

**MANUAL DE PRÁCTICAS DE
FISIOLOGÍA VEGETAL**

Víctor Hugo Lallana

María del Carmen Lallana

570	Lallana, Víctor Hugo
CDD	Manual de prácticas de fisiología vegetal / Víctor Hugo Lallana ; María del Carmen Lallana. - 1a ed. 1a reimp. - Paraná : Universidad Nacional de Entre Ríos. UNER, 2017. 226 p. ; 27 x 19 cm. - (Serie Cátedra ; 3)
	ISBN 978-950-698-329-1
	1. Fisiología Vegetal. I. Lallana, María del Carmen II. Título

Primera edición, 300 ejemplares, 2014.

Directora de EDUNER: María Elena Lothringer

Coordinación de la edición: Gustavo Esteban Martínez

Corrección: Ana Lía Pujato

Diseño gráfico: Gabriela Resett

Foto de tapa: *Bletilla striata* en cultivo *in vitro*. Víctor Hugo Lallana, 2012

© LALLANA, Víctor Hugo; LALLANA, María del Carmen

© EDUNER. Editorial de la Universidad Nacional de Entre Ríos

Entre Ríos, Argentina, 2017.

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Resolución C.D. N° 6.794/12

Queda hecho el depósito que marca la ley 11 723.

No se permite la reproducción parcial o total, el almacenamiento, el alquiler, la transmisión o la transformación de este libro, en cualquier forma o por cualquier medio, sea electrónico o mecánico, mediante fotocopias, digitalización u otros métodos, sin el permiso previo y escrito del editor.

Su infracción está penada por las leyes 11 723 y 25 446.

Eva Perón 24, E3260FIB

Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina

eduner@uner.edu.ar

Editado e impreso en Argentina

Colección Cátedra

ISBN 978-950-698-329-1

Fotosíntesis

A. Reacción de Hill

B. Extracción y separación de pigmentos de los cloroplastos

B.1. Cromatografía en capa fina, ascendente simple (TLC)

B.2. Fluorescencia

C. Métodos para identificar plantas carbono 3 y carbono 4

C.1. Examen de la anatomía foliar

C.2. Determinación de clorofila Cla y Clb

C.3. Demostración del punto de compensación de CO₂

D. Factores que afectan la fotosíntesis

D.1. Efecto de la temperatura

D.2. Efecto de la intensidad lumínica

D.3. Ensayo para determinar un factor limitante (dióxido de carbono)

E. Área foliar de un cultivo y la intercepción de la radiación solar

FOTOSÍNTESIS

INTRODUCCIÓN

La fotosíntesis es el mecanismo mediante el cual se puede garantizar que la vida sobre la Tierra no llega a su fin por falta de energía. En esencia consiste en la liberación de oxígeno integrante de la molécula del agua y el almacenamiento del poder reductor resultante en numerosos compuestos carbonados que constituyen la materia viva. Es un proceso de oxidorreducción en que un donador de electrones, el agua, se oxida y un aceptor, el anhídrido carbónico, se reduce.

En el proceso de fotosíntesis en plantas superiores existe un transporte de electrones desde el agua hasta el NADP^+ y está ligado con la producción de O_2 y la formación de ATP. La energía necesaria para este proceso es proporcionada por dos fotoactos que actúan en forma secuencial sobre el mismo electrón, que es conducido del primer centro captador de la luz (fotosistema II) al segundo (fotosistema I) por una cadena transportadora de electrones en la que se encuentran varios citocromos ordenados secuencialmente, en lo que se denomina esquema Z (Fig. 1).

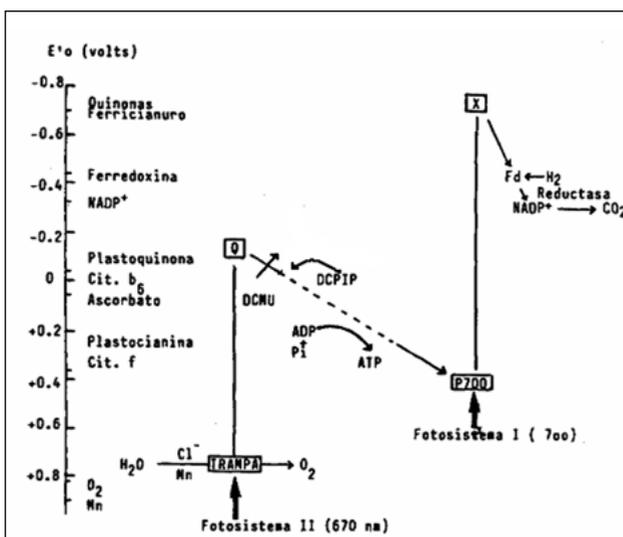


FIGURA 1. Diagrama Z para el transporte de electrones en la fotosíntesis. DCMU: herbicida inhibidor de la fotosíntesis (Diuron). (Tomado de Monerri y Guardiola, 1992)

Si bien este esquema es muy didáctico, en la membrana tilacoide se presenta un ordenamiento estructural más dinámico y asimétrico de estos transportadores (Fig. 2).

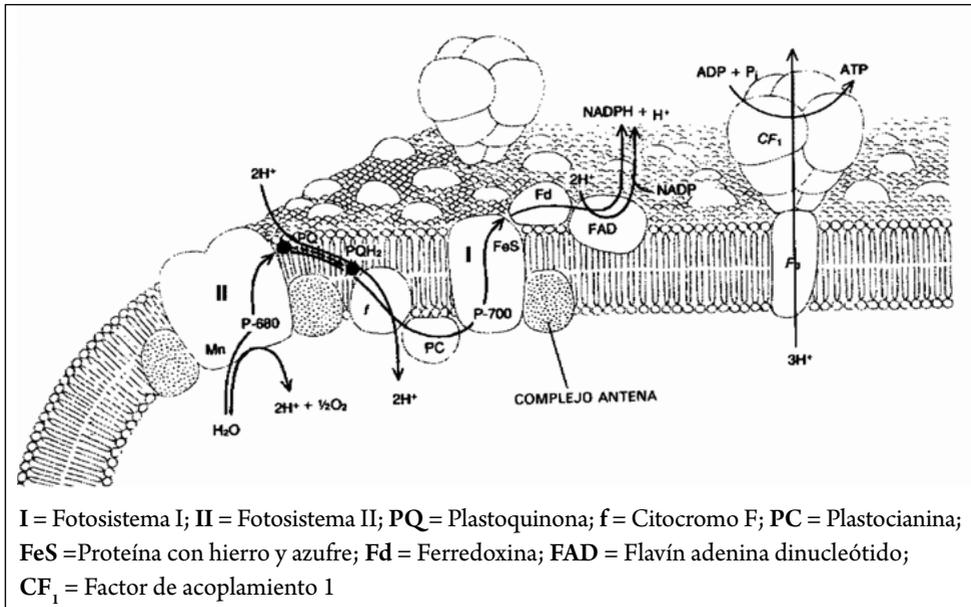
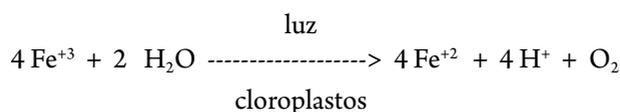


FIGURA 2. Localización de los distintos componentes y fotosistemas en la membrana tilacoide (tomado de Miller 1979)

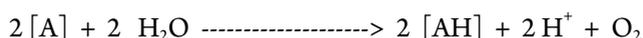
A. REACCIÓN DE HILL

INTRODUCCIÓN

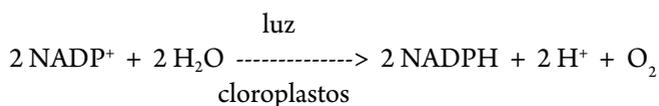
En 1937 R. Hill descubrió que cuando una suspensión de cloroplastos aislados, o fragmentos de cloroplastos, se iluminan en presencia de un aceptor de electrones adecuado, éste es reducido al mismo tiempo que se libera O₂; los electrones se derivan de la cadena transportadora. Es la denominada reacción de Hill, y como aceptores de electrones (los denominados oxidantes de Hill) pueden utilizarse diversas sustancias: complejos de iones férricos, benzoquinona y algunos colorantes, como los derivados del indofenol. La estequiometría de la reacción de Hill cuando se utiliza ferricianuro como aceptor de electrones es:



y en general:



En 1950 Ochoa y Vishniac encontraron que el NADP⁺ podía actuar como reactivo de Hill (aceptor de electrones [A]), según la reacción:



Conocido el papel del NADPH en muchos procesos biosintéticos parecía probable que el NADPH fuese el reductor que, formado en la fase luminosa de la fotosíntesis, se utilizase en la fase oscura para la reducción del CO₂ a carbohidratos, con la regeneración del NADP⁺ que de nuevo sería reducido en el proceso luminoso. El par NADP⁺ / NADPH actuaría pues como una coenzima entre los dos procesos, luminoso y oscuro.

En 1954 Arnon y sus colaboradores encontraron que los cloroplastos iluminados podían formar ATP a partir de ADP y fosfato. Surgía así la posibilidad de que el ATP también se utilizase en el proceso biosintético oscuro y se regenerase en el luminoso.

Efectivamente, NADPH y ATP actúan como los productos formados en la fase luminosa, que convierten CO_2 en carbohidratos en un proceso que no requiere iluminación.

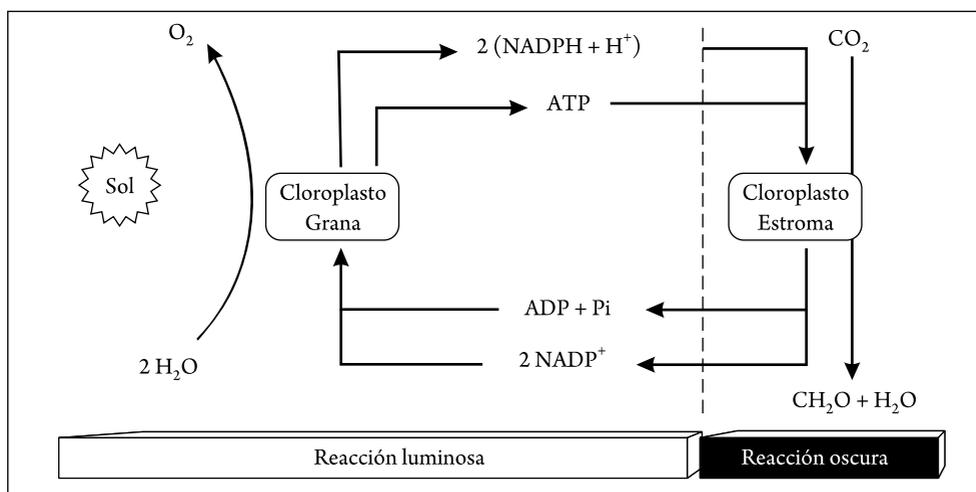


FIGURA 3. Localización de las reacciones luminosa y oscura de la fotosíntesis (adaptado de Mazliak, 1976)

La formación de ATP y poder reductor (ferredoxina reducida que luego reduce el NADP^+) se produce en los tilacoides de los cloroplastos, mientras que la formación de azúcares a partir de CO_2 , NADPH y ATP se produce en el estroma y, alguna etapa, en el citoplasma de las células fotosintéticas (Fig. 3).

Esta reacción permite el estudio del mecanismo de acción de diversas sustancias y agentes de la fisiología de las plantas. Así, es un hecho bien conocido la toxicidad de ciertos herbicidas que inhiben este proceso, que son derivados de la urea (CMU o Monuron, DCMU o Diuron) o triazinas (Simazina). La reacción de Hill se ve también inhibida por detergentes, algunos tampones a concentraciones elevadas (Trís), calor, etc., así como por la ausencia de ciertos iones en el medio (Cl^- y Mn^{++}).



A. REACCIÓN DE HILL

El objetivo del trabajo práctico es demostrar en forma experimental el proceso de óxidoreducción (reacción de Hill) de la fotosíntesis, utilizando como aceptor de electrones [A] un indicador de óxidoreducción (2,6 diclorofenol indofenol) que permitirá visualizar la aceptación de protones por el cambio de color. En estado oxidado: azul, reducido: incoloro.

TÉCNICA OPERATORIA

La experiencia original de Hill fue perfeccionada con posterioridad por otros investigadores y hoy se sabe que anteriores fracasos se debieron a una serie de factores que no se consideraron. Entre otros, que junto con los cloroplastos en la extracción se liberan algunos inhibidores como saponinas y resinas. Este problema no existe cuando se usa como material hojas de espinaca (*Spinacea oleracea*) o acelga (*Beta vulgaris* var. *cycla*).

Si durante la extracción y posterior manipuleo no se somete el jugo extraído a baja temperatura, la actividad de los cloroplastos decae rápidamente. La suspensión de cloroplastos en una solución osmóticamente alta prolonga la conservación y favorece la reacción cuando se transfiere a un medio más diluido.

Tomar 50 ó 100 g de hojas de espinaca, según tubos a utilizar. Licuar durante 30 a 120 seg, previa adición de 60 a 180 mL de una solución de sacarosa 0,5 M. Filtrar en gasa, el filtrado se recoge en un vaso de precipitado (frío). Se centrifuga 30 ó 60 mL del mismo durante 5 minutos a 1000 rpm; descartar el sedimento. Pasar el líquido sobrenadante a otros tubos de centrifuga y centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm, para sedimentar cloroplastos intactos. Eliminar el sobrenadante. Mantener estos tubos en agua fría, dentro de un vaso de precipitado.

Redisolver los cloroplastos en 30 ó 60 mL de solución acuosa fría de metanol al 15 %.

Importante: durante el manipuleo, el material y los reactivos deben mantenerse a temperatura entre 0° y 5 °C.

A cada tratamiento agregar:

- Tubo n° 1: TESTIGO = 3 mL de solución de cloroplastos + 5 mL de solución buffer.
- Tubo n° 2: LUZ = 3 mL de solución de cloroplastos + 5 mL de solución buffer + 0,5 mL de reactivo de óxidoreducción.

- Tubo nº 3: OSCURIDAD = 3 mL de solución de cloroplastos + 5 mL de solución buffer + 0,5 mL de reactivo de óxidorreducción.

- Tubo nº 4: HERVIDO = hervir los 3 mL de solución de cloroplastos, luego agregar 5 mL de solución buffer y 0,5 mL de reactivo de óxidorreducción.

- Tubo nº 5: HERBICIDA: = 3 mL de solución de cloroplastos + 5 mL de solución buffer + 0,5 mL de DCMC (Linuron) o Atrazina + 0,5 mL de reactivo de óxidorreducción.

Colocados los elementos, homogeneizar los tubos por inversión. Colocar los tubos que requieren luz (nº 1-2-4 y 5) a 10 cm de una lámpara de 100 w, a los 5 minutos observar el cambio de color. Colocar el tubo nº 3 dentro del armario 5 min. Observar, interpretar, sacar conclusiones y elaborar el correspondiente informe.

LECTURAS COMPLEMENTARIAS

AZCÓN-BIETO, J. y M. TALÓN (2003). *Fundamentos de Fisiología vegetal*. Cap. IX. McGraw-Hill Interamericana, 522 p.

BARCELÓ COLL y otros (1992). *Fisiología vegetal*. Cap. III. Pirámide, 662 p.

MAZLIAK, P. (1976). *Fisiología vegetal*. Nutrición y metabolismo. Barcelona: Omega, 35° pp.

MILLER, K. R. (1979). La membrana fotosintética. *Invest. y Ciencia* 39: 62-75.

MONERRI, C. y J. L. GUARDIOLA (1992). *Manual de prácticas de Fisiología vegetal*. Departamento de Biología Vegetal. Univesidad Politécnica de Valencia. Servicio de Publicaciones 92.118. 158 p.

SÍVORI, E. y otros (1980). *Fisiología vegetal*. Cap. IV. Hemisferio Sur, 881 p.

RICHTER, G. (1980). *Fisiología del metabolismo*. Cap. II. CECSA, 417 p.



B. EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE PIGMENTOS DE LOS CLOROPLASTOS

INTRODUCCIÓN

Los pigmentos vegetales pueden dividirse en dos grandes grupos, sobre la base de su solubilidad.

a. Solubles en agua: antocianinas y antoxantinas, que se encuentran en el jugo vacuolar.

b. Solubles en solventes orgánicos: clorofilas «a» y «b», carotenoides (rojo, naranja y amarillo) y ficobilinas (ficocianinas y ficoeritrinas), que se encuentran en las granas y tilacoides de los cloroplastos. Son los responsables de la captación de la energía luminosa en el proceso de la fotosíntesis.

Las clorofilas poseen estructura porfirínica, formada por cuatro anillos pirrólicos con un átomo de magnesio en su centro, un anillo de ciclopentanona y un éster de fitol unido a uno de los anillos de pirrol que provee a la molécula de una cola lipófila. La diferencia entre las distintas clorofilas existentes (se conocen al menos siete) se encuentra en los sustituyentes que se presentan; así la clorofila «a» (verde azulada) presenta un grupo metilo ($-\text{CH}_3$) en el carbono 3 (del anillo II), y la «b» (verde amarillenta) un grupo aldehído ($-\text{CHO}$) en la misma posición.

Existen algas que contienen solamente clorofila «a», como las algas azules, las diatomeas, las algas rojas y las pardas. Sin embargo muchas de ellas contienen en los plastidios, pigmentos adicionales tales como otras clorofilas (c, d, e), fucoxantinas (amarillo pardo) y ficocianina (azulado), que comunican sus respectivos colores a las algas.

Entre los carotenoides se encuentran los carotenos (anaranjados), cadenas hidrocarbonadas de unos cuarenta átomos de carbonos, y las xantófilas (amarillas u ocre), que son derivados oxigenados de aquéllos. Las fórmulas estructurales de las clorofilas «a» y «b», b-carotenos y la luteína (una xantófila) se presentan en la Figura 1.

Clorofilas y carotenoides se encuentran en estrecha asociación entre sí y con proteínas y lípidos de las membranas en los grana de los cloroplastos. Los pigmentos fotosintéticos pueden extraerse de los tejidos gracias a su solubilidad en

disolventes orgánicos como éter y benceno. Sin embargo, para que su extracción sea completa el primer paso –la trituration– no se realiza con estas sustancias sino con otras que además de disolver los pigmentos sean solubles en agua, como acetona o alcohol etílico, ya que gran parte del peso fresco de los tejidos vegetales corresponde al agua. Luego el extracto acetónico o alcohólico se mezcla con éter o benceno, en los que se disuelven las clorofilas y parte de los carotenos y xantófilas.

Para el análisis de los carotenoides se utiliza un disolvente distinto, el hexano.

En hexano se disuelven perfectamente los pigmentos carotenoides pero también se solubilizan en parte las clorofilas, por lo que es necesario eliminarlas de la solución como paso previo a la lectura espectrofotométrica del extracto. La eliminación se lleva a cabo por saponificación del grupo éster de las clorofilas, lo que las hace insolubles en este disolvente.

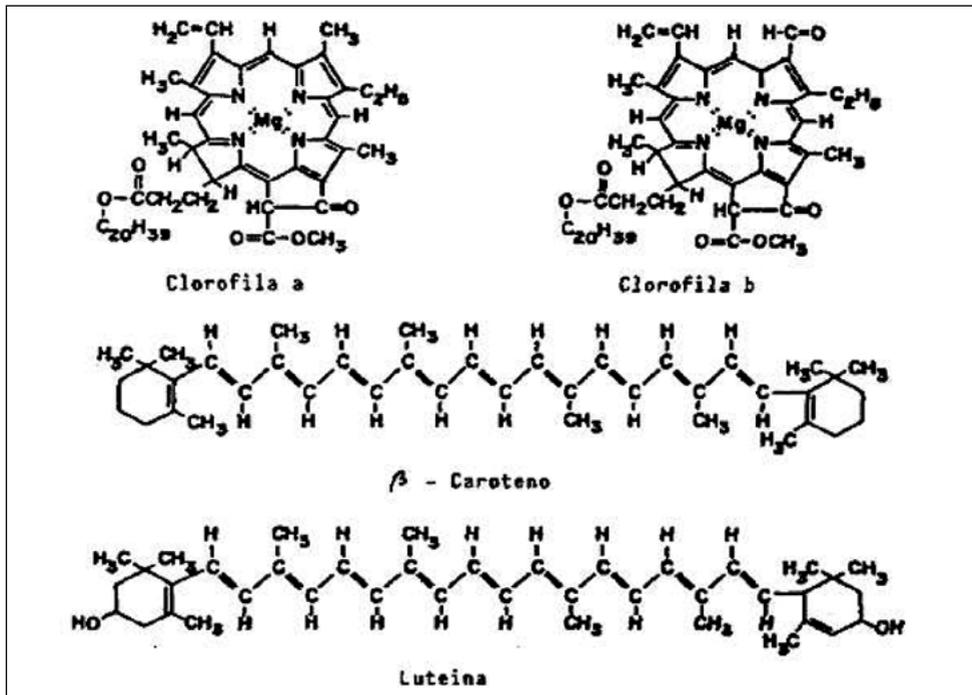


FIGURA 1. Estructura de cuatro pigmentos comunes en el cloroplasto (tomado de Monerri y Guardiola, 1992)

La mezcla de pigmento así obtenida puede separarse mediante cromatografía en capa fina utilizándose un eluyente adecuado, identificándose los pigmentos por su comportamiento cromatográfico y espectro de absorción en la zona azul-violeta (429 nm la clorofila «a» y 453 nm la clorofila «b») acompañada de una absorción secundaria en la zona del rojo (660 nm la clorofila «a» y 643 la clorofila

«b»). Los carotenoides presentan un espectro de absorción de triple banda en la región de 400 a 500 nm. En la Figura 2 se presenta el espectro de absorción de las clorofilas «a» y «b» (Fig. 2a) y de los α -carotenos y una xantófila (Fig. 2b).

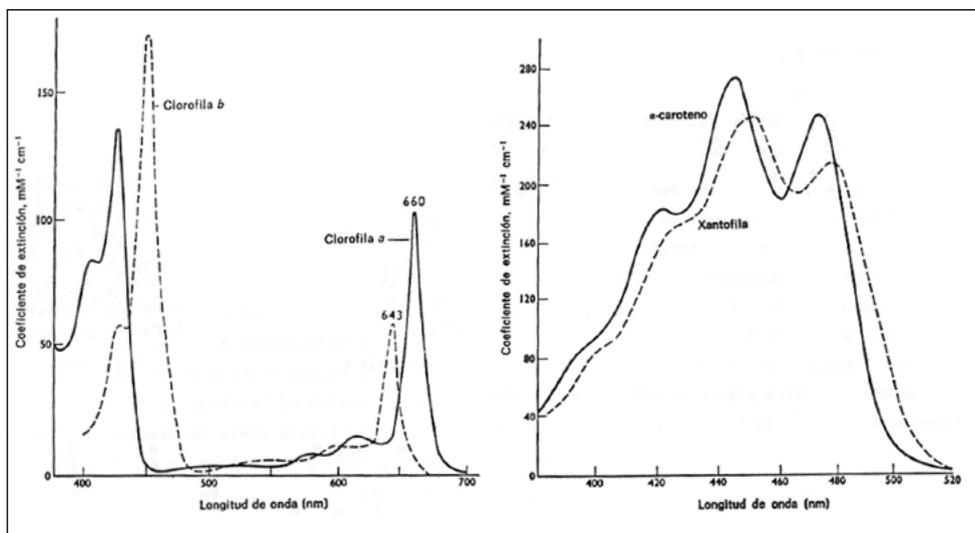


FIGURA 2. a) Espectro de absorción de las clorofilas a y b; b) el α -caroteno y una xantófila (tomado de Richter, 1972 y Barceló Coll *et al.*, 1992)

Cuando una solución de clorofila es iluminada con luz blanca o azul se produce un fenómeno de excitación molecular, observable por la emisión de luz de color rojo vinoso intenso. La luz emitida por fluorescencia es siempre de mayor longitud de onda y de menor energía que la luz incidente, pues siempre algo de esa energía se disipa en forma de calor. Esta emisión de luz por parte de la clorofila demuestra que es capaz de realizar reacciones fotoquímicas.

Las clorofilas son poco estables *in vitro*, en especial bajo iluminación intensa. El átomo central de magnesio es fácilmente reemplazado por hidrógeno, dando lugar a las feofitinas respectivas, pigmentos de color pardo oliva.

Los pigmentos migran a distintas velocidades de acuerdo con su solubilidad. De este modo pueden diferenciarse y cada compuesto ser definido por una magnitud específica denominada R_f (relación de frente), que tiene valores entre 0 y 1.

$$R_f = \frac{e}{h}$$

e = distancia que separa el centro de la mancha inicial, del producto revelado por arrastre

h = distancia entre el centro de la misma mancha y la línea frontal del disolvente.

Si $e=0$ el $R_f=0$ es decir no hay separación del producto.

Si $e=h$ el $R_f=1$ es decir que el producto asciende hasta igual nivel que el solvente.



B. EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE PIGMENTOS DE LOS CLOROPLASTOS

El trabajo práctico tendrá como objetivos separar en forma cualitativa los pigmentos fotosintéticamente activos y, en la segunda parte, verificar la capacidad de excitación molecular de la clorofila en solución.

TÉCNICA OPERATORIA

B.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA, ASCENDENTE SIMPLE (TLC)

Básicamente, la cromatografía en capa fina es la técnica de separación e identificación de sustancias químicas, por medio de un disolvente que se mueve por una capa delgada de un adsorbente idóneo. Este adsorbente, en general con un adhesivo, se deposita sobre una hoja de vidrio o de otro material que actúa como soporte inerte de la capa. Para preparar la capa se hace una masa o pasta de materiales finamente molidos y mezclada con un líquido apropiado como el agua se coloca sobre la lámina de vidrio, se la extiende como una cubierta fina y lisa y se seca. En este trabajo práctico se utilizará sílica gel G 254 para preparar las placas. El adsorbente, una vez seco, se adhiere a la lámina.

Se activan las placas en estufa colocándolas a una temperatura de alrededor de 100 °C, durante 15 minutos. Luego se retiran y se colocan en el desecador, que contiene una caja de Petri con sílica gel, hasta que se enfríe; de esta manera se elimina el agua de la placa.

Luego se coloca la mezcla de los solventes (75:25 éter de petróleo-acetona) en la cuba de cromatografía hasta saturar (tiempo estimado, 45 min a 1:30 h). Este paso se realiza para evitar distorsión en el frente de la cromatografía y en la separación de lo sembrado.

Para la extracción de clorofilas y carotenoides: pesar dos gramos de material vegetal (peso fresco) y triturar en mortero con una mezcla de acetona-hexano a partes iguales. Filtrar con vacío, reextrayendo si es necesario hasta que la pulpa quede incolora y aforar el filtrado a 25 mL con la mezcla de extracción.

Pasar el extracto así obtenido a un embudo de decantación que contiene 10 mL de hexano y añadir unos 25 mL de agua destilada, resbalando por la pared del embudo. Esperar unos minutos, desechar la fase de acetona-agua y del remanente (pigmentos totales) tomar una alícuota. Añadir 5 mL de alcohol metílico saturado de KOH, agitar y dejar reposar hasta que se separe la fase alcohólica con las clorofilas saponificadas, y desechar éstas.

Para realizar la cromatografía se extrae parte del extracto con una jeringa y aguja para insulina, se coloca una gota del extracto en la parte inferior de la placa a 1 cm del borde blanco inferior, se seca con secador de cabello con aire frío, para que no se difunda la gota. Se coloca la segunda gota y se repite la operación. Colocar en total no más de 5 gotas.

Luego se colocan las placas en la cuba de cromatografía, se tapa o se cubre con vidrio para no perder la saturación de la misma y se coloca en oscuridad hasta que ascienda el solvente hasta 3/4 partes de la placa (aproximadamente 1 hora).

Una vez que se verifique la separación se retiran las placas, siempre tomándolas de los bordes, sin tocar la zona blanca; se las coloca sobre una mesa, se marca sobre los costados el frente del solvente (para luego calcular la Rf), luego se seca la placa con el secador de aire frío. Se marcan con una punta fina las diferentes manchas, para los cálculos posteriores de Rf.

B.2. FLUORESCENCIA

Macerar 20 gramos de espinaca con un poco de alcohol etílico al 95 %, decantar y filtrar (con gasa y/o algodón); agregar más alcohol etílico, seguir macerando y repetir el proceso. En total no usar más de 120 mL. El producto así obtenido se utilizará para observar la fluorescencia de la clorofila, iluminándolo con una fuente de luz paralela (aparato de proyección, lámpara de microscopio, etc.).

LECTURAS COMPLEMENTARIAS

- AZCÓN-BIETO, J. y M. TALÓN (2003). *Fundamentos de Fisiología vegetal*. McGraw Hill - Interamericana, 522 p., Cap. IX.
- BARCELÓ COLL y otros (1992). *Fisiología vegetal*. Madrid: Pirámide, 662 p.
- CÓRDOBA, C. V. (1979). *Biología celular y molecular*. Madrid: Blume, 476 p., Cap. III.
- FOGG, G. B. (1967). *El crecimiento de las plantas*. Bs. As: EUDEBA, pp. 100-164.
- JAMES, W. O. (1967). *Introducción a la Fisiología vegetal*. Barcelona: Omega, 328 p., Cap. I.
- MILLER, E. V. (1967). *Fisiología vegetal*. México: Uteha, 344 p., Cap. IV.
- MONERRI, C. y J. L. GUARDIOLA (1992). *Manual de prácticas de Fisiología vegetal*. Departamento de Biología Vegetal, Universidad Politécnica de Valencia, 158 p.
- RICHTER, G. (1972). *Fisiología del metabolismo*. México: CECSA, 417 p.
- SÍVORI, E. ; E. R. MONTALDI y O. H. CASSO (1980). *Fisiología vegetal*. Bs. As.: Hemisferio Sur, 681 p., Cap. VIII.

C. MÉTODOS PARA IDENTIFICAR PLANTAS CARBONO 3 Y CARBONO 4

INTRODUCCIÓN

Al estudiar el intercambio neto de CO_2 en plantas superiores pueden diferenciarse tres tipos básicos de comportamientos. Dos grupos de plantas cuyo incremento diario en materia orgánica se debe exclusivamente a la fijación diurna de CO_2 y un tercer grupo que presenta una ganancia neta de CO_2 diurna y nocturna.

La fotorrespiración es un proceso oxidativo, que ocurre en simultáneo con la fotosíntesis, dependiente de ella y que hace perder hasta un 50 % del CO_2 consumido para fotosíntesis. Es un proceso que depende de la intensidad de luz, lo que indica que se trata de un sustrato producido durante el metabolismo fotosintético y que además es muy sensible a la temperatura.

Existen plantas con fotorrespiración (C3) y sin fotorrespiración aparente (C4), que presentan características propias que permiten su diferenciación, a saber:

CARACTERÍSTICAS DE LAS PLANTAS C3	CARACTERÍSTICAS DE LAS PLANTAS C4
Estructura foliar con parénquima en empalizada, sin vaina.	Vaina vascular de células parenquimáticas envolviendo los haces vasculares.
Cloroplastos con grana y almidón.	Cloroplastos de las células de la vaina sin grana y presencia de almidón en los mismos.
Primer producto estable de la fijación del CO_2 : fosfoglicerato (PGA) de tres carbonos (C3) y fosfoglicolato (C2).	Primer producto estable de la fijación del CO_2 : malato y/o aspartato, compuestos de cuatro carbonos (C4).
Con fotorrespiración.	Sin fotorrespiración aparente o nula.
Temperatura óptima de crecimiento 25-30°C.	Temperatura óptima de crecimiento 35-40°C.
Punto de compensación del CO_2 entre 30 y 70 ppm.	Punto de compensación del CO_2 entre 0 y 10 ppm.
Aumento de la tasa fotosintética de fijación de CO_2 por remoción de O_2 .	No aumento de la tasa fotosintética de fijación de CO_2 por remoción de O_2 .

Ejemplos de plantas C3: *Triticum* spp; *Spinacea oleracea* (espinaca); *Avena sativa* (avena); *Beta vulgaris* (remolacha); *Beta vulgaris* var. *cycla* (acelga); *Cucumis sativus* (pepino); *Dactylis glomerata* (pasto ovillo); *Eucaliptus* spp (eucalipto); *Festuca* spp (festuca); *Glycine max* (soja); *Lycopersicum esculentum* (tomate); *Medicago sativa* (alfalfa); *Oryza sativa* (arroz); *Phalaris arundinacea* (falaris); *Phaseolus vulgaris* (poroto).

Ejemplos de plantas C4: *Cynodon dactylon* (gramilla); *Chloris gayana* (grama rodes); *Digitaria sanguinalis* (pasto cuaresma); *Echinochoa crus-galli* (capín); *Panicum elephantipes* (canutillo); *Panicum milliaceum* (mijo); *Paspalum dilatatum* (pasto miel); *Paspalum repens* (canutillo); *Saccharum officinarum* (caña de azúcar); *Salsola kali* (cardo ruso); *Setaria italica* (moha); *Setaria geniculata* (cola de zorro).

Ejemplos de plantas CAM: especies de las familias: Bromeliáceas, Crasuláceas y Euphorbiáceas, entre las que se destacan *Bryophyllum*, *Crassula*, *Kalenchoe*, *Opuntia*.

La técnica de observación del punto de compensación del CO₂ es muy simple y puede emplearse en forma rutinaria en cualquier laboratorio para demostrar visualmente la clara diferencia que existe entre las plantas C3 y C4 en sus puntos de compensación de CO₂ y por supuesto en el campo.

El punto de compensación del CO₂ puede ser cualitativamente diferenciado usando un adecuado indicador de pH que exhibe un cambio de color basado en la concentración del CO₂ ambiental. La relación de clorofila Cla/Clb se determina por la absorbancia de las clorofilas Cla y Clb en acetona al 80 %. Esta experiencia esboza algunas técnicas simples que pueden emplearse para identificar plantas C3 y C4. El examen al microscopio también ayuda a desarrollar capacidad para observar los detalles de anatomía foliar y puede además extenderse a registrar más detalles de la estructura de la hoja, tales como tamaño de las células del mesófilo, espesor de la hoja, número de capas de células a través de la hoja, etc.



C. MÉTODOS PARA IDENTIFICAR PLANTAS CARBONO 3 Y CARBONO 4

El objetivo de este trabajo práctico es diferenciar plantas C3 y C4, a través de la anatomía foliar, la relación clorofila a/b y el punto de compensación del CO₂.

TÉCNICA OPERATORIA

C.1. EXAMEN DE LA ANATOMÍA FOLIAR

Se preparan secciones de hojas de espinaca, avena, *Paspalum repens* y maíz, tan delgadas como sea posible. Para ello, lavar y cortar las hojas en trocitos de 1 × 2 cm colocándolas en caja de Petri. Montar un trocito sobre una zanahoria o papa (tipo micrótopo, como soporte) y tomar varias series de secciones transversales delgadas, con la ayuda de una hojita de afeitar o bisturí. Hacer un examen preliminar bajo el microscopio y elegir la hoja de sección más delgada; montarla sobre un portaobjetos en 10 % de glicerol y colocar un cubreobjeto sobre ella. Teñir otra sección delgada con solución de iodo (2 % iodo en 15 % IK) por aproximadamente 20-30 segundos y montarla en glicerol. Observe al microscopio los siguientes detalles en la anatomía de la hoja:

- a. Presencia o ausencia de células de la vaina del haz vascular.
- b. Naturaleza de las células del mesófilo: estructura difusa o radiada.
- c. Presencia o no de cloroplastos en las células de la vaina del haz.
- d. Orientación de los cloroplastos (si están presentes) en la vaina del haz.
- e. Ubicación del almidón en los cloroplastos del mesófilo y de la vaina del haz.
- f. Número de células del mesófilo y distancia entre los haces vasculares adyacentes.

Registre sus observaciones para el informe.

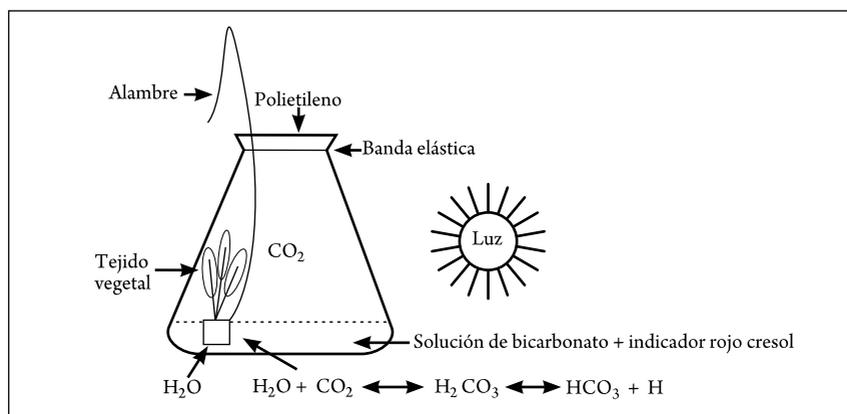
C.2. DETERMINACIÓN DE CLOROFILA Cla Y Clb

Las clorofilas Cla y Clb se extraen con acetona. En acetona al 80 %, la Cla tiene un pico de absorción de aproximadamente 665 nm y Clb de 649 nm, la absorción puede medirse en un espectrofotómetro y las cantidades actuales pueden calcularse con ayuda de una fórmula desarrollada por Vernon.

Lavar las hojas y secarlas con papel secante; picar o moler 250 mg de hojas con una pizca de arena y CO₃Ca en un mortero pequeño usando acetona al 80 %. Homogeneizar a 25 mL y filtrar. Leer la absorbancia de la solución clara a 649 nm clorofila b; y 665 nm clorofila a.

0,1 mM, 100 mM HCO_3^- (0,0084 g = 0,1 mM) con 3 a 5 gotas de indicador rojo cresol. Cerrar el erlenmeyer herméticamente con una gruesa capa de polietileno. Iluminar aproximadamente 1 hora y observar el color del indicador en el erlenmeyer.

DISPOSITIVO EXPERIMENTAL



Repetir el experimento con diferentes materiales de plantas. Registrar las observaciones y elaborar el correspondiente informe.

LECTURAS COMPLEMENTARIAS

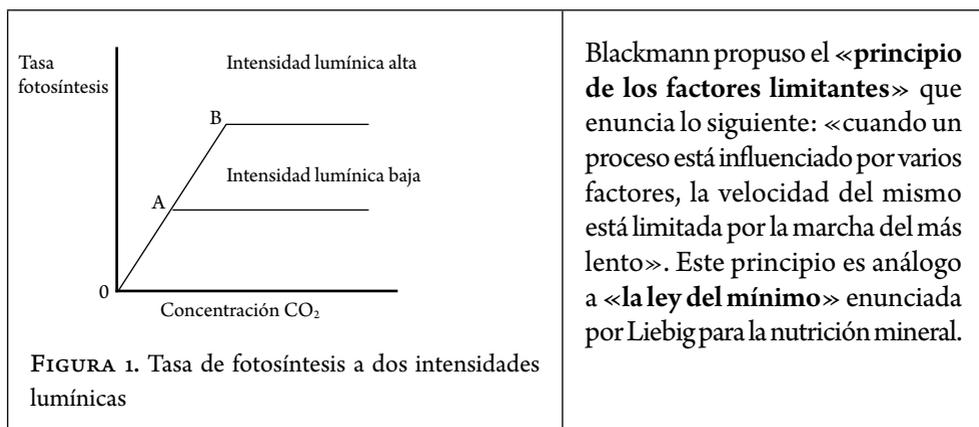
- AZCÓN-BIETO, J. y M. TALÓN (2003). *Fundamentos de Fisiología vegetal*. McGraw-Hill-Interamericana, 522 p., Cap. XIII.
- BARCELÓ COLL *et al.* (1992). *Fisiología vegetal*. Cap. XIV, XV y XVI, p. 241-275. Pirámide, 662 p.
- DEREGIBUS, A. y A. KROPFL (1982). La cosecha de la luz solar mediante el sistema fotosintético C4. *Gaceta Agronómica*, 2(7) 407-416, Bs. As.
- KLUGE, M. *Crassulacean acid metabolism (CAM): CO₂ and water economy*. Serie de traducciones n° 1. Cátedra de Fisiología Vegetal.
- MEDINA, E.; T. DE BIFANO y M. DELGADO (1976). Diferenciación fotosintética en plantas superiores. *Interciencia* 1(2), pp 96-103.
- GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS. *International training course in photosynthesis*. 1979. CEFOTI, Rosario, 18 p.
- MANUAL DE PRÁCTICAS DE FISIOLÓGIA VEGETAL (1999). Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNER, 86 p.

D. FACTORES QUE AFECTAN LA FOTOSÍNTESIS

INTRODUCCIÓN

La fotosíntesis es un proceso influenciado por factores internos y externos o ambientales. Los principales factores **internos** son: edad y genotipo de la planta, estructura de la hoja y su contenido de clorofila, acumulación de los productos de la fotosíntesis en los cloroplastos e influencia de las enzimas del protoplasma. Los factores **externos**: calidad y cantidad de luz incidente en las hojas, temperatura ambiente, concentración de CO_2 , agua y contenido de nutrientes.

En forma experimental se puede demostrar que la fotosíntesis no está limitada por uno sino por una interacción de factores, por lo que para estudiar el efecto de un solo factor se hace necesario mantener el resto constante.



En el primer tramo de la curva la intensidad fotosintética aumenta desde 0 (cero) hasta A, a medida que aumenta la concentración de CO_2 (Figura 1). Al alcanzar el valor A, sucesivos aumentos de esa concentración no determinan una mayor fotosíntesis por ser limitante la intensidad lumínica. Si el nivel de ésta se eleva la tasa fotosintética se eleva hasta el valor de B. En la zona de inflexión de la curva puede ocurrir que dos o más factores actúen como limitantes o que no

haya una influencia simultánea en todas las células o en todos los cloroplastos de una misma célula.

En el proceso de fotosíntesis se emplea menos del 1 % del total de agua que absorbe la planta, pero sus efectos indirectos son importantes. En ecosistemas naturales o agrícolas la fotosíntesis en plantas superiores está principalmente limitada por la disponibilidad de agua. Cuando el agua es limitante, la expansión celular se retarda y el crecimiento se reduce; los estomas se cierran y la entrada de CO_2 se restringe limitando la fotosíntesis.

La intensidad lumínica promedio en un mediodía de verano es del orden de los cien mil (100.000) lux. Aun cuando la intensidad lumínica sea igual no todas las hojas captan con igual eficiencia. Se ha calculado que las hojas de la periferia de un manzano reciben un 1 % más de luz solar que las del interior de la planta.

Los métodos de poda, entre otros objetivos, persiguen modificar la forma de la planta para permitir mejorar la incidencia de la luz.

Con una iluminación muy baja es probable que la intensidad de la respiración sea mayor que la fotosíntesis, se libera más CO_2 del que es utilizado; en el momento en el que el intercambio de gases entre la planta y el ambiente es cero se llega al «punto de compensación de luz», es decir la intensidad luminosa en que se iguala la cantidad de CO_2 liberada por respiración con el CO_2 absorbido por fotosíntesis.

Ante un aumento de la intensidad fotosintética hay mayor consumo de CO_2 y acumulación de productos; en este caso hay fotosíntesis neta.

La concentración de CO_2 en la atmósfera es aproximadamente de 0,03 % en volumen; dicha concentración es relativamente constante y puede llegar a ser limitante a altas intensidades lumínicas o en ambientes como los invernaderos. En este último caso las plantas carecen de suficiente CO_2 para un óptimo crecimiento, lo que es de gran importancia, en especial en invierno, cuando deben permanecer cerrados. Se puede agregar a presión, y se logran aumentos en el rendimiento de plantas ornamentales y hortalizas. Los niveles no deben exceder las 10.000 ppm porque de lo contrario las concentraciones se vuelven tóxicas y los estomas se cierran anulando cualquier posible aumento de la fotosíntesis.

Con respecto a la temperatura, a medida que se incrementa lo hace también la actividad fotosintética, hasta alcanzar un óptimo. El efecto de la temperatura sobre la fotosíntesis depende de la especie y de las condiciones ambientales en las que creció. Para las plantas de interés agrícola los rangos apropiados son de 20 a 30 °C para las C3 y de 30 a 40 °C para las C4.

Cuando la intensidad de la luz o la concentración del CO_2 limitan la fotosíntesis es de esperar que la temperatura tenga poco o ningún efecto sobre el proceso, ya que las reacciones fotoquímicas son insensibles a la temperatura. Cuando el paso más lento es una reacción enzimática, su velocidad y la de todo el proceso se puede aumentar elevando la temperatura.

La influencia de cada factor depende de:

- la especie vegetal;
- ocurre dentro de ciertos límites;
- tiene óptimos distintos para cada especie y,
- puede interrelacionarse con otros.



D. FACTORES QUE AFECTAN LA FOTOSÍNTESIS

El objetivo de este trabajo práctico será determinar la influencia de la temperatura, la intensidad lumínica y la concentración de CO_2 en el proceso fotosintético.

TÉCNICA OPERATORIA

Colocar una solución de CO_3HNa (250 mg en 50 mL de agua destilada o solución de bicarbonato sódico al 0,6 M) en un tubo de ensayo de boca ancha (3 cm) e introducir en él un tallito de Elodea (debe introducirse en forma invertida, es decir la parte cortada hacia arriba. En lo posible el corte debe efectuarse en el agua sin extraer la planta de su medio).

D.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA

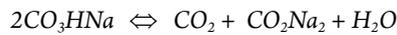
Colocar el tubo en baño María a 30°C , la lámpara deberá ubicarse a 15 cm de distancia. A los 3' comenzar a contar el número de burbujas que se desprendan del extremo del tallito de Elodea, durante 4'. Luego variar la temperatura mediante el agregado de agua fría. Contar nuevamente el número de burbujas desprendidas durante 4' y así sucesivamente.

D.2. EFECTO DE LA INTENSIDAD LUMÍNICA

Colocar la lámpara de 100 w a 15 cm de distancia. Alcanzada la temperatura del baño ($25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) y luego de 4' de iluminación iniciar el recuento de burbujas desprendidas desde el extremo del tallo en el término de 4'. Calcular el promedio por minuto. Modificar la distancia a 20 cm (intensidad) y efectuar un nuevo recuento durante 4'. Calcular el promedio y así sucesivamente repetir la operación a 40 y 60 cm de distancia. Consignar estos datos en planilla: temperatura en $^\circ\text{C}$; intensidad lumínica en vatios; intensidad fotosintética en número de burbujas de O_2 desprendidas por minuto. Recordar que la intensidad lumínica es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia. Graficar los resultados y redactar el informe correspondiente.

**D.3. ENSAYO PARA DETERMINAR
UN FACTOR LIMITANTE (dióxido de carbono)**

Para determinar el momento en el que el CO₂ se convierte en limitante con sucesivos aumentos de la intensidad lumínica se trabaja con la misma técnica operatoria anterior, a 25 °C, pero no se le agrega CO₃HNa. Cuando la intensidad fotosintética no aumenta (se mantiene constante el número de burbujas, el CO₂ se transforma en limitante. Si ello ocurre observar qué sucede ante el agregado de CO₃HNa. El bicarbonato de sodio es el proveedor de CO₂, de acuerdo con la siguiente reacción en la solución.



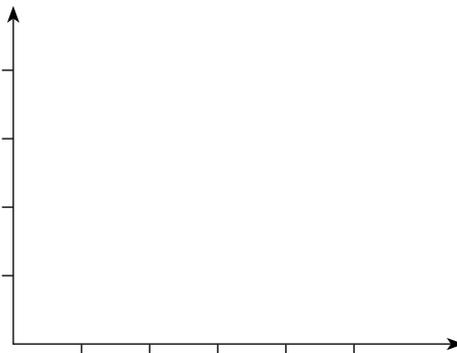
Puede apreciarse una turbidez en el agua debido al depósito de carbonato de sodio insoluble. Graficar los resultados y elaborar el informe correspondiente.

LECTURAS COMPLEMENTARIAS

AZCÓN-BIETO, J. y M. TALÓN (2003). *Fundamentos de Fisiología vegetal*. Mac Graw-Hill-Interamericana, 522 p, Cap. XIII.

BARCELÓ COLL y otros (1992). *Fisiología vegetal*. Cap. XVII, pp. 276-288. Pirámide, 823 p.

BREVEDAN, R., N. CURVETTO y otros (1996). *Guía de trabajos prácticos de Fisiología vegetal*. Dep. de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, 60 p.



E. ÁREA FOLIAR DE UN CULTIVO Y LA INTERCEPCIÓN DE LA RADIACIÓN SOLAR

INTRODUCCIÓN

Del total de energía luminosa que llega al límite de la atmósfera un 52 % corresponde a longitudes de onda del infrarrojo y un 4 % al ultravioleta, por tanto la utilizable fotosintéticamente, entre 400 y 700 nm es aproximadamente un 44 %, denominada radiación PAR. Esta cantidad dependerá de las condiciones climáticas, latitud y época del año. De la cantidad que llega al cultivo una hoja puede absorber el 85 %, según su estructura y el resto es transmitido a hojas inferiores o reflejado. Del total de energía que absorbe una hoja un 95 % se pierde como calor, de manera que en el mejor de los casos sólo un 5 % es utilizado en la fotosíntesis.

En soja, a partir de la expansión de la primera hoja trifoliada se construye la maquinaria fotosintética, principal mecanismo que interviene en la formación de las vainas y los granos. La mayoría de los genotipos presenta una corta fase juvenil durante la cual no responden al fotoperíodo (Shanmugasundaram y Tsou, 1978). En general a partir de V2 la planta comenzaría a ser sensible al fotoestímulo fotoperiódico, que culminaría en el estado de madurez fisiológica R7 (Toledo, 2010).

El área de hojas de la planta es función del número de hojas y del tamaño final de las mismas. Con esta variable estimada en una superficie de suelo conocida en que crece el cultivo se estima el índice de área foliar (IAF), que resulta ser un número adimensional.

Los métodos para determinar área foliar se clasifican, según el tratamiento que se les dé a las muestras, en destructivos, de estimación y no destructivos (Lallana, 1999). Dentro de los primeros se requiere arrancar las hojas de las plantas, es decir requieren la destrucción de la muestra objeto de estudio. La mayoría de esos métodos se desarrollan en laboratorio y entre los más comunes podemos citar el método del planímetro, dibujo de las hojas sobre papel milimetrado y método gravimétrico. Los segundos se basan en la demostración de una relación matemática entre alguna característica biométrica de la hoja (longitud, ancho, diámetro, etc.) o de biomasa (peso fresco o seco de una sección de hoja o de

todas las hojas) y el área foliar. Los métodos no destructivos pueden ser usados a campo sin necesidad de destruir la muestra (arrancar las hojas), por ejemplo planímetros fotoeléctricos o uso de escaner y software.

Las prácticas de manejo, como densidad de plantas y fecha de siembra afectan en forma muy marcada el área foliar por planta.

La tasa de crecimiento del cultivo (TCC) está estrechamente relacionada con la interceptación de radiación solar, la que a su vez depende del índice de área foliar (IAF). La tasa aumenta a medida que aumenta el IAF hasta que alcanza un **valor crítico capaz de interceptar el 95 % de la radiación solar incidente**. El IAF crítico del cultivo de soja se encuentra entre 3,1 y 4,5 y depende de la estructura de la planta, la densidad de siembra y el espaciamiento entre surcos.



E. ÁREA FOLIAR DE UN CULTIVO Y LA INTERCEPCIÓN DE LA RADIACIÓN SOLAR

El objetivo es determinar el área foliar de un cultivo de soja y su relación con la radiación solar interceptada.

TÉCNICA OPERATORIA

Los materiales necesarios para el trabajo de campo son:

- bolsas de polietileno (30 × 35 cm),
- tijera de tusar, cinta métrica,
- cuadro de madera (1 m²),
- planillas para toma de datos,
- cultivo de soja en estado vegetativo (V8),
- ceptómetro.

Para el trabajo en laboratorio:

- tijera,
- escáner,
- hojas de papel A4,
- hojas de folios,
- rótulos,
- balanza.

Para la estimación del área foliar se empleará el método del escáner y software IDRISI® (Lallana, 1999) el cual consiste en se escanear las hojas del cultivo, se calcula un factor de corrección del escáner y se ejecuta el software IDRISI® para determinar el área de las hojas (ver el método completo en Crecimiento y Desarrollo, Práctico A.4).

a. A campo

1. Determinación de la densidad de plantas: ubicar al azar en el cultivo (ej. soja en V8) un cuadro de madera de 1 m² y contar el total de plantas comprendidas dentro del mismo.

2. Determinación de la altura: sobre el 15 % del total de plantas halladas en el m^2 registrar la altura desde la inserción del primer peciolo a la parte superior del canopeo y marcarlas. Calcular el promedio. Seleccionar una planta representativa de ese promedio de altura para medir la radiación solar incidente en los distintos estratos (Figura 1).

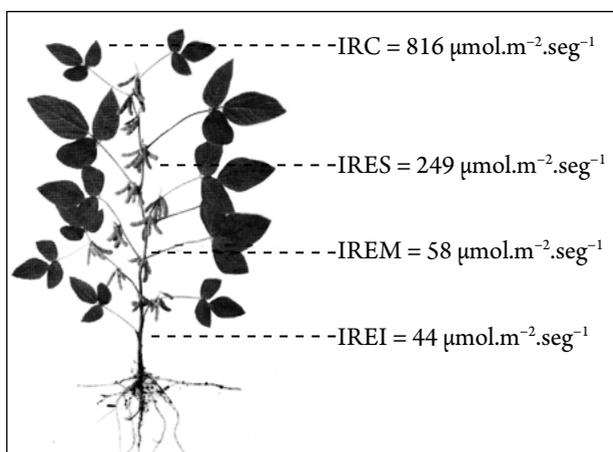


FIGURA 1. Planta de soja con indicación de tres estratos de hojas donde se midió la intercepción de la radiación. IRC: intercepción de la radiación en la superficie del canopeo; IRES: en el límite inferior del estrato superior; IREM: medio e IREI: inferior

3. Medición de la radiación. El promedio de altura de planta calculado se divide por tres. De este modo se estratifica la zona superior, media e inferior de las plantas del metro cuadrado. Sobre la planta representativa de la altura promedio registrar con el ceptómetro la radiación a nivel de canopeo, luego la correspondiente al estrato superior (primeros 15 ó 20 cm de la planta), la del estrato medio (segundos 15 ó 20 cm de la planta) y estrato inferior (últimos 15 ó 20 cm de la planta). El valor se registra en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$.

4. Los puntos 1, 2 y 3 se repiten dos veces más en distintos sitios del cultivo para completar tres repeticiones.

5. Extraer el 15 % de las plantas del metro cuadrado, que fueron previamente marcadas, cortándolas a ras del suelo con tijera de tusar. Colocarlas en una bolsa de polietileno debidamente rotulada (fecha, densidad de plantas correspondientes a ese metro cuadrado). En total se deberá llevar al laboratorio 3 bolsas.

b. En gabinete

1. Sacar todas las plantas de una bolsa (correspondiente a $1 m^2$).
2. Cortar todas las hojas del tercio superior de todas las plantas de soja.
3. Disponer las hojas del tercio superior cortadas, sobre una hoja A4 de 70 g.

4. Escanear las hojas y generar el archivo correspondiente. Como es probable que se requiera más de una hoja A4 para ubicar todas las hojas del tercio superior de las plantas se podrán identificar y nominar los archivos de la siguiente manera:

Sup_D37_H1, Sup. D37_H2ver, ..., siendo:

Sup = hojas del estrato superior;

D37= densidad de plantas de ese m² (en este caso: 37 plantas);

H1= primera hoja A4 en la que se ubicaron las hojas de las plantas.

H2= segunda hoja A4 en la que se ubicó otro grupo de hojas del estrato superior.

De igual forma se procederá con las del estrato medio (en este caso se reemplaza Sup por Med) y las del estrato inferior (se reemplaza Sup por Inf).

De la misma manera se procederá con las plantas de los otros dos metros cuadrados reemplazando el valor de la densidad (D) por el correspondiente a cada m².

Eventualmente se podrá determinar el área foliar por el método gravimétrico (dibujo de hojas, dibujo de un cuadrado de 10 × 10 cm de lado, peso de las hojas de papel en balanza de plato y peso del cuadrado de papel (100 cm²) y por regla de tres simple cálculo del área de las hojas) y realizar una comparación entre ambos métodos o con el método lineal, por ejemplo, en caso de un cultivo de gramínea.

5. Estimación del índice de área foliar (IAF): (ver el método completo en Crecimiento y Desarrollo, Práctico A.4).

El IAF se obtendrá mediante la fórmula:

$$\text{IAF} = \frac{\text{dm}^2 \text{ hojas fotosintetizantes}}{\text{dm}^2 \text{ de suelo}}$$

Se deberá estimar el IAF de cada estrato (superior, medio e inferior) y el IAF del cultivo. Para la determinación del IAF del cultivo se tendrá en cuenta el AF de una planta completa y se multiplicará por la densidad de plantas por dm²

$$\text{IAF} = \text{AF pl} \times \text{N}^\circ \text{ pl dm}^{-2}$$

6. Estimación de la intercepción de la radiación (IR)

Se relaciona la radiación solar incidente en la superficie del canopeo del cultivo (IRC) con la radiación que llega al límite del estrato en cuestión. De esta manera se estima la luz interceptada por ese estrato. Si por ejemplo se pretende estimar la intercepción en el estrato superior (IRES):

$$\% IR = IRES \times 100 / IRC$$

donde IR: porcentaje de intercepción de radiación

Registrar los datos de medición de radiación tomados con el ceptómetro, en la planilla adjunta al final de este protocolo.

7. Relación entre el área foliar y el porcentaje de intercepción de la radiación

Con los datos registrados en la planilla confeccionar una gráfica que muestre la relación entre el IAF y el porcentaje de radiación interceptada desde la superficie del canopeo hasta el estrato inferior. Luego interprete la gráfica y redacte las conclusiones.

LECTURAS COMPLEMENTARIAS

- ANDRADE, F. H.; V. O. SADRAS (2002). *Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja*. Producciones Gráficas Sirio, 450 p.
- AZCÓN-BIETO, J.; M. TALÓN (2003). *Fundamentos de Fisiología vegetal*. Cap. 13 y 30. McGraw-Hill-Interamericana, 522 p.
- BARCELÓ COLL, J.; NICOLÁS RODRIGO, G.; B. SABATER GARCÍA; R. SÁNCHEZ TAMÉS (1992). *Fisiología vegetal*. Cap. XVI. Madrid: Pirámide, 662 p.
- ELIZALDE, J.H.I.; VAIMAN, N.; DE LA CRUZ, V. (2013). Determinación del área foliar de un cultivo y su relación con la intercepción de la radiación solar. In: *Informes de Proyectos de innovación e incentivo a la docencia* (p. 170-180). Eduner, 336 p.
- LALLANA, V.H. (1999). Medición del área foliar mediante escáner y software IDRISI. *Rev. FAVE* 13(2):27-33.
- LALLANA, V.H.; M. del C. LALLANA (2010). *Manual de prácticas de Fisiología vegetal*. 2.ª ed.- Paraná: Universidad Nacional de Entre Ríos, UNER, 111 p.
- SHANMUGASUNDARAM, S. & S.C.S. TSOU (1978). Photoperiod and critical duration for flower induction in soybean. *Crop Sci.* 18: 598-601.
- SÍVORI, E.; E.R. MONTALDI; O.H. CASO (1980). *Fisiología vegetal*. Cap. IV. Hemisferio Sur, 681 p.
- TUTTOLOMONDO, G.; I. ROSBACO; N. PIZZICHINI; S. COLOCCIONI; C. DESTÉFANIS (2008). Soja: incidencia de la defoliación en el rendimiento y sus componentes. *Rev. Agromensaje* N. 26. Facultad de Ciencias Agrarias UNR.
- TOLEDO, R.E. (2010) Cultivo de soja. (Cereales y oleaginosas, FCA-UNC) 34 p. Disponible en: <http://www.buscagcro.com/biblioteca/Ruben-Toledo/El-cultivo-de-soja.pdf> . Consultado el 23/2/2011.

