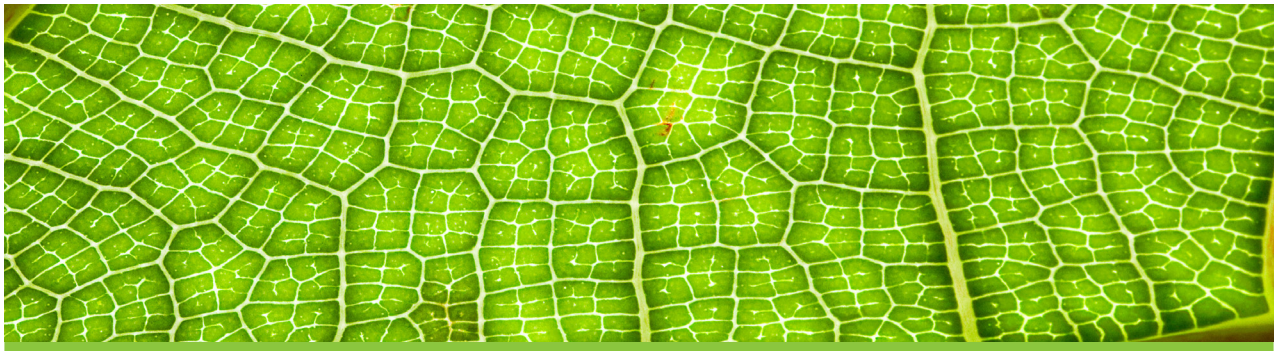


PRINCIPIOS ÓPTICOS PARA EL DISEÑO DE SENSORES NO INVASIVOS DE FOTOSÍNTESIS EN PLANTAS

OPTICAL PRINCIPLES FOR THE DESIGN OF NON INVASIVE SENSORS OF PHOTOSYNTHESIS IN GREEN PLANTS

A. Espinosa Calderón, I. Torres Pacheco, R. Guzmán Cruz, A.A. Fernández Jaramillo, R.F. Muñoz Huerta, J.G. Torres López, R.G. Guevara González* C.A. Ingeniería de Biosistemas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, C.U. Cerro de las Campanas S/N, Colonia Las Campanas, C.P. 76010, Santiago de Querétaro, Querétaro, México.*

José A. Padilla-Medina, Dpto. de Ingeniería Electrónica, Instituto Tecnológico de Celaya, Celaya, Gto.

Autor para correspondencia:
** alejandro.espinosa@uaq.mx,*
** ramon.guevara@uaq.mx*

Fecha de recepción: 23/05/2012
Fecha de aceptación: 07/06/2012

Resumen

La medición de fotosíntesis es útil para que los agrónomos pronostiquen o promuevan la producción de su cultivo. También es útil para estudiar la respuesta fisiológica de la planta ante factores climáticos. Existen diferentes métodos de medición de fotosíntesis, pero estos son destructivos, exclusivos de laboratorio, o invasivos. Un sensor invasivo es indeseable porque interfiere química o físicamente con el analito, interfiriendo así con el comportamiento normal de la planta. Utilizar principios ópticos permite evitar el contacto físico con la planta, generando una forma no invasiva de medición. Existen diversas variables fotosintéticas medibles por principios ópticos, pero, para utilizarlas es necesario primero entenderlas. En este documento se comentan técnicas generales, y también se exponen algunos estudios realizados por los autores, donde respuestas fotosintéticas en plantas puedan relacionarse con cambios en variables ópticas. Estos estudios serán útiles para el diseño de sensores no invasivos de fotosíntesis en plantas.

Palabras Clave: Espectroscopía, Temperatura de Hoja, Termografía infrarroja, Fluorescencia de clorofila.

Abstract

Photosynthesis measurement allows agronomists to forecast or to promote crop production. It is also useful in the study of physiological responses of the plants against different climatic factors. There are different methods for measuring photosynthesis, but all these are destructive, exclusive for laboratory, or invasive. Invasive measurements are undesirable because they interfere physically or chemically with the analyte, interfering also with the normal behavior of the plant. Physical contact can be avoided through optical principles, resulting in a non invasive option of measurement. There are many photosynthetic variables which can be measured by optical principles, but for use them it is necessary first to understand them. In this document are reported some general techniques, an also are exposed some studies carried out by the authors, where photosynthetic responses in plants might be related to optical variables. These studies might be useful for the design of non invasive photosynthesis sensors.

Keywords: Spectroscopy; Leaf temperature; Infrared thermography; Chlorophyll fluorescence.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son el primer eslabón en la cadena trófica. Ellas son denominadas organismos autótrofos, puesto que son capaces de producir sus propios alimentos. Las plantas realizan dicha producción por el proceso denominado fotosíntesis. La fotosíntesis consiste transformar la energía luminosa en energía química. Este proceso se constituye por la fijación de dióxido de carbono (CO2) atmosférico, el cual se transformará en materia orgánica (carbohidratos) para nutrir a la misma planta y en la liberación de oxígeno (O2) como residuo (Espinosa-Calderón y col. 2011a). La fotosíntesis se realiza a través del llamado ciclo Calvin, el cual consta de 3 procesos principales: carboxilación, reducción y regeneración. Según la forma en que las plantas realizan la fase de carboxilación, éstas se pueden dividir en tres tipos: tipo C3, con ejemplos como el chile *(Capsicum annuum L.)*, el frijol *(Phaseolus vulgaris)* y el rábano *(Raphanus sativus)*; tipo C4, con ejemplos como el maíz *(Zea mays)* y el sorgo *(Sorghum vulgare)*; y tipo CAM (del acrónimo en inglés *Crassulacean Acid Metabolism*), con ejemplos como la piña *(Ananas comosus)* y el nopal (Opuntia spp).

De estos tres tipos, las plantas C3 son las más comunes (West-Eberhard y col. 2011). La medición del impacto del medio ambiente en la fotosíntesis es de interés para la agronomía debido a que la productividad de la planta depende fuertemente de los rangos fotosintéticos en el entorno (Taiz y Zeiger, 2010). De forma paralela, es de gran interés para ciencias como la fisiología, la botánica y la biología en general el estudiar la forma en que responde fotosintéticamente la planta a factores climáticos como la temperatura, la sequía, la radiación, la nutrición y el CO2, entre otros.

Existen diferentes métodos de medición de fotosíntesis (Millan-Almaraz y col. 2009), dentro de los más comunes estás: Materia Seca (Hodson y col. 2005), Manométricos (Hunt, 2003), Electroquímicos (Takahashi y col. 2001), Intercambio de Gases (Espinosa-Calderón y col. 2011a; Singh y col. 2011), Método de Isótopos de CO2 (Kawachi y col. 2006) y Ondas Acústicas (Hermand y col. 1998).

Todos los métodos mencionados anteriormente son destructivos, invasivos o exclusivos de laboratorio. Algunas repercusiones negativas de estas características son:

- Estrés mecánico a la planta, ocasionado por encerrar a las plantas, o a partes de ellas, en cámaras plásticas que las someten a presiones y pesos no habituales.

- Daños o destrucción de las plantas o de las muestras al tener que cortarles muestras o secciones para analizarlas en laboratorio.

- Obstrucciones morfológicas referentes a la heterogeneidad de formas y tamaños de las plantas y de sus hojas. Esta desventaja impide que se use la misma cámara para diferentes tipos o edades de las plantas, requiriendo diferentes cámaras con distintas morfologías, encareciendo así los sensores.

- Necesidad de equipo sofisticado de laboratorio, el cual encarece los sistemas de medición e implica el designar un espacio físico para la realización de mediciones.

- Registro lento de datos al tener que tomar muestras y llevarlas hacia el laboratorio para su análisis. En caso del método de materia seca (Hodson y col. 2005), se debe esperar a que se deshidrate la hoja, obteniendo resultados del comportamiento de la planta en el pasado y no en el presente.

Para eliminar las repercusiones negativas que conllevan los métodos invasivos, se requieren sistemas de medición de fotosíntesis que sean no invasivos y eficaces para la su aplicación tanto en laboratorios como *in situ*. Al utilizar la luz como vía de información, los sensores que utilizan principios ópticos permiten realizar mediciones no

invasivas porque no requieren del contacto físico con el analito. Estos sensores son herramientas que satisfacen requerimientos de exactitud, precisión y selectividad del analito, permitiendo mediciones *in vivo* o *in vitro*. La medición óptica se basa en propiedades como: absorbancia, reflectancia y luminiscencia de elementos específicos, o grupos de plantas (Espinosa-Calderón y col. 2011a).

En este documento se comentan algunos experimentos hechos por los autores, así como técnicas generales que involucran principios ópticos (como espectroscopía, termografía y fluorescencia), a través de los cuales es posible desarrollar métodos no invasivos de medición de fotosíntesis. Estos sistemas podrían tener aplicaciones en la automatización de invernaderos y la investigación biológica en campo.

ESPECTROSCOPÍA

Todos los materiales absorben determinados rangos de longitudes de onda dependiendo de las resonancias vibratorias y electrónica asociadas a las moléculas específicas que lo conforman (Agrawal, 2011). Estos experimentos, realizados por los autores de este documento, buscaban encontrar los espectros de absorción óptica de las plantas tipo C_3, C_4 y CAM en los rangos de Ultra Violeta (UV, 100-400nm), Visible (VIS, 400-760nm), Infrarrojo Cercano (NIR, 760 nm a 4 µm), Infrarrojo Mediano (MIR, 4 a 14 µm), e Infrarrojo Lejano (FIR, 14 a 1000 µm) (Espinosa-Calderón y col. 2011b).

Materiales y métodos de espectroscopía

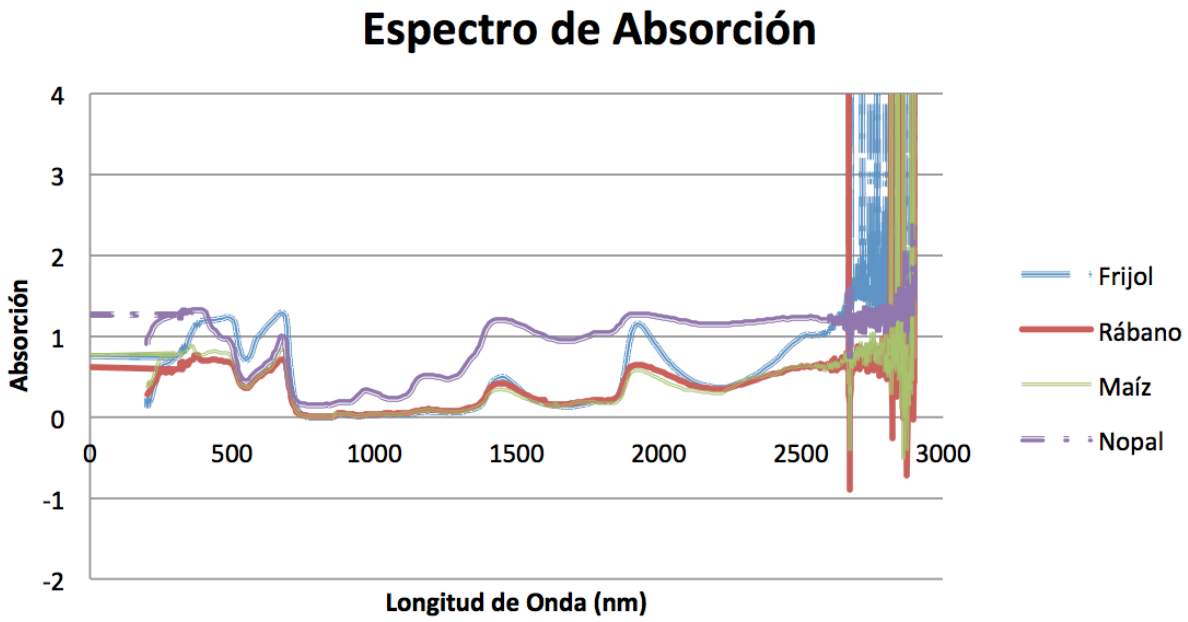
Se utilizaron dos analizadores de espectro: un Perkin Elmer Instruments, LAMBDA 900, UV/Vis/NIR Spectrometer; y un Perkin Elmer, Spectrum BX, FTIR System. Estos dos analizadores son complementarios en sus espectros.

Se colocaron en forma independiente las muestras de chile (*Capsicum annuum L.*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), rábano (*Raphanus sativus*), maíz (*Zea mays*) y nopal (*Opuntia spp*) dentro de los analizadores y se obtuvieron sus espectros.

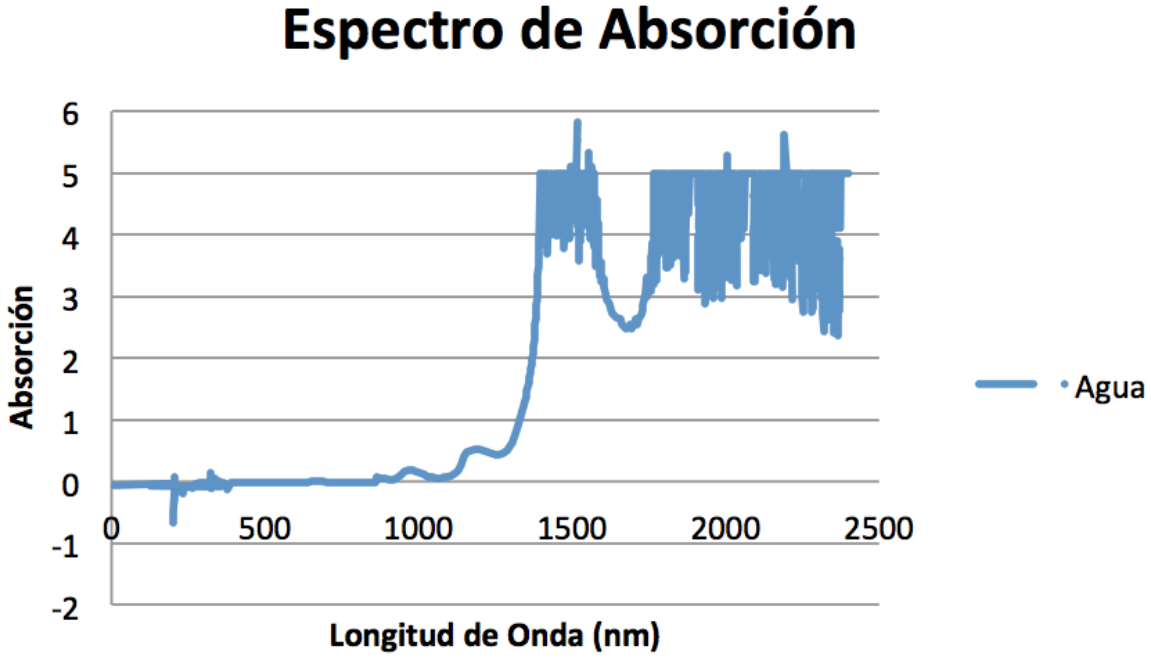
Resultados y discusión de espectroscopía

Las gráficas obtenidas a partir de cada uno de los analizadores se muestran en las Gráficas 1 y 3. Los picos de absorción indican longitudes de onda que pueden ser significativas para alguna medición no invasiva. La Gráfica 1 muestra picos de absorción alrededor de las longitudes de onda de 400, 600, 1500 y 2000 nm. Los picos cercanos a los 400 y 600 nm (colores rojo y azul, respectivamente) reflejan la ya conocida absorción de las plantas en estas longitudes de onda (Taiz y Zeiger, 2010). Por otra parte, los picos cercanos a los 1500 y 2000 nm se deben a la presencia de agua en las muestras. Esto se puede comprobar en la Gráfica 2, la cual muestra picos de absorción de agua simple en estas longitudes de onda. Las mediciones de la Gráfica 1 mayores a 2500 nm muestran saturación, muy probablemente por trabajar este equipo en el extremo de su rango.

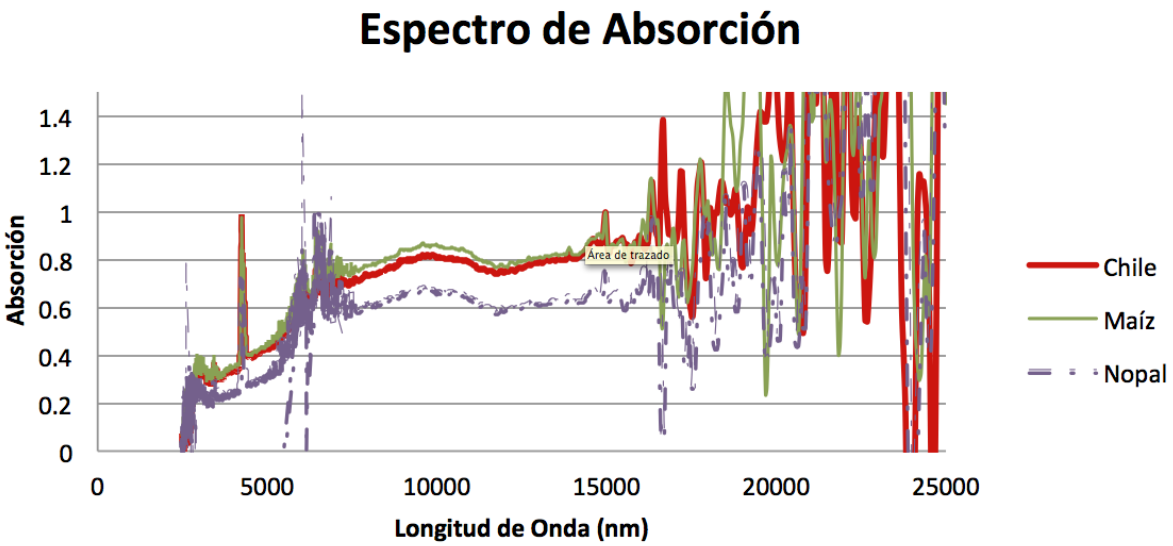
El espectro IR mostrado en la Gráfica 3 muestra algunos picos cercanos a 2400, 4400 y alrededor de 6400 nm. Los picos cercanos a 2400 nm son debidos a la presencia de agua en la muestra, de nuevo comprobado por la Gráfica 2. Los picos en longitudes de onda mayores a 16000 nm pueden también deberse a que se trabajó este equipo muy cerca del límite de su rango. Otras investigaciones sobre análisis en plantas a través de espectroscopía infrarroja (Kumar and Barth, 2010) no contemplan los picos encontrados alrededor de las longitudes de onda de 4400 y 6400 nm; y además no son útiles para mediciones *in situ* o a pequeña escala.



Gráfica 1. Espectro de absorción de plantas C3 (frijol y rábano), C4 (Maíz) y CAM (Nopal) generado por Analizador Perkin Elmer Instruments, LAMBDA 900, UV/ Vis/NIR Spectrometer.



Gráfica 2. Espectro de absorción del agua, generado por Analizador Perkin Elmer Instruments, LAMBDA 900, UV/Vis/NIR Spectrometer. Vis/NIR Spectrometer.



Gráfica 3. Espectro IR de absorción de plantas C3 (Chile), C4 (Maíz) y CAM (Nopal) generado por Analizador Perkin Elmer, Spectrum BX, FTIR System

El uso de espectrometría para la medición de fotosíntesis en plantas se refiere, en la actualidad, únicamente a mediciones a gran escala desde satélites (Espinosa-Calderon y col. 2011). Lograr diseñar sensores ópticos que permitan medir fotosíntesis a pequeña escala es un reto que los autores de este documento estamos tratando de realizar

TERMOGRAFÍA

Todos los objetos emiten radiación electromagnética en función de su temperatura. El inferir la temperatura de un cuerpo con base en la cantidad de luz infrarroja que irradia permite que no haya contacto físico con éste. A este tipo de medición se le llama termografía. Algunos puntos a tomar en cuenta para utilizar este principio de medición son:

- Conocer el grado de irradiancia del cuerpo (muestra) a estudiar.
- Conocer la distancia fija a la que se debe de colocar el sensor del cuerpo (muestra)
- Compensar con una medición de referencia de la temperatura ambiente.

Taiz y Zeiger (2010) reportan que los principales factores a considerar para medir la fotosíntesis son: Luz, CO_2, O_2 y temperatura generada por la planta durante dicho proceso. Esta sección reporta algunos resultados de experimentos relacionados con la medición de temperatura generada por la planta durante la fotosíntesis.

Materiales y métodos de termografía

Este experimento se realizó en un invernadero entre las 11 y las 17 hrs. del día. La temperatura ambiente promedio durante el periodo de medición fue de 41.19^0 C. Los individuos experimentales fueron plantas de Nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* c.v. Freedom), las cuales son tipo C_3. Se utilizó una cámara para termografía infrarroja (ThermaCAM FLIR E25, con rango 7 a 13.5 µm) posada sobre un tripie a una distancia de 70 cm de las plantas.

De forma independiente, se colocaron los ejemplares debajo de la cámara y se fotografiaron con la radiación natural de luz. Inmediatamente después se cubrió el ejemplar para que estuviera en total obscuridad y se fotografió

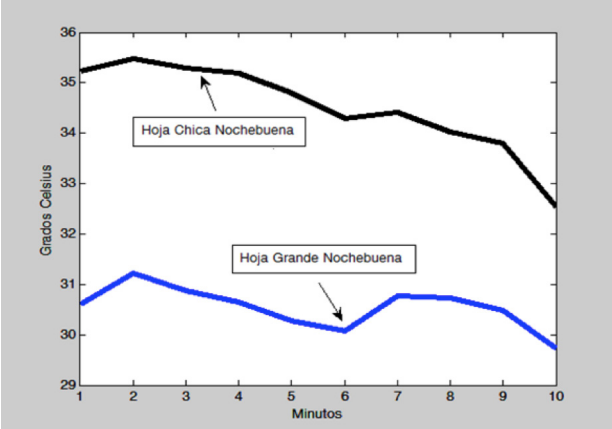
cada minuto durante 10 minutos. De esta forma se mapeó el comportamiento térmico dinámico de las plantas de la luz a la oscuridad.

De manera inversa se mapeó el comportamiento térmico dinámico de las plantas de la oscuridad a la luz. Se fotografiaron las plantas en plena oscuridad, después de haber estado sometidas a ésta por un periodo de 20 minutos. Se descubrieron los ejemplares para que recibieran 100% de luz ambiental y se tomaron fotografías cada minuto durante 10 minutos.

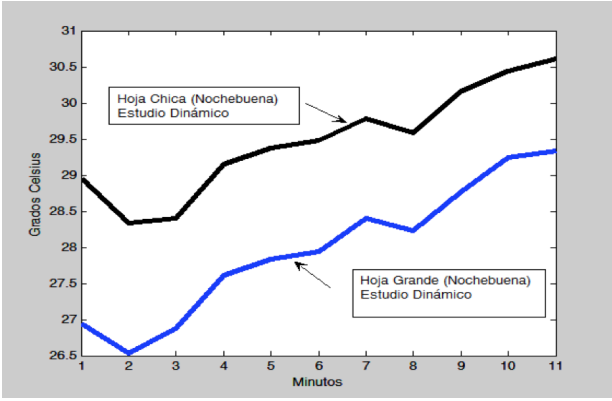
Resultados y discusión de termografía

En cada una de las fotos se analizaron las temperaturas de hojas jóvenes (llamadas hoja chica) y de hojas maduras (llamadas hoja grande). Del mapeo del comportamiento térmico dinámico de las plantas de la luz a la oscuridad, se obtuvo la gráfica de la Gráfica 4 donde se observa la tendencia a disminuir su temperatura. Del mapeo del comportamiento térmico dinámico de las plantas de la oscuridad a la luz, se obtuvo la gráfica de la Gráfica 5, donde se puede observar su tendencia a aumentar la temperatura de hoja. Las tendencias se mantienen, no importa la edad de la hoja.

Las mediciones obtenidas en este experimento muestran una diferencia promedio entre las hojas jóvenes y maduras de 1.27ºC durante la presencia de luz; y una diferencia promedio de 0.12ºC entre las diferentes edades de hojas después de 10 minutos de oscuridad. Estas diferencias están relacionadas con los niveles fotosintéticos de las hojas de diferente edad, por lo que pueden ser utilizadas para inferir su fotosíntesis.



Gráfica 4. Comportamiento térmico dinámico de las plantas de Nochebuena de la luz a la oscuridad



Gráfica 5. Comportamiento térmico dinámico de las plantas de Nochebuena de la oscuridad a la luz.

Aunque algunos autores consideran que no hay diferencia de temperatura entre la hoja y el aire que la rodea (Wright and Leavitt, 2006), estudios como este demuestran que sí la hay. Y, no obstante la existencia de investigaciones previas sobre la temperatura de hoja (Hellliker and Richter, 2008), hasta el momento los autores de este documento no hemos encontrado referencias que relacionen directamente a esta variable fisiológica con la fotosíntesis en la planta. Por lo tanto, estudios como este pueden ayudar a descubrir nuevas formas de inferir la fotosíntesis en plantas, además de demostrar que principios físicos ya conocidos, como la termografía IR, son útiles para lograr desarrollar sensores no invasivos de este importante proceso fisiológico.

FLUORESCENCIA DE CLOROFILA

Este método se basa en el hecho de que la clorofila, al ser excitada por la radiación solar, tiene la capacidad de re-emitir fotones aproximadamente en 685 y 740 nm (Espinosa-Calderon y col. 2011a). Después de fluorescer, la clorofila regresa a su estado estable. La relación entre la fluorescencia y la cantidad de clorofila activa es directamente proporcional (Damm y col. 2010).

Este fenómeno puede servir también para detectar efectos como estrés hídrico (Rahbarian y col. 2011) y estrés nutricional (Thoren and Shmidhalter, 2009). Esto se debe a la respuesta lumínica de la membrana tilacoidal del cloroplasto, la cual tiene una alta sensibilidad a las condiciones ambientales (Lin y col. 2007). Esta técnica es tan popular que cuenta tanto con aplicaciones manuales (Piccotto y col. 2011), como a gran escala ayudado en mediciones satelitales (Frankenberg y col. 2011). Las desventajas de estas aplicaciones son que: las aplicaciones manuales son invasivas, puesto que las plantas tienen que ser encerradas en cámaras especiales para su análisis; y las aplicaciones satelitales no permiten mediciones en plantas a pequeña escala, o bajo condiciones protegidas (invernaderos).

Una propuesta en desarrollo por los autores, es la medición de fluorescencia a través de un fluorímetro tipo Modulador de Amplitud de Fase (PAM por su acrónimo en inglés Phase Amplified Modulation) en conjunto con un amplificador lock-in. Por medio del fluorímetro se modularía la luz que incide en la planta, mientras que con el lock-in se filtraría el ruido óptico ambiental para tener únicamente la medición de la respuesta lumínica de la planta. De esta forma sería posible el crear métodos manuales menos invasivos (El Khachia y col. 2008)

CONCLUSIONES

Las absorciones entre 400 y 750 nm mostradas en la Gráfica 1 confirman que las plantas utilizan los colores azul y rojo (respectivamente) para la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2010). Los picos cercanos a los 1500 y 2400 nm, en las Gráficas 1 y 3, se deben al agua dentro de las muestras, según lo confirma la Gráfica 2. Este experimento muestra que el pico cerca de los 4200 nm, mostrado en la Gráfica 3, parece ser un buen punto de referencia para mediciones IR en plantas, puesto que presenta una absorción distintiva con respecto a las otras longitudes de onda que lo rodean. De igual manera, marca un punto de partida para la investigación y desarrollo de dispositivos basados en espectrometría infrarroja, los cuales pueden servir para realizar mediciones de fotosíntesis en plantas de forma no invasiva, útiles a pequeña escala o bajo condiciones de invernadero.

Los cambios de temperatura en las plantas debidos a la cantidad de radiación a la que se encuentran expuestas indican que tanto radiación como temperatura de hoja son algunos de los principales factores a considerar para inferir la fotosíntesis, tal y como lo exponen Taiz y Zeiger (2010). Puesto que, hasta el momento, los autores de este documento no hemos encontrado referencias que relacionen directamente la temperatura de

hoja con la fotosíntesis de la planta, investigaciones derivadas de este experimento podrían ayudar a descubrir nuevas formas de inferir la fotosíntesis en plantas, de forma no invasiva.

La medición de fluorescencia de clorofila se muestra como una técnica ya utilizada a pequeña escala, pero cuya invasividad se puede eliminar al ser combinada con un Modulador de Amplitud de Fase (PAM) y un amplificador lock-in. El campo de investigación referente a esta técnica se encuentra en innovar sobre los métodos de excitación óptica; así como sobre la instrumentación y el procesamiento de señales para lograr que ésta sea una técnica totalmente no invasiva a nivel local.

En este documento se comentaron técnicas generales, así como algunos experimentos realizados por los autores, donde aspectos fisiológicos de plantas referentes a su fotosíntesis son cuantificados a través de variables medibles por principios opto-electrónicos. Dichos principios evitan el contacto físico con la planta, lo que les permite ser utilizados como principios para el diseño de sensores no invasivos de fotosíntesis. Estos sensores podrían promover el comportamiento natural de las plantas y, por lo tanto, mediciones más confiables de este importante proceso fisiológico. Algunas posibles aplicaciones de la medición de fotosíntesis a través de los métodos expuestos en este documento son: investigación de aspectos fisiológicos, detección de enfermedades en plantas, análisis sobre la nutrición de las plantas y la predicción de la producción del cultivo.

Referencias bibliográficas

Agrawal, G. 2011. Fiber-optic communication systems, Ed. Wiley, Rochester, USA.

Damm, A., Elbers, J., Erler, A., Gioli, B., Hamdi, K., Hutjes, R., Kosvancova, M., Meroni, M., Miglietta, F., Moersch, A. 2010. Remote sensing of sun-induced fluorescence to improve modeling of diurnal courses of gross primary production (gpp). Global Change Biology, 16, pp.171–186.

El Khachia, N., OMongain, E., and Collins, A. 2008. Temporal characteristics of chlorophyll fluorescence quenching and dissolved oxygen concentration as indicators of photosynthetic activity in chlorella emersonii. Photosynthetica, 46, pp. 79–83.

Espinosa Calderón, A., Torres-Pacheco, I., Padilla-Medina, J., Osornio-Rios, R., de Jesus Romero-Troncoso, R., Villaseñor-Mora, C., Rico-Garcia, E., and Guevara-Gonzalez, R. 2011a. Description of photosynthesis measurement methods in green plants involving optical techniques, advantages and limitations. African Journal of Agricultural Research, 6, pp. 2638–2647.

Espinosa Calderón, A., Torres-Pacheco, I., Padilla-Medina, J., Osornio-Rios, R., Romero-Troncoso, R., Villaseñor-Mora, C., Olmos-Lopez, M., and Guevara-Gonzalez, R. 2011b. Optical characterization of plant leaves. In CIOMP-OSA Summer Session: Lasers and Their Applications. Optical Society of America.

Frankenberg, C., Butz, A., and Toon, G. 2011. Disentangling chlorophyll fluorescence from atmospheric scattering effects in o2 a-band spectra of reflected sun-light. Geophysical Research Letters, 38, pp. 03801.

Helliker, B. and Richter, S., 2008. Subtropical to boreal convergence of tree-leaf temperatures. Nature, 454, pp. 511–514.

Hermand, J., Nascetti, P., and Cinelli, F. 1998. Inversion of acoustic waveguide propagation features to measure oxygen synthesis by Posidonia oceanica. In OCEANS'98 Conference Proceedings, Nice, France, pp. 919–926.

Hodson, M., White, P., Mead, A., and Broadley, M. 2005. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. Annals of Botany, 96, pp. 1027–1046.

Hunt, S. 2003. Measurements of photosynthesis and respiration in plants. Physiologia plantarum, 117, pp. 314–325.

Kawachi, N., Sakamoto, K., Ishii, S., Fujimaki, S., Suzui, N., Ishioka, N., and Matsuhashi, S. 2006. Kinetic analysis of carbon-11-labeled carbon dioxide for studying photosynthesis in a leaf using positron emitting tracer imaging system. IEEE Transactions on Nuclear Science, 53, pp. 2991–2997.

Kumar, S., Barth, A. 2010. Following Enzyme Activity with Infrared Spectroscopy. Sensors, 10, pp. 2626–2637.

Lin, Z., Liu, N., Lin, G., Pan, X., and Peng, C. 2007. Stressinduced alteration of chlorophyll fluorescence polarization and spectrum in leaves of alocasia macrorrhiza l. schott. Journal of fluorescence, 17, pp. 663–669.

Millan-Almaraz, J., Guevara-Gonzalez, R., de Jesus Romero-Troncoso, R., Osornio-Rios, R., and Torres-Pacheco, I. 2009. Advantages and disadvantages on photosynthesis measurement techniques: A review. African Journal of Biotechnology, 8, pp. 7340–7349.

Piccotto, M., Bidussi, M., and Tretiach, M. 2011. Effects of the urban environmental conditions on the chlorophyll a fluorescence emission in transplants of three ecologically distinct lichens. Environmental and Experimental Botany, 73, pp. 102–107.

Rahbarian, R., Khavari-Nejad, R., Ganjeali, A., Bagheri, A., and Najafi, F. 2011. Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible chickpea (cicer arietinum l.) genotypes. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 53, pp. 47–56.

Singh, M., Erickson, J., Boote, K., Tillman, B., Van Bruggen, A., and Jones, J. 2011. Photosynthetic consequences of late leaf spot differ between two peanut cultivars with variable levels of resistance. Crop Science, 51, pp. 2741.

Taiz, L. and Zeiger, E. Plant Physiology 5th. Ed. Sinauer, USA. 2010

Takahashi, M., Ishiji, T., and Kawashima, N. 2001. Handmade oxygen and carbon dioxide sensors for monitoring the photosynthesis process as instruction material for science education. Sensors and Actuators B: Chemical, 77, pp. 237–243.

Thoren, D. and Schmidhalter, U. 2009. Nitrogen status and biomass determination of oilseed rape by laser-induced chlorophyll fluorescence. European Journal of Agronomy, 30, pp. 238–242.

West-Eberhard, M., Smith, J., and Winter, K. 2011. Photosynthesis, reorganized. Science, 332, pp. 311.

Wright, W. E. and Leavitt, S. W. 2006. Boundary layer humidity reconstruction for a semiarid location from tree ring cellulose d18O. Journal of Geophysycal Research Atmospheres. 111, pp. D18105).