


Determinación semicuantitativa del punto de compensación para el CO₂ en plantas C3 y C4 como práctica experimental en la docencia de Ecofisiología Vegetal


Asma Boujenna – Universidad AbdelMalek Essâadi – Tetuan, Marruecos


Vanessa Martos Núñez – Universidad de Granada


Belén García del Moral Garrido – Universidad de Almería

Luis F. Garcia del Moral – Universidad de Granada

 0000-0002-0023-7759

 0000-0001-6442-7968

 0000-0001-9803-9939

 0000-0002-0533-2915

Recepción: 08.04.2022 | Aceptado: 18.04.2022

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). Determinación semicuantitativa de puntos de compensación para el CO₂ en plantas C3 y C4 como práctica experimental en la docencia Ecofisiología Vegetal. *REIDOCREA*, 11(21), 239-244.

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: El punto de compensación para el CO₂ (Γ_{CO_2}) es el límite mínimo de CO₂ atmosférico necesario para una asimilación fotosintética positiva. Por debajo de este límite los procesos respiratorios predominan sobre los fotosintéticos, la fotosíntesis neta tiene valores negativos y el crecimiento se detiene, con consecuencias negativas sobre el rendimiento y la productividad. Las diferencias en Γ_{CO_2} se han utilizado para seleccionar genotipos con una mayor capacidad de captación de CO₂ y con mejor productividad. El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento práctico, por parte del alumnado de una asignatura de Ecofisiología Vegetal, de cómo se puede calcular el valor del Γ_{CO_2} y su interés para evaluar la eficiencia en la captación de CO₂ por plantas con metabolismo fotosintético C3 o C4.

Palabra clave: Fotosíntesis C3 y C4

Semiquantitative determination of compensation point for CO₂ in C3 and C4 plants as an experimental practice in the teaching of Plant Ecophysiology

Abstract: The compensation point for CO₂ (Γ_{CO_2}) is the minimum limit of atmospheric CO₂ necessary for positive photosynthetic assimilation. Below this limit, respiratory processes predominate over photosynthetic ones, net photosynthesis has negative values and growth stops, with negative consequences on yield and productivity. Differences in Γ_{CO_2} have been used to select genotypes with a higher CO₂ uptake capacity and better productivity. The objective of this work is to contribute to the practical knowledge, by students of a Plant Ecophysiology course, of how the value of Γ_{CO_2} can be calculated and its interest in evaluating the efficiency of CO₂ uptake by plants with C3 or C4 photosynthetic metabolism.

Keywords: C3 and C4 photosynthesis

Introducción

En una hoja iluminada tienen lugar dos procesos metabólicos antagónicos, fotosíntesis con absorción de CO₂ y respiración con desprendimiento de CO₂, manifestándose aquel que en ese momento actúe con mayor intensidad (Lambers *et al.*, 2008; Taiz *et al.*, 2015). Bajo suficiente iluminación, generalmente, la captación de CO₂ debida a la fotosíntesis es mayor que su liberación por los fenómenos respiratorios, por lo que se manifiesta una pérdida neta de CO₂ desde la atmósfera hacia la hoja; pérdida que es despreciable en condiciones naturales, debido a que la turbulencia del aire mantiene una concentración constante de CO₂ alrededor de la hoja. En un recipiente cerrado, por el contrario, la concentración de CO₂ disminuye a medida que es retirado por los tejidos verdes, ya que no existe aporte desde el exterior. No obstante, dado que la intensidad de la fotosíntesis depende de la cantidad de CO₂ presente en el aire, llegará un momento en que la velocidad de captación de este gas por la hoja se iguale con la de cesión por los fenómenos respiratorios, y la concentración de CO₂ en la atmósfera del recipiente permanezca constante. En esta

situación se dice que se ha alcanzado el punto de compensación para el CO₂ (Γ_{CO_2}), es decir, aquella concentración de CO₂ en el aire que provoca que la intensidad de la fotosíntesis se iguale con la de la respiración (Lambers *et al.*, 2008; Taiz *et al.*, 2015). El desprendimiento de CO₂ bajo condiciones de iluminación se debe, en su mayor parte —si no completamente—, a la fotorrespiración y no a la respiración mitocondrial que no se manifiesta en hojas iluminadas (Taiz *et al.*, 2015). Por ello, el punto de compensación indica la eficiencia de captación de CO₂ de una planta en relación con su respiración, es decir, es una medida indirecta de su capacidad fotosintética y de su potencial productivo. No obstante, el valor de Γ_{CO_2} en una misma planta se ve notablemente influido por los factores ambientales y especialmente por las variaciones de temperatura que modifican las tasas de fotorrespiración y respiración mitocondrial (Smith *et al.*, 1976).

En relación con la fijación fotosintética del CO₂, los vegetales con metabolismo fotosintético C3 realizan una sola carboxilación en el estroma del cloroplasto a través del enzima ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), que sintetiza inicialmente una molécula de tres átomos de carbono, el ácido 3-fosfoglicérico. En estas plantas el CO₂ se mueve en forma gaseosa por difusión a través de un gradiente de concentración, desde la atmósfera hasta el estroma del cloroplasto, donde también hay O₂ procedente tanto del aire como del desprendido por la Fotosíntesis. Por ello, las plantas C3 presentan fotorrespiración aparente y su punto de compensación se encuentra entre 40 y 100 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Goldsworthy y Day, 1970; Krenzer *et al.*, 1975; Taiz *et al.*, 2015). Las plantas con metabolismo C4 realizan dos carboxilaciones separadas en el espacio, una en las células más externas del mesofilo a través del enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP) que produce ácidos orgánicos de cuatro átomos de carbono (malato y aspartato, principalmente). Estos ácidos son transportados por un mecanismo unidireccional hacia otras células especializadas que rodean los haces vasculares (células de la vaina), donde son descarboxilados y liberan CO₂, que ahora es usado por la RuBisCO que está concentrada en estas células y que trabaja, por tanto, con una concentración óptima de CO₂. A estas células, además, no llega prácticamente O₂ atmosférico al estar más hundidas en la epidermis y porque las paredes de las células de la vaina son impermeables al O₂. Por esta razón las plantas C4 no tienen fotorrespiración aparente y, su punto de compensación se sitúa entre 0-10 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Goldsworthy y Day, 1970; Krenzer *et al.*, 1975; Taiz *et al.*, 2015).

Objetivo

Determinar el punto de compensación para el CO₂ en distintas especies de plantas C3 y C4 como medida indirecta de su capacidad de captación de CO₂ y de su capacidad fotosintética, como práctica experimental en un curso de Ecofisiología Vegetal.

Método

Esta práctica se basa en un método semicuantitativo para comparar la eficiencia en la captación de CO₂ por distintas especies en atmósferas cerradas (Coombs, 1985). Como cámara de experimentación se utilizará un Erlenmeyer de 250 ml con tapón hermético, al cual se añaden 20 ml de una solución 5 mM de HKCO₃ recientemente preparada y 5 gotas de indicador universal de pH. El material vegetal consistirá en plántulas de garbanzo y judía como plantas con metabolismo fotosintético tipo C3 y maíz y sorgo como plantas C4.

Situar suficientes semillas de las 4 especies en vermiculita húmeda para proceder a su germinación. Con una cuchilla bien afilada, cortar bajo el agua los tallitos con hojas de las plantas germinadas y, sin sacar el corte del agua, introducirlos por su base en un vial de vidrio de 5 ml. Es importante cortar las plántulas bajo el agua para que no entre aire en los vasos del xilema y no se cierren los estomas, de modo que la fotosíntesis pueda seguir

funcionando tras el corte. Escurrir el agua sobrante, pero cuidando que los tallos siempre queden sumergidos en agua. Pasar un hilo alrededor de cada vial y, con cuidado, introducirlo en el Erlenmeyer sin que se derrame. Sujetar el hilo al tapón de modo que el vial con las hojas quede suspendido a unos pocos cm por encima de la solución de KHCO_3 , pero sin llegar a tocarla (tal como indica la Figura 1).

Dado que un perfecto aislamiento resulta un requisito básico, conviene asegurarse de la perfecta hermeticidad del dispositivo mediante la aplicación de un sello de plastilina o similar alrededor del tapón y protegerlo, asimismo, con una lámina de Parafilm. Preparar tres Erlenmeyer para cada tipo de planta y anotar el pH inicial de la solución mediante la estala universal de pH de la Figura 3. La secuencia de intercambios que tendrá lugar en cada Erlenmeyer se presenta en la Figura 2, donde se aprecia que a medida que las hojas consumen el CO_2 del interior del Erlenmeyer, se produce un desplazamiento del CO_2 disuelto en la solución de KHCO_3 hacia la atmósfera del frasco, lo que ocasionará la alcalinización de la solución y una subida de pH.

Para medir la temperatura de la solución de KHCO_3 , colocar junto a los Erlenmeyer un vaso de precipitado lleno de agua con un termómetro. Anotar el pH inicial de la solución de cada Erlenmeyer mediante la escala colorimétrica de la Figura 3. Situar cada cámara a 50 cm aproximadamente de 2 lámparas incandescentes de 150 W y dejarlas equilibrar durante tres horas. Registrar la temperatura cada 10 minutos. Pasadas las tres horas determinar, con una aproximación de 0.5 unidades, el aumento de pH de la solución sin abrir el Erlenmeyer, mediante la comparación de su color con el de la escala universal de pH de la Figura 3.

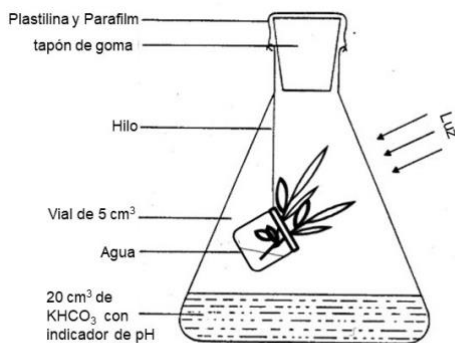


Figura 1.- Cámara de experimentación para la medida del punto de compensación para el CO_2 en plantas C_3 y C_4

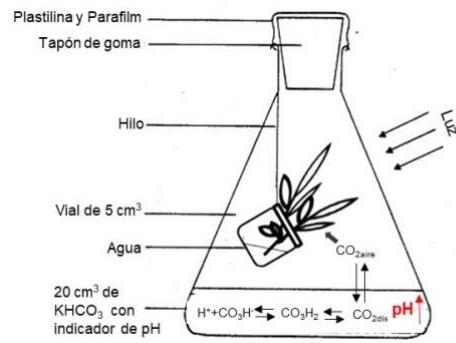


Figura 2.- Ilustración de los intercambios de CO_2 que tienen lugar durante la medida del punto de compensación.

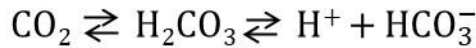


Figura 3.- Escala colorimétrica para medida del pH de las soluciones

Resultados

Cálculo del punto de compensación

A partir del pH de la solución final de bicarbonato puede obtenerse la concentración de CO_2 en la atmósfera del Erlenmeyer, es decir el punto de compensación para el CO_2 de la planta estudiada. En efecto, el CO_2 disuelto como ácido carbónico se disocia para formar iones hidrógeno y bicarbonato:



Por definición, la constante de disociación (K_1) para este equilibrio es (en moles):

$$K_1 = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}$$

Dado que, bajo condiciones normales, la cantidad de ácido carbónico no disociado es menor del 1% puede considerarse que:

$$K_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]}$$

de donde:

$$[\text{H}^+] = \frac{K_2 [\text{CO}_2]}{[\text{HCO}_3^-]}$$

- Por definición: $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$,
- Similarmente: $\text{pK} = -\log [\text{K}]$

Tomando log en la ecuación anterior:

$$\text{pH} = \text{pK}_2 - \log \left(\frac{[\text{CO}_2]}{[\text{HCO}_3^-]} \right) = \text{pK}_2 - (\log [\text{CO}_2] - \log [\text{HCO}_3^-])$$

de donde:

$$\log [\text{CO}_2] = \text{pK}_2 + \log [\text{HCO}_3^-] - \text{pH}$$

Esta ecuación permite conocer la concentración molar de CO_2 en la disolución teniendo en cuenta que $\text{pK}_2 = 0.637$ para la disociación del ácido carbónico y asumiendo que la disminución de la concentración de CO_3H^- es despreciable, ya que se ha puesto una concentración muy elevada. Por tanto, desde estos datos, la concentración de CO_2 en la atmósfera del Erlenmeyer puede calcularse mediante:

$$\Gamma_{\text{CO}_2} = \frac{22,4 \times [\text{CO}_2]}{\alpha} \times 10^6$$

donde,

- Γ_{CO_2} = punto de compensación o concentración molar de CO_2 en el aire ($\mu\text{mol mol}^{-1}$).
- 22,4 = volumen molar normal de un gas.
- $[\text{CO}_2]$ = concentración molar de CO_2 en la disolución ($\mu\text{mol mol}^{-1}$).
- α = solubilidad del CO_2 en $\text{m}^3 \text{CO}_2/\text{m}^3 \text{H}_2\text{O}$ para una temperatura dada, cuyo valor en función de la temperatura se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de la solubilidad del CO_2 (α) en función de la temperatura.

Temperatura °C	α ($\text{m}^3 \text{CO}_2/\text{m}^3 \text{H}_2\text{O}$)
15	0.988
17	0.926
19	0.871
21	0.822
23	0.777
25	0.730
27	0.699
29	0.663
31	0.631
33	0.600

Discusión

La adquisición de CO_2 siempre constituye un problema para las plantas, problema que unas especies solucionan mejor que otras. El punto de compensación para el CO_2 (Γ_{CO_2}) es el límite mínimo de CO_2 atmosférico necesario para una asimilación fotosintética positiva y, por tanto, para el crecimiento adecuado de una planta. Por debajo de este límite los procesos respiratorios predominan sobre los fotosintéticos, la fotosíntesis neta tiene valores negativos y el crecimiento se detiene, con consecuencias negativas sobre el rendimiento y la productividad (Dippery *et al.*, 1995; Tissue *et al.*, 1995). Existen variaciones inter- e intraespecíficas para el Γ_{CO_2} , especialmente entre plantas C_3 y C_4 (Goldsworthy y Day, 1970; Krenzer *et al.*, 1975), pero también entre las especies C_3 (Bauer y Martha, 1981; Bauer *et al.*, 1983), principalmente causadas por diferencias en la conductividad estomática, en la estructura y permeabilidad al CO_2 de las células del mesofilo, en la actividad de los enzimas del Ciclo de Calvin, y especialmente en la intensidad de la fotorrespiración, determinada por la proporción entre la actividad carboxilasa y oxigenasa de la RuBisCO (Tissue *et al.*, 1995; Lambers *et al.*, 2008; Taiz *et al.*, 2015). Actualmente se está investigando sobre la posibilidad de reducir la fotorrespiración en plantas C_3 introduciendo de manera estable múltiples copias de los genes para RuBisCO o induciendo cambios conformacionales en el centro catalítico del enzima para disminuir su actividad oxigenasa (García del Moral y Boujenna, 2020). Precisamente, una de las causas del mayor rendimiento fotosintético de las plantas C_4 se debe a que su RuBisCO se localiza en las células perivasculares, en las que la concentración de CO_2 se encuentra localmente elevada debido al transporte, dependiente de energía, de ácidos de cuatro átomos de carbono desde las células del mesofilo (Lambers *et al.*, 2008; Taiz *et al.*, 2015). Esta liberación de CO_2 en las células de la vaina, sumada a la menor concentración de O_2 (debido a encontrarse más alejadas del aire atmosférico), provoca la disminución de los efectos inhibidores del O_2 sobre la asimilación fotosintética y, por ello, las plantas C_4 se caracterizan por su actividad fotorrespiratoria relativamente baja. Estas observaciones han sugerido la posibilidad de utilizar las técnicas de ingeniería de proteínas para eliminar la actividad oxigenásica de la RuBisCO, pero todavía en la actualidad se discute la viabilidad del procedimiento, ya que la fotorrespiración ejerce un papel protector de la fotosíntesis bajo condiciones de estrés y cierre de estomas en condiciones de elevada iluminación (Taiz *et al.*, 2015; García del Moral y Boujenna, 2020).

Las diferencias en Γ_{CO_2} entre plantas C_3 en atmósferas de baja concentración de CO_2 se han utilizado para seleccionar genotipos con una mayor capacidad de captación de CO_2 y con mejor productividad (Medrano *et al.*, 1995). Aunque la cuantificación exacta del Γ_{CO_2} requiere de instrumentos basados en la absorción de CO_2 en el infrarrojo cercano (Pearcy *et al.*, 2007), la técnica que se presenta en este artículo puede utilizarse para poner de manifiesto las diferencias fisiológicas entre plantas C_3 y C_4 en la intensidad de la fotorrespiración y para comparar la eficiencia en términos relativos en la captación de CO_2 entre especies C_3 (Coombs, 1985).

Cuestiones para el alumnado

- Explicar la secuencia de intercambios que tienen lugar entre la solución de bicarbonato y la atmósfera del Erlenmeyer.
- Este método proporciona una medida semicuantitativa del punto de compensación para el CO_2 , permitiendo la comparación entre diferentes especies. ¿Por qué resulta sólo semicuantitativa? ¿Cómo podría convertirse en cuantitativa?
- Asumiendo un aumento de pH de 8 a 9 con una temperatura media de 25 °C, calcular el correspondiente Γ_{CO_2} .
- Explicar a que se deben las diferencias de Γ_{CO_2} entre plantas C_3 y C_4 .
- Indicar otros tipos de puntos de compensación de la fotosíntesis explicando su significado fisiológico.

Conclusión

La técnica presentada en este artículo permite realizar una determinación semicuantitativa del punto de compensación para el CO_2 que puede usarse para comparar en una clase práctica de Ecofisiología Vegetal la eficiencia en términos relativos de la captación de CO_2 entre especies de plantas con metabolismo fotosintético C_3 o C_4 .

Referencias

- Coombs J (1985). Carbon Metabolism. In: Coombs J, Hall DO, Long SP Scurlock JMO (eds.), Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis, 2nd ed. (pp 139-157). Pergamon Press, Oxford.
- Bauer H, Martha P (1981). The CO_2 compensation point of C-3 plants - A reexamination. 1. Interspecific variability. Z Pflanzenphysiol, 103, 445-450. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(81\)80167-5](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(81)80167-5).
- Bauer H, Martha P, Kirchner-Heiss B, & Mairhofer, I (1983). The CO_2 compensation point of C-3 plants - A reexamination 2. Intraspecific Variability. Z Pflanzenphysiol, 109, 143-154. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(83\)80203-7](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(83)80203-7).
- Dippery JK, Tissue DT, Thomas RB, & Strain BR (1995). Effects of low and elevated CO_2 on C3 and C4 annuals 1. Growth and biomass allocation. Oecologia, 101, 13-20. <https://doi.org/10.1007/BF00328895>.
- García del Moral, LF, & Boujenna, A (2020). Biotechnological approaches to improve carbon fixation in agricultural crops. Mod Concept Devel Agron, 7(3), 721-724. <https://doi.org/10.31031/MCDA.2020.07.000661>.
- Goldsworthy A, & Day PR (1970). A Simple Technique for the Rapid Determination of Plant CO_2 Compensation Points. Plant Physiol, 46, 850-851. <https://doi.org/10.1104/pp.46.6.850>.
- Krenzer EG, Moss DN, & Crookston RK (1975). Carbon dioxide compensation points of flowering plants. Plant Physiol, 56, 194-206. <https://doi.org/10.1104/pp.56.2.194>
- Lambers H, Stuart Chapin F, & Pons Th L (2008). Plant physiological ecology. 2nd edition (pp 5409). Springer, New York.
- Medrano H, Keys AJ, Lawlor DW, Parry MAJ, Azcon-Bieto J, Delgado E (1995). Improving plant production by selection for survival at low CO_2 concentrations. J Exp Bot, 46, 1389-1396. https://doi.org/10.1093/jxb/46.special_issue.1389.
- Pearcy RW, Ehleringer JR, Mooney H, & Rundel PW (2007). Plant Physiological Ecology: Field methods and instrumentation (pp 472). Springer, New York, Berlin.
- Smith EW, Tolbert NE, & Ku HS (1976). Variables affecting CO_2 compensation point. Plant Physiol, 58, 143-146. <https://doi.org/10.1104/pp.58.2.143>
- Tissue DT, Griffin KL, Thomas RB, & Strain BR (1995). Effects of low and elevated CO_2 on C3 and C4 annuals. 2. Photosynthesis and leaf biochemistry. Oecologia, 101, 21-28. <https://doi.org/10.1007/BF00328894>