



Aplicación de las técnicas de medida de fluorescencia para el estudio de la fotosíntesis en la enseñanza práctica de Ecofisiología Vegetal


Asma Boujenna – Universidad AbdelMalek Essâadi – Tetuan, Marruecos

 0000-0002-0023-7759


Vanessa Martos Núñez – Universidad de Granada

 0000-0001-6442-7968

Belén García del Moral Garrido – Universidad de Almería

 0000-0001-9803-9939

Luis F. García del Moral – Universidad de Granada

 0000-0002-0533-2915

Recepción: 02.03.2022 | Aceptado: 16.03.2022

Correspondencia a través de **ORCID**: Luis F. García del Moral

 **0000-0002-0533-2915**

Boujenna A, Martos Núñez, V, García del Moral, B y García del Moral, LF (2022). Aplicación de las técnicas de medida de fluorescencia para el estudio de la fotosíntesis en la enseñanza práctica de Ecofisiología Vegetal. *REIDOCREA*, 11(14), 167-170.

Financiación: Grupo de investigación AGR123 de la Junta de Andalucía y proyecto “SUSTAINABLE” funded by the European Union’s Horizon 2020 Project H2020-MSCA-RISE-2020, Grant Agreement 101007702.

Área o categoría del conocimiento: Fisiología Vegetal

Resumen: La cinética de emisión de fluorescencia por la clorofila tiene gran interés no sólo con propósitos de investigación, sino también para la enseñanza del funcionamiento de la fotosíntesis y su alteración por factores de estrés, ya que informa acerca del estado de las reacciones fotoquímicas. En condiciones de óptimo estado del aparato fotosintético, la energía captada por las clorofilas se invierte, con gran eficiencia, en las reacciones fotoquímicas primarias de la fotosíntesis (más del 90%) y muy poca se disipa en forma de fluorescencia. Por ello, un aumento de la emisión de fluorescencia respecto del nivel basal siempre implica una alteración del proceso fotosintético. El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento práctico por parte de los alumnos de un curso de Ecofisiología Vegetal de las aplicaciones de la emisión de fluorescencia por las hojas al estudio del proceso fotosintético.

Palabra clave: Fluorescencia de la clorofila

Application of fluorescence measurement to the study of photosynthesis in the practical teaching of Plant Ecophysiology

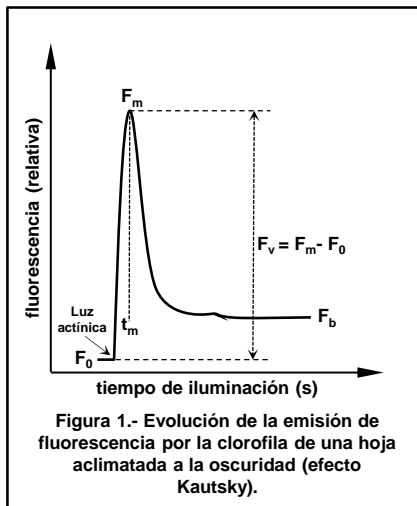
Abstract: The kinetics of fluorescence emission by chlorophyll is of great interest not only for research purposes, but also for the study of the photochemistry of photosynthesis and its alteration by stress factors, since it provides information about the state of photochemical reactions. Under optimal conditions of the photosynthetic apparatus, the energy captured by chlorophylls is used, with great efficiency, in the primary photochemical reactions of photosynthesis (more than 90%) and very little is dissipated in the form of fluorescence. Therefore, an increase in fluorescence emission compared to the basal level always implies an alteration in the photosynthetic process. The objective of this work is to contribute to the practical knowledge by the students of a Plant Ecophysiology course of the applications of fluorescence emission by leaves to the knowledge of the photosynthetic process.

Keyword: Chlorophyll fluorescence

Introducción

Cuando la energía de la luz es absorbida por las clorofilas, puede emplearse en varios procesos, siendo el más importante la fotoquímica que inicia el transporte electrónico de la fotosíntesis. No obstante, una pequeña cantidad de la energía absorbida es emitida de nuevo a través de fluorescencia. La luz reemitida en este proceso tiene una longitud de onda más larga que la absorbida, de forma que puede distinguirse de la luz reflejada mediante la utilización de filtros adecuados (Lambers et al., 1998; Krause y Weiss, 1991).

Si una hoja se mantiene bajo iluminación constante siempre emite la misma cantidad de fluorescencia, denominada fluorescencia basal o estable. Sin embargo, después de un período de oscuridad (entre 20 y 30 minutos), los centros de reacción del FSII están



abiertos (es decir, sin haber aceptado electrones) y la fluorescencia clorofílica es mínima (F_0), ya que la energía luminosa captada se va a consumir en las reacciones fotoquímicas iniciales. A medida que los centros de reacción van aceptando electrones y se van cerrando, comienza a emitirse fluorescencia hasta un máximo (F_m) con todos los centros de reacción cerrados (es decir, reducidos por captación de electrones), máximo que va a depender de la cantidad de radiación incidente y del estado fisiológico del cloroplasto. La mayor parte de esta fluorescencia se debe a la clorofila *a* del centro primario de reacción del FSII y en una pequeña fracción a la clorofila tipo P_{700} del FSI. Una vez que el flujo electrónico se establece entre los dos

fotosistemas, los centros de reacción se abren y cierran secuencialmente, por lo que en un tiempo variable la fluorescencia disminuye hasta estabilizarse en el nivel basal (F_b) como hemos indicado. Es importante señalar que la F_m es directamente proporcional a la intensidad de la iluminación. El declive del máximo de fluorescencia se denomina atrapamiento o atenuación (*quenching*) de la fluorescencia y se debe a las reacciones que disipan la energía de la molécula de clorofila en su retorno desde el estado excitado a su estado fundamental y que, por ello, disminuyen la emisión de fluorescencia. Estas reacciones son el *Quenching Fotoquímico* (QF), es decir, la propia reacción fotoquímica de separación de cargas, y el *Quenching No Fotoquímico* (QNF) o disipación de energía por procesos que incluyen la relajación térmica de las clorofilas mediante emisión de calor, la transferencia energética desde las clorofilas a pigmentos no fotosintéticos de la antena del FSII (betacaroteno principalmente) y el funcionamiento del ciclo de las xantofilas. Cuanta más energía se utilice en estos procesos, menos energía quedará disponible para la emisión de fluorescencia. Por ello la disminución de F_m por mayor disipación de energía al aumentar el QNF, se considera un mecanismo fotoprotector, siempre que no haya aumento de F_0 , ya que esto último indicaría daño a los fotosistemas. La cinética de este proceso se conoce como efecto Kautsky (Figura 1) y posee gran interés para el estudio del proceso fotosintético (Bolhar-Nordenkampf y Öquist, 1993; Schreiber et al., 1995).

Objetivo

El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento práctico por parte del alumnado de un curso de Ecofisiología Vegetal de las aplicaciones de la emisión de fluorescencia por las hojas al estudio del proceso fotosintético.

Método

Las medidas de emisión de fluorescencia se realizarán con un fluorímetro Hansatech denominado *Plant Efficiency Analyser* (PEA) y una sonda que utiliza 6 LEDs (*Light emitting diodes*) con una intensidad saturante de $2400 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, correspondientes a una luz actínica no modulada, con un pico a 650 nm de λ emitida durante un tiempo de 5 segundos. Dado que para cada especie vegetal existe un óptimo de tiempo de aclimatación a la oscuridad, así como de nivel de iluminación, para obtener resultados plenamente fiables es necesario averiguar estos parámetros antes de comenzar con los registros. Para ello, y usando un nivel de iluminación del 75%, se realizarán medidas a intervalos de entre 2 y 5 minutos hasta que se obtengan niveles constantes de la relación F_v/F_m . Análogamente, para obtener el nivel óptimo de iluminación, una vez fijado el tiempo recomendable, incrementar el nivel de iluminación

a intervalos del 10% hasta obtener también un nivel constante de la relación Fv/Fm. El material vegetal objeto de estudio serán hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*). Con objeto de estudiar la influencia de la temperatura sobre el proceso fotosintético a través de la emisión de fluorescencia, se prepararán lotes de hojas mantenidas a 0, 10, 20, 30 y 40°C. La emisión de fluorescencia se medirá sobre 5 hojas durante un tiempo de 5 segundos.

Resultados

Una vez realizadas las correspondientes medidas de fluorescencia, los datos se almacenan en la memoria del instrumento para su transferencia al ordenador. Los parámetros de fluorescencia determinados por el PEA son: la fluorescencia basal (Fo), fluorescencia máxima (Fm), fluorescencia variable (Fv) que corresponde a la diferencia entre la fluorescencia máxima y la fluorescencia basal ($Fv = Fm - Fo$), la relación entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima (Fv/Fm), el tiempo medio de emisión de la fluorescencia máxima (tm) y el área bajo la curva de fluorescencia. Mediante el software del instrumento traspasar los datos al ordenador en forma de una hoja de Excel para su análisis.

Anotar en forma de tabla los valores anteriores suministrados por el fluorímetro para cada uno de los tratamientos de temperatura. Calcular los valores medios de las 5 hojas usadas en cada tratamiento. Representar mediante diagramas de barras los valores medios de Fm, Fo, Fv, Fo/Fm y Fv/Fm obtenidos por tratamiento en función de la temperatura aplicada a cada uno de los tratamientos. En este estudio, debido al estrés de temperatura por frío y por alta temperatura, disminuirá la fluorescencia máxima (Fm), la fluorescencia variable (Fv) y la relación Fv/Fm, mientras aumentará la fluorescencia inicial (Fo).

Discusión

Debido a la simplicidad y rapidez de las medidas con los equipos desarrollados recientemente, las técnicas de fluorescencia se están revelando como uno de los métodos auxiliares más interesantes en Ecofisiología Vegetal (Murchie y Lawson, 2013). Especialmente relevante es la relación Fv/Fm, ya que indica el rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica del FSII (Genty et al, 1989) e informa inmediatamente del estado del FSII. En general se considera que un valor por encima de 0.800 indica un estado de normalidad y que cuanto más disminuya hacia cero, más estrés está sufriendo el aparato fotosintético (Bolhar-Nordenkampf y Öquist, 1993). Además, se ha demostrado que existe una relación lineal entre Fv/Fm y el rendimiento cuántico del FSII, es decir, fotosíntesis neta (mols de CO₂ fijado por mol de fotones absorbidos) (Krall y Edwards, 1992).

Conclusión

Por tanto, la importancia de la fluorescencia de la clorofila para el estudio de la fotosíntesis radica en que es posible estudiar la interacción entre el metabolismo del carbono y el transporte electrónico analizando la atenuación o *quenching* de la fluorescencia. Además, el método es no destructivo y bastante rápido, permitiendo la repetición de las medidas a lo largo del tiempo sobre la misma hoja.

Referencias

Bolh ar-Nordenkampf HR, &  quist G (1993). Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Hall DO., Scurlock JMO, Bolh ar-Nordenkampf H, Leegood RC, Long SP (eds). *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1566-7_12.

Genty B, Briantais JM, & Baker, NR (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990: 87-92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)

Krall JP, & Edwards GE. (2006). Relationship between PSI and PSII activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiol Plant* 86: 180-187. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb01328.x>.

Krause GH, & Weis E (1991). Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 42(1), 313-349. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>

Lambers H, Stuart Chapin, F & Pons TL (2008). *Plant Physiological Ecology*. Second edition. Springer, New York. <https://doi.org/10.2307/176572>

Murchie EH, & Lawson T (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 3983–3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>

Schreiber U, Bilger W, & Neubauer C (1995) Chlorophyll Fluorescence as a Noninvasive Indicator for Rapid Assessment of In Vivo Photosynthesis. In: Schulze ED, & Caldwell MM (eds). *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer Study Edition, Vol. 100. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79354-7_3.