**, 58-77.

(144) Powles, S. B. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual review of plant physiology* **1984**, *35*, 15-44.

(145) Heber, U.; Lange, O. L.; Shuvalov, V. A. Conservation and dissipation of light energy as complementary processes: homoiohydric and poikilohydric autotrophs. *Journal of Experimental Botany* **2006**, *57*, 1211-1223.

(146) Bischoff, H.; Bold, H. Some algae from Enchanted Rock and related algal species. *Phycological studies, University of Texas, IV, Austin* **1963**, 68.

(147) Horton, P.; Hague, A. Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of non-photochemical quenching. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1988**, *932*, 107-115.

(148) Zer, H.; Ohad, I. Photoinactivation of photosystem II induces changes in the photochemical reaction center II abolishing the regulatory role of the QB site in the D1 protein degradation. *European journal of biochemistry* **1995**, *231*, 448-453.

(149) Pospíšil, P.; Dau, H. Chlorophyll fluorescence transients of photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution. *Photosynthesis Research* **2000**, *65*, 41-52.

(150) Bolhar-Nordenkamp, H.; Long, S.; Baker, N.; Oquist, G.; Schreiber, U.; Lechner, E. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology* **1989**, 497-514.

(151) Seaton, G. G.; Walker, D. A. Validating chlorophyll fluorescence measures of efficiency: observations on fluorimetric estimation of photosynthetic rate. *Proc. R. Soc. Lond. B* **1992**, *249*, 41-47.

(152) Osmond, C. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. *Photoinhibition of photosynthesis-from molecular mechanisms to the field* **1994**, 1-24.

(153) Lazár, D. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Functional Plant Biology* **2006**, *33*, 9-30.

(154) Jay, A. E.; Ducruet, J.-M.; Duval, J.-C.; Pelletier, J. P. A high-sensitivity chlorophyll fluorescence assay for monitoring herbicide inhibition of photosystem II in the chlorophyte *Selenastrum capricornutum*: comparison with effect on cell growth. *Archiv für Hydrobiologie* **1997**, 273-286.

(155) Lazár, D.; Brokeš, M.; Nauš, J.; Dvořák, L. r. Mathematical modelling of 3-(3', 4'-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea action in plant leaves. *Journal of theoretical biology* **1998**, *191*, 79-86.

(156) Stoberl, F.; Lichtenthaler, H. Studies on the localization and spectral characteristics of the fluorescence emission of differently pigmented wheat leaves. *Botanica acta* **1993**, *106*, 365-370.

(157) Oettmeier, W. Herbicides of Photosystem II. *Topics in Photosynthesis*. **1992**, *11*, 349-408.

ANEXO 1

Tabla de valores de los parámetros fotosintéticos obtenidos del test OJIP de fluorescencia de la clorofila-a y descripción del metabolismo de fijación de carbono (MFC) para las 43 especies estudiadas en el capítulo 4 sección 4.2.2.

#	Nombre	MFC	Fv/Fm		Vj	
1	<i>Agapanthus africanus</i>	C3	0,809 ±	0,004	0,426 ±	0,066
2	<i>Agave potatorum</i>	CAM	0,807 ±	0,044	0,345 ±	0,044
3	<i>Allamanda cathartica L</i>	C3	0,834 ±	0,019	0,609 ±	0,031
4	<i>Amaranthus quitensis</i>	C4	0,716 ±	0,019	0,793 ±	0,024
5	<i>Musa paradisiaca</i>	C3	0,788 ±	0,026	0,550 ±	0,100
6	<i>Solenostemon blumei</i>	C3	0,830 ±	0,004	0,554 ±	0,023
7	<i>Drácena marginata</i>	C4	0,763 ±	0,029	0,552 ±	0,077
8	<i>Dryopteris filix-mas</i>	C3	0,813 ±	0,011	0,533 ±	0,014
9	<i>Echeveria runyonii</i>	CAM	0,752 ±	0,024	0,271 ±	0,012
10	<i>Echeveria perle von nürnberg</i>	CAM	0,741 ±	0,039	0,360 ±	0,037
11	<i>Echeveria pulidonis</i>	CAM	0,831 ±	0,009	0,374 ±	0,021
12	<i>Ficus benamina</i>	C3	0,804 ±	0,015	0,529 ±	0,039
13	<i>Fittonia albivenis Verschaffeltii</i>	C3	0,792 ±	0,005	0,538 ±	0,021
14	<i>Fittonia albivenis Argyroneura</i>	C3	0,783 ±	0,012	0,505 ±	0,036
15	<i>Axonopus compressus</i>	C4	0,816 ±	0,004	0,493 ±	0,014
16	<i>Hypoestes sanguinolenta red</i>	C3	0,794 ±	0,012	0,464 ±	0,042
17	<i>Hypoestes phyllostachya</i>	C3	0,802 ±	0,010	0,484 ±	0,025
18	<i>Hypoestes sanguinolenta white</i>	C3	0,815 ±	0,013	0,475 ±	0,018
19	<i>Hydrangea macrophylla</i>	C3	0,801 ±	0,008	0,520 ±	0,018
20	<i>Hydrangea quercifolia</i>	C3	0,825 ±	0,025	0,473 ±	0,034
21	<i>Iresine herbstii</i>	C3	0,808 ±	0,014	0,592 ±	0,058
22	<i>Kalanchoe pinnata</i>	CAM	0,849 ±	0,012	0,423 ±	0,014
23	<i>Citrus limon "Genova"</i>	C3	0,831 ±	0,014	0,576 ±	0,033
24	<i>Citrus reticulata "Montenegrina"</i>	C3	0,831 ±	0,015	0,586 ±	0,063
25	<i>Citrus sinensis "Salustiana"</i>	C3	0,829 ±	0,014	0,619 ±	0,030
26	<i>Nephrolepis cordifolia</i>	C3	0,854 ±	0,016	0,524 ±	0,048
27	<i>Opuntia jamaicensis</i>	CAM	0,820 ±	0,015	0,386 ±	0,028
28	<i>Hosta sieboldii</i>	C3	0,799 ±	0,031	0,559 ±	0,032
29	<i>Pennisetum setaceum rubrum</i>	C4	0,794 ±	0,021	0,521 ±	0,060
30	<i>Peperomia caperata</i>	C3	0,824 ±	0,005	0,458 ±	0,025
31	<i>Petunia hybrida</i>	C3	0,845 ±	0,012	0,520 ±	0,023
32	<i>Phormium tenax "Variegata"</i>	C4	0,711 ±	0,076	0,570 ±	0,087
33	<i>Phormium tenax "Purpureum"</i>	C4	0,781 ±	0,036	0,595 ±	0,103
34	<i>Platynerium andinum</i>	C3	0,845 ±	0,014	0,481 ±	0,047
35	<i>Polypodium formosanum</i>	C3	0,806 ±	0,023	0,498 ±	0,019
36	<i>Beta vulgaris</i>	C3	0,839 ±	0,011	0,527 ±	0,029
37	<i>Hylotelephium spectabile</i>	CAM	0,816 ±	0,013	0,439 ±	0,038
38	<i>Senecium Kaempferis</i>	C3	0,826 ±	0,016	0,427 ±	0,040
39	<i>Strelitzia nicolai</i>	C3	0,800 ±	0,057	0,457 ±	0,111
40	<i>Strelitzia reginae</i>	C3	0,770 ±	0,052	0,418 ±	0,061
41	<i>Tibouchina grandiflora</i>	C3	0,826 ±	0,009	0,521 ±	0,048
42	<i>Tradescantia pallida</i>	C3	0,772 ±	0,015	0,456 ±	0,071
43	<i>Vinca minor</i>	C3	0,859 ±	0,005	0,471 ±	0,024

#	ABS/RC		Dio/RC		TRo/RC		ETo/RC	
1	1,943	± 0,145	0,372	± 0,034	1,571	± 0,112	0,897	± 0,057
2	1,827	± 0,336	0,363	± 0,146	1,464	± 0,205	0,955	± 0,108
3	2,604	± 0,146	0,434	± 0,069	2,170	± 0,093	0,848	± 0,054
4	2,694	± 0,220	0,768	± 0,113	1,926	± 0,119	0,397	± 0,038
5	2,715	± 0,344	0,577	± 0,111	2,138	± 0,267	0,954	± 0,193
6	2,508	± 0,182	0,426	± 0,034	2,082	± 0,150	0,926	± 0,046
7	2,571	± 0,191	0,613	± 0,124	1,958	± 0,073	0,874	± 0,139
8	3,005	± 0,291	0,564	± 0,087	2,441	± 0,207	1,140	± 0,098
9	2,128	± 0,110	0,530	± 0,074	1,598	± 0,060	1,165	± 0,057
10	2,510	± 0,354	0,655	± 0,151	1,854	± 0,238	1,182	± 0,108
11	2,071	± 0,126	0,351	± 0,031	1,720	± 0,101	1,075	± 0,050
12	2,335	± 0,375	0,462	± 0,109	1,873	± 0,268	0,874	± 0,051
13	2,629	± 0,154	0,547	± 0,041	2,082	± 0,115	0,960	± 0,031
14	2,471	± 0,174	0,536	± 0,035	1,935	± 0,152	0,958	± 0,085
15	2,692	± 0,082	0,496	± 0,021	2,196	± 0,064	1,112	± 0,009
16	2,133	± 0,261	0,441	± 0,063	1,693	± 0,205	0,902	± 0,066
17	2,307	± 0,188	0,458	± 0,049	1,849	± 0,147	0,951	± 0,047
18	2,152	± 0,178	0,399	± 0,050	1,753	± 0,139	0,919	± 0,060
19	2,429	± 0,131	0,484	± 0,035	1,946	± 0,104	0,932	± 0,041
20	2,281	± 0,195	0,402	± 0,084	1,880	± 0,134	0,987	± 0,040
21	2,215	± 0,090	0,425	± 0,039	1,790	± 0,071	0,731	± 0,115
22	1,903	± 0,104	0,288	± 0,039	1,615	± 0,066	0,932	± 0,023
23	1,857	± 0,083	0,314	± 0,037	1,543	± 0,055	0,653	± 0,041
24	1,893	± 0,148	0,322	± 0,053	1,571	± 0,096	0,647	± 0,079
25	1,969	± 0,189	0,339	± 0,060	1,631	± 0,130	0,619	± 0,034
26	3,225	± 0,143	0,473	± 0,066	2,753	± 0,104	1,311	± 0,143
27	2,127	± 0,233	0,385	± 0,068	1,742	± 0,170	1,069	± 0,106
28	2,780	± 0,231	0,561	± 0,122	2,219	± 0,160	0,977	± 0,080
29	2,744	± 0,386	0,571	± 0,134	2,173	± 0,261	1,030	± 0,092
30	2,202	± 0,097	0,387	± 0,023	1,814	± 0,076	0,982	± 0,024
31	2,791	± 0,200	0,435	± 0,067	2,356	± 0,137	1,128	± 0,033
32	2,634	± 0,445	0,784	± 0,335	1,851	± 0,166	0,791	± 0,141
33	2,009	± 0,184	0,444	± 0,115	1,565	± 0,085	0,630	± 0,146
34	2,349	± 0,109	0,362	± 0,028	1,987	± 0,111	1,028	± 0,064
35	3,055	± 0,112	0,593	± 0,071	2,462	± 0,129	1,235	± 0,090
36	2,407	± 0,254	0,389	± 0,065	2,018	± 0,189	0,951	± 0,055
37	2,633	± 0,144	0,484	± 0,051	2,150	± 0,109	1,204	± 0,051
38	2,290	± 0,212	0,400	± 0,070	1,891	± 0,151	1,078	± 0,038
39	1,967	± 0,381	0,392	± 0,135	1,575	± 0,342	0,826	± 0,054
40	1,970	± 0,301	0,466	± 0,166	1,504	± 0,144	0,871	± 0,074
41	2,000	± 0,172	0,349	± 0,041	1,651	± 0,135	0,790	± 0,085
42	2,428	± 0,230	0,557	± 0,083	1,871	± 0,153	1,012	± 0,103
43	2,114	± 0,155	0,298	± 0,019	1,816	± 0,138	0,958	± 0,032

#	REo/RC		$\psi(E_o)$		$\varphi(E_o)$		$\Delta(R_o)$	
1	0,271	± 0,054	0,574	± 0,066	0,465	± 0,055	0,304	± 0,068
2	0,246	± 0,069	0,655	± 0,044	0,530	± 0,061	0,254	± 0,047
3	0,435	± 0,025	0,391	± 0,031	0,327	± 0,033	0,515	± 0,053
4	0,448	± 0,059	0,207	± 0,024	0,148	± 0,020	1,138	± 0,206
5	0,290	± 0,077	0,450	± 0,100	0,355	± 0,081	0,300	± 0,026
6	0,352	± 0,016	0,446	± 0,023	0,370	± 0,020	0,380	± 0,013
7	0,196	± 0,055	0,448	± 0,077	0,343	± 0,068	0,223	± 0,048
8	0,318	± 0,042	0,467	± 0,014	0,380	± 0,013	0,279	± 0,027
9	0,531	± 0,039	0,729	± 0,012	0,548	± 0,018	0,456	± 0,038
10	0,425	± 0,083	0,640	± 0,037	0,475	± 0,043	0,358	± 0,047
11	0,351	± 0,018	0,626	± 0,021	0,520	± 0,016	0,327	± 0,016
12	0,282	± 0,031	0,471	± 0,039	0,379	± 0,036	0,322	± 0,033
13	0,296	± 0,037	0,462	± 0,021	0,366	± 0,018	0,308	± 0,037
14	0,266	± 0,047	0,495	± 0,036	0,388	± 0,024	0,277	± 0,040
15	0,322	± 0,019	0,507	± 0,014	0,413	± 0,012	0,289	± 0,016
16	0,436	± 0,027	0,536	± 0,042	0,426	± 0,035	0,486	± 0,046
17	0,420	± 0,026	0,516	± 0,025	0,414	± 0,022	0,443	± 0,037
18	0,385	± 0,057	0,525	± 0,018	0,428	± 0,016	0,419	± 0,054
19	0,349	± 0,021	0,480	± 0,018	0,384	± 0,016	0,374	± 0,015
20	0,279	± 0,023	0,527	± 0,034	0,435	± 0,037	0,282	± 0,021
21	0,361	± 0,043	0,408	± 0,058	0,330	± 0,053	0,497	± 0,043
22	0,305	± 0,014	0,577	± 0,014	0,490	± 0,018	0,327	± 0,010
23	0,231	± 0,040	0,424	± 0,033	0,353	± 0,032	0,354	± 0,062
24	0,219	± 0,044	0,414	± 0,063	0,344	± 0,057	0,336	± 0,033
25	0,186	± 0,018	0,381	± 0,030	0,316	± 0,029	0,301	± 0,029
26	0,243	± 0,038	0,476	± 0,048	0,407	± 0,043	0,185	± 0,021
27	0,401	± 0,049	0,614	± 0,028	0,504	± 0,024	0,376	± 0,040
28	0,348	± 0,059	0,441	± 0,032	0,353	± 0,033	0,357	± 0,067
29	0,282	± 0,030	0,479	± 0,060	0,381	± 0,055	0,273	± 0,013
30	0,212	± 0,022	0,542	± 0,025	0,447	± 0,022	0,216	± 0,021
31	0,275	± 0,038	0,480	± 0,023	0,406	± 0,024	0,244	± 0,036
32	0,372	± 0,101	0,430	± 0,087	0,310	± 0,091	0,468	± 0,077
33	0,223	± 0,042	0,405	± 0,103	0,320	± 0,092	0,360	± 0,037
34	0,193	± 0,021	0,519	± 0,047	0,438	± 0,032	0,188	± 0,019
35	0,252	± 0,049	0,502	± 0,019	0,404	± 0,025	0,206	± 0,051
36	0,306	± 0,030	0,473	± 0,029	0,397	± 0,029	0,322	± 0,027
37	0,469	± 0,039	0,561	± 0,038	0,458	± 0,034	0,391	± 0,049
38	0,359	± 0,049	0,573	± 0,040	0,474	± 0,039	0,333	± 0,044
39	0,230	± 0,052	0,543	± 0,111	0,432	± 0,081	0,278	± 0,063
40	0,262	± 0,028	0,582	± 0,061	0,450	± 0,073	0,301	± 0,025
41	0,365	± 0,019	0,479	± 0,048	0,396	± 0,042	0,466	± 0,045
42	0,363	± 0,052	0,544	± 0,071	0,420	± 0,058	0,362	± 0,066
43	0,262	± 0,029	0,529	± 0,024	0,454	± 0,019	0,274	± 0,035

#	$\varphi(R_o)$	PI abs	PI total
1	0,139 ± 0,023	3,114 ± 1,072	1,302 ± 0,333
2	0,135 ± 0,027	5,179 ± 2,728	1,746 ± 0,954
3	0,167 ± 0,012	1,298 ± 0,410	1,349 ± 0,291
4	0,167 ± 0,026	0,252 ± 0,068	-1,800 ± 2,162
5	0,108 ± 0,030	1,277 ± 0,721	0,561 ± 0,344
6	0,141 ± 0,008	1,587 ± 0,268	0,972 ± 0,156
7	0,078 ± 0,025	1,113 ± 0,409	0,339 ± 0,165
8	0,106 ± 0,012	1,292 ± 0,228	0,503 ± 0,121
9	0,250 ± 0,016	3,885 ± 0,574	3,255 ± 0,515
10	0,169 ± 0,015	2,241 ± 1,084	1,194 ± 0,384
11	0,170 ± 0,009	4,006 ± 0,540	1,952 ± 0,303
12	0,123 ± 0,020	1,670 ± 0,555	0,806 ± 0,306
13	0,112 ± 0,013	1,257 ± 0,194	0,557 ± 0,093
14	0,108 ± 0,020	1,443 ± 0,162	0,563 ± 0,155
15	0,120 ± 0,008	1,697 ± 0,158	0,692 ± 0,093
16	0,207 ± 0,028	2,188 ± 0,693	2,115 ± 0,877
17	0,183 ± 0,015	1,904 ± 0,374	1,513 ± 0,307
18	0,179 ± 0,025	2,297 ± 0,372	1,676 ± 0,414
19	0,144 ± 0,009	1,542 ± 0,214	0,925 ± 0,154
20	0,122 ± 0,008	2,437 ± 0,756	0,942 ± 0,239
21	0,163 ± 0,023	1,381 ± 0,529	1,351 ± 0,426
22	0,160 ± 0,009	4,119 ± 0,728	2,003 ± 0,387
23	0,124 ± 0,020	2,010 ± 0,501	1,089 ± 0,279
24	0,117 ± 0,029	1,969 ± 0,772	1,037 ± 0,523
25	0,095 ± 0,007	1,582 ± 0,471	0,670 ± 0,161
26	0,075 ± 0,012	1,705 ± 0,479	0,391 ± 0,124
27	0,189 ± 0,020	3,521 ± 0,709	2,137 ± 0,530
28	0,124 ± 0,011	1,187 ± 0,313	0,632 ± 0,056
29	0,105 ± 0,019	1,425 ± 0,556	0,545 ± 0,233
30	0,097 ± 0,013	2,548 ± 0,375	0,712 ± 0,170
31	0,100 ± 0,019	1,851 ± 0,384	0,622 ± 0,220
32	0,145 ± 0,045	0,946 ± 0,772	0,825 ± 0,547
33	0,113 ± 0,026	1,432 ± 0,765	0,762 ± 0,347
34	0,082 ± 0,010	2,546 ± 0,344	0,590 ± 0,106
35	0,082 ± 0,015	1,398 ± 0,269	0,352 ± 0,053
36	0,128 ± 0,018	2,029 ± 0,611	0,986 ± 0,392
37	0,178 ± 0,014	2,221 ± 0,504	1,408 ± 0,242
38	0,159 ± 0,030	2,929 ± 0,880	1,512 ± 0,590
39	0,124 ± 0,048	2,939 ± 1,877	1,291 ± 1,087
40	0,134 ± 0,015	2,927 ± 2,011	1,200 ± 0,692
41	0,184 ± 0,019	2,260 ± 0,646	1,976 ± 0,599
42	0,149 ± 0,011	1,792 ± 0,728	0,952 ± 0,173
43	0,125 ± 0,020	3,274 ± 0,508	1,261 ± 0,376

Producción científica

A-Publicaciones Internacionales con referatum

Ospina Calvo, B., Parapugna, T. L. and Lagorio M. G. (2017) Variability in chlorophyll fluorescence spectra of Eggplant Fruit grown under different light environments: case study., *Photochem. Photobiol. Sci.*, Vol. 16, pp 711-720.

B- Publicaciones Internacionales en proceso de revisión

Ospina Calvo, B., and Lagorio M. G. (2018) Chlorophyll fluorescence analysis and energy partition in PSII complex for 1 two varieties of *Fittonia albivenis* with different pigmentation. *Photochem. Photobiol. Sci*

C-Presentaciones a congresos

1) Titulo: Fluorescencia de la clorofila como bioindicador de ecotoxicidad por atrazina en algas de *Parachlorella kissleri*

Autores: Ospina Calvo, B., Juarez, A. and Lagorio M. G. Brian Ospina Calvo;

Reunión Científica: IV Reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos, GRAFOB.

Tipo de Reunión Científica: Congreso.

Lugar y Fecha: San Carlos de Bariloche, RIO NEGRO - ARGENTINA. 2018

Tipo de participación: Conferencista

2) Título: Monitoreo fotoquímico poscosecha de frutos de berenjena
Autores: Ospina Calvo, B., and Lagorio M. G.
Reunión Científica: VI Congreso de Ciencias Ambientales.
Tipo de Reunión Científica: Congreso.
Lugar y Fecha: Consejo profesional de ingeniería mecánica y electricista (COPIME). 2017
Tipo de participación: Conferencista

3) Título: Variability in chlorophyll fluorescence spectra of eggplant fruit grown under different light environments: case study.
Autores: Ospina Calvo, B., and Lagorio M. G.
Reunión Científica: XIII Encuentro Latinoamericano de Fotoquímica y Fotobiología ELAFOT.
Tipo de Reunión Científica: Congreso.
Lugar y Fecha: Villa Carlos Paz / CORDOBA – ARGENTINA. 2017
Tipo de participación: Conferencista.

4) Título: Efecto del Estrés Hídrico Sobre los Parámetros Fotosintéticos de *Fittonia albivenis*.
Autores: Ospina Calvo, B., and Lagorio M. G.
Reunión Científica: V Congreso de Ciencias Ambientales.
Tipo de Reunión Científica: Congreso
Lugar y Fecha: Consejo profesional de ingeniería mecánica y electricista (COPIME). 2015
Tipo de participación: Conferencista

5) Título: Evaluación de parámetros fotoquímicos de *Fittonia albivenis* en presencia de estrés hídrico.
Autores: Ospina Calvo, B., and Lagorio M. G.
Reunión Científica: Argentina y Ambiente II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental, y II Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental.
Tipo Reunión Científica: Congreso.
Lugar y Fecha: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires CABA. 2015
Tipo de participación: Conferencista.