

# CAPÍTULO 7

## SISTEMAS IRGA EN LA MEDICIÓN DE INTERCAMBIO GASEOSO

Autores:

Santiago Varela <sup>(1)</sup>, Gonzalo Caballé <sup>(1)</sup>,  
Mariela Curetti <sup>(2)</sup>, José Portela <sup>(3)</sup>.

<sup>(1)</sup> Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Bariloche

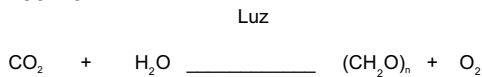
<sup>(2)</sup> Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Alto Valle

<sup>(3)</sup> Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA La Consulta

### 1. Introducción

Una de las características esenciales de la vida es el consumo de energía, ya que todos los procesos vitales sólo se producen si disponen de ella. La vida en la tierra depende de la energía derivada del sol. La fotosíntesis, del griego antiguo φωτο (foto) "luz" y σύνθεσις (síntesis) "unión", es un proceso mediante el cual las plantas, algas y algunas bacterias captan y utilizan la energía de la luz para transformar la materia inorgánica de su medio externo en materia orgánica que utilizarán para su crecimiento y desarrollo (Taiz y Zeiger, 1998). Los organismos capaces de llevar a cabo este proceso se denominan fotoautótrofos, siendo capaces de fijar el CO<sub>2</sub> atmosférico. Salvo en algunas bacterias, en el proceso de fotosíntesis se produce liberación de oxígeno molecular (proveniente de la hidrólisis de moléculas de H<sub>2</sub>O) hacia la atmósfera (fotosíntesis oxigénica).

Así la fotosíntesis puede expresarse en forma global como:



Dióxido de carbono Agua pigmentos Hidrato de carbono Oxígeno

Es ampliamente admitido que el contenido actual de oxígeno en la atmósfera se ha generado a partir de la aparición y actividad de organismos fotosintéticos. Esto ha permitido la aparición evolutiva y el desarrollo de organismos aerobios capaces de mantener una tasa metabólica alta. En las plantas, la foto-

síntesis se lleva a cabo en una organela especializada denominada cloroplasto. Esta organela está delimitada por dos membranas (doble membrana) que la separan del citoplasma circundante. En su interior se encuentra una fase acuosa con elevado contenido en proteínas e hidratos de carbono, denominada estroma. La membrana interna se pliega en sacos aplanados denominados tilacoides. Estos contienen los pigmentos fotosintéticos y proteínas necesarias para captar la energía de la luz y transformarla en energía química, mediante la síntesis de NADPH<sub>2</sub> y ATP. El principal pigmento presente en los centros recolectores de luz es la clorofila, de color verde, de la que existen varios tipos (bacterioclorofilas y clorofilas a, b, c y d). Además de las clorofilas, otros pigmentos presentes son los carotenoides (carotenos y xantofilas), de color amarillo o anaranjado (Sitte *et al.*, 2002). En las plantas vasculares el mayor número de cloroplastos se encuentra dentro de las células del mesófilo de las hojas, lo cual les confiere su característico color verde.

La fotosíntesis puede ser dividida en dos fases. La primera ocurre en los tilacoides, en donde se capta la energía de la luz y ésta es almacenada en dos moléculas orgánicas sencillas (ATP y NADPH<sub>2</sub>). La segunda tiene lugar en el estroma y las dos moléculas producidas en la fase anterior son utilizadas en la asimilación del CO<sub>2</sub> atmosférico para producir hidratos de carbono e indirectamente el resto de las moléculas orgánicas que componen los seres vivos (aminoácidos, lípidos, nucleótidos, etc).

Tradicionalmente, a la primera fase se la denominaba "fase luminosa" y a la segunda, "fase oscura" de la fotosíntesis, ya que se creía que esta fase ocurría independientemente de la presencia de luz. Sin embargo, la denominación "fase oscura" de la segunda etapa es incorrecta porque actualmente se conoce que los procesos que la llevan a cabo, sólo ocurren bajo condiciones de iluminación, dado que la principal enzima que participa en esta etapa (la ribulosa bifosfato carboxilasa-oxigenasa) necesita luz para activarse (Zhang *et al.*, 2002; Zhang y Portis, 1999). De esta forma, es más preciso referirse a ella como "fase de fijación del dióxido de carbono" (ciclo de Calvin) y a la primera como "fase fotoquímica" o reacción de Hill (Taiz y Zeiger, 1998).

En la etapa fotoquímica se producen dos procesos químicos que son decisivos para la producción

final de glucosa, estos son la reducción de la coenzima NADP y la síntesis de ATP. El NADP se reduce a  $\text{NADPH}^+\text{H}^+$  con los protones que libera la molécula de agua. La coenzima NADP reducida aportará los protones necesarios para sintetizar la molécula de glucosa, mientras el ATP liberará la energía necesaria para dicha síntesis. Asociada a la membrana tilacoidal se encuentra la enzima ATP sintetasa (ó ATPasa) que es la responsable de la producción de ATP. Esta enzima es capaz de transportar protones a través de un canal ubicado en su interior y transformar la energía cinética de los protones en energía química que se conserva en el ATP. De esta forma, la enzima ATPasa libera el gradiente electroquímico que se produce dentro del tilacoide y utiliza la energía de este gradiente para adicionar un grupo fosfato al ADP produciendo ATP. Por otra parte, los protones que ahora se encuentran en la matriz del cloroplasto, se unen a la coenzima NADP produciendo  $\text{NADPH}^+\text{H}^+$ .

El ciclo de Calvin ocurre en el estroma o matriz del cloroplasto. Allí se encuentran las enzimas necesarias que catalizarán la conversión de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en glucosa utilizando los protones aportados por la coenzima NADP más la energía del ATP. El dióxido de carbono ingresa a través de los estomas y llega hasta la molécula aceptora del ciclo, la ribulosa bifosfato, combinándose con ésta mediante la acción de la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa o Rubisco. El primer producto estable de la fijación de  $\text{CO}_2$  es el ácido-3-fosfoglicérico (PGA), un compuesto de 3 carbonos. La energía del ATP es utilizada para fosforilar el PGA y formar ácido 1,3 difosfoglicérico, el cual es reducido luego mediante la acción del  $\text{NADPH}^+\text{H}^+$  a gliceraldehido-3-fosfato (PGAL). Una parte del gliceraldehido-3-fosfato es utilizada en el ciclo para sintetizar glucosa, mientras que el resto se utiliza para regenerar la ribulosa, que da comienzo a un nuevo ciclo.

La anatomía de las hojas de plantas  $\text{C}_4$  a diferencia de las plantas  $\text{C}_3$  (las cuales poseen el mecanismo descrito hasta aquí) difiere notablemente. Las plantas  $\text{C}_4$  se caracterizan por poseer una anatomía específica, descrita como anatomía de Kranz (del alemán, corona), con una vaina de paredes gruesas alrededor del paquete vascular. La vía de 4 carbonos, también denominada Vía de

Hatch-Slack en honor a sus descubridores, es una serie de reacciones bioquímicas de fijación del carbono proveniente del  $\text{CO}_2$  atmosférico. El proceso consiste en la captación del dióxido de carbono en las células del mesófilo de la planta, pero en vez de llevarlo inmediatamente al ciclo de Calvin, las moléculas reaccionan con el PEP (fosfoenolpiruvato), siendo estimulados por una enzima homónima (PEP carboxilasa). El producto final entre el PEP y el  $\text{CO}_2$  es el ácido oxalacético, el cual posteriormente es convertido en ácido málico, o también llamado malato. El malato es llevado a las células de la vaina, en donde es descarboxilado, produciendo el  $\text{CO}_2$  necesario para el ciclo de Calvin, además de ácido pirúvico. Este último es enviado nuevamente al mesófilo en donde es transformado por medio de ATP en fosfoenolpiruvato (PEP), para quedar nuevamente disponible para el ciclo. La ventaja de este proceso radica en el hecho de que al tener a la Rubisco encerrada en las células de la vaina se le impide la posibilidad de que reaccione con oxígeno en situaciones en las cuales la concentración de  $\text{CO}_2$  sea muy baja, por lo cual el  $\text{CO}_2$  perdido a través de la fotorespiración se reduce considerablemente. Incluso las moléculas de dióxido de carbono expulsadas por la fotorespiración son nuevamente reutilizadas a través del PEP, el cual lo captura en el mesófilo para ser ingresados al ciclo de Calvin. La fijación de  $\text{CO}_2$  por la PEP carboxilasa y la subsecuente decarboxilación ocurren relativamente rápido, permitiendo el mantenimiento de una alta presión parcial de  $\text{CO}_2$  en la envoltura del haz vascular. De esta forma las plantas  $\text{C}_4$  poseen un mecanismo que les permite incrementar la presión parcial de  $\text{CO}_2$  en el sitio activo de la Rubisco de manera tal que la actividad oxigenasa de dicha enzima es virtualmente inhibida.

Existen varios factores por los cuales la fotosíntesis puede ser afectada; entre ellos resultan de gran importancia las concentraciones de  $\text{CO}_2$  en el ambiente y la cámara subestomática de la hoja (gradiente de concentración de  $\text{CO}_2$ ), la intensidad y calidad de radiación, la temperatura, el grado de hidratación de la planta, y la tasa de difusión tanto dentro de la hoja como, entre ella y la atmósfera. Así, de manera semejante a otros aspectos fisiológicos, este proceso es influenciado por factores de diversa índole, algunos dependientes de la propia

planta y otros del ambiente en el cual se desarrollan.

Cuando se mide fotosíntesis con un analizador de gases infrarrojo IRGA (del inglés "infra red gas analyzer"), lo que se mide es la fotosíntesis neta, esto es, el balance entre el CO<sub>2</sub> fijado y el emitido.

fotosíntesis neta = fotosíntesis - respiración - fotorrespiración

Muy brevemente, el CO<sub>2</sub> se fija mediante la fotosíntesis, mientras que los procesos más importantes que liberan CO<sub>2</sub> son la fotorrespiración y la respiración. La liberación de CO<sub>2</sub> por fotorrespiración se debe a la actividad oxigenasa de la Rubisco, que en vez de unirse a una molécula de CO<sub>2</sub> se une a una molécula de O<sub>2</sub>, produciendo la liberación de CO<sub>2</sub>. Si bien la afinidad de la Rubisco por el O<sub>2</sub> es inferior a la afinidad por el CO<sub>2</sub>, la elevada concentración atmosférica de O<sub>2</sub> (21%) hace que la actividad de la Rubisco como oxigenasa implique una considerable pérdida de CO<sub>2</sub>, como así también de amonio. Si la concentración de O<sub>2</sub> atmosférico se disminuye al 2%, se observa que la actividad oxigenasa de la Rubisco es nula, mientras que esta concentración de O<sub>2</sub> es suficiente para que se produzca la respiración mitocondrial. Como la fotorrespiración es un proceso mediado por la Rubisco, en ausencia de luz este proceso no ocurre, por lo tanto la emisión de CO<sub>2</sub> que tiene lugar en oscuridad se debe exclusivamente a la respiración. Como se mencionó anteriormente existen grandes diferencias en cuanto a las tasas de fotorrespiración en plantas C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>. En las plantas con metabolismo C<sub>4</sub> las pérdidas de CO<sub>2</sub> por fotorrespiración son despreciables ya que la Rubisco trabaja con concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub>, por lo que su actividad oxigenasa es nula.

La pérdida de agua desde las hojas hacia la atmósfera (transpiración) está asociada al intercambio de CO<sub>2</sub> necesario para el crecimiento y desarrollo de la planta, siendo los estomas la principal vía de intercambio de carbono y agua entre la hoja y el ambiente (Tardieu y Simonneau, 1998; Medrano *et al.*, 2002; Zlatev *et al.*, 2003; Brodribb y Holbrook, 2004). La transpiración genera un flujo de agua, junto a los minerales y nutrientes disueltos en ella, desde las raíces hasta las hojas en la parte superior de la planta, ya que en ésta parte se produce la mayor

pérdida de agua. Si bien es necesaria, esta pérdida puede amenazar la supervivencia de la planta y su productividad, especialmente en climas muy secos y cálidos. Casi todo el agua se transpira a través de los estomas de las hojas y del tallo, por lo tanto, se debe lograr un equilibrio entre la absorción de CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis y la pérdida de H<sub>2</sub>O por transpiración. Aunque el cierre estomático supone una gran ventaja a la hora de evitar pérdidas de agua, tiene como contrapartida una reducción en la captación de CO<sub>2</sub> y el calentamiento de la hoja. Esto puede conducir a un estado de "debilidad" de la planta por pérdida de reservas y/o producción de metabolitos secundarios, a daños en la estructura celular e incluso a la muerte del individuo (Bohnert y Jensen, 1996). A su vez, gracias a la liberación de energía durante el proceso de evaporación del agua de los tejidos se produce la "refrigeración" de la misma. Así, la temperatura de la hoja puede llegar a ser hasta 15 °C menor que la del aire circundante.

Un concepto a tener claro en la medición de la actividad fotosintética es el hecho de que ésta se realiza con "sistemas de medición" y no con un simple equipamiento. El concepto de "sistema" enfatiza el hecho de que no se posee un sensor discreto que mida dicha actividad, ya que la tasa fotosintética es siempre calculada a partir de mediciones indirectas de las concentraciones de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O y otros tipos de parámetros, dependiendo de la naturaleza del sistema de medición.

## 2. Análisis infrarrojo de gases

A pesar de que se han desarrollado muchos sistemas de medición de la fotosíntesis, los mismos pueden ser agrupados básicamente en los siguientes tipos: técnicas gravimétricas, isotópicas y de análisis de infrarrojo (sistemas IRGA) del tipo cerrado o abierto. En el presente capítulo nos centraremos sobre estos últimos y particularmente sobre los sistemas abiertos que son los más utilizados en la actualidad. El principal objetivo del mismo es el de enfatizar sobre aquellos aspectos que deben tenerse en cuenta en el uso de estos complejos sistemas a fin de obtener datos confiables. Incluimos de todas maneras una breve descripción acerca de los sistemas cerrados a fin de mostrar parte de la evolución de los sistemas IRGA.

## 2.1. Sistemas de medición de intercambio de gases

### 2.1.1. Sistemas cerrados

Si una hoja fotosintéticamente activa y transpirando se dispone en una cámara cerrada bajo condiciones de irradiancia, la concentración de CO<sub>2</sub> en la cámara se reducirá, mientras que el contenido de vapor de H<sub>2</sub>O en el aire se incrementará. La tasa de agotamiento del CO<sub>2</sub> se corresponde a la actividad fotosintética y la adición de vapor de H<sub>2</sub>O en la cámara a la tasa de transpiración (figura 1A). Para determinar la tasa de fotosíntesis, un sistema de tipo cerrado mide la concentración de CO<sub>2</sub> al inicio y al final de un determinado intervalo de tiempo. Dado que el agotamiento del CO<sub>2</sub> es el producto de la concentración y del volumen del sistema, la ecuación básica para el cálculo de la fotosíntesis neta (A<sub>n</sub>) es:

$$A_n = \frac{(c_b - c_f) V}{\Delta t}$$

donde C<sub>b</sub> es la concentración inicial de CO<sub>2</sub>, C<sub>f</sub> es la concentración final, V es el volumen del sistema y Δt es el intervalo de tiempo considerado. Para expresar la tasa de fotosíntesis por unidad de área de hoja (L) o peso (P), simplemente se divide la tasa de fotosíntesis total por el área o el peso:

$$A_n = \frac{(c_b - c_f) V}{\Delta t L}$$

Las primeras mediciones realizadas con este tipo de sistemas (mediciones elementales) se realizaban de esta manera; posteriormente este tipo de equipamientos utilizaron ajustes de regresión de la marcha de CO<sub>2</sub> a lo largo del tiempo de medición. Cuanto más negativa fuera la pendiente de consumo, mayor era la tasa de fotosíntesis. Esta pendiente era corregida, como se mencionó anteriormente, por el área de hoja utilizada y el volumen de la cámara. Uno de los primeros equipos de este tipo, el Li-6000 (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, EE UU), utilizaba regresiones lineales, lo cual era un defecto grave. El equipo Li-6200 de la misma empresa, modifica el cálculo a través de regresiones de ajustadas

te polinómico. Dicho equipo fue de amplia utilización en décadas pasadas, y aún en la actualidad, aunque ya no se fabrican nuevos equipos de este modelo. Dicho equipamiento adicionalmente tenía limitaciones en cuanto al control ambiental, siendo parcial, pudiendo controlarse solo la humedad en la cámara mediante un control mecánico difícil de manejar, era limitado para realizar marchas en el tiempo y debía medirse con luz artificial o adicionarse fuentes externas de iluminación.

### 2.2. Sistemas abiertos

Si al sistema antes descrito se le adiciona un flujo de aire continuo a través de la cámara, es decir existe una entrada y salida continua de aire en el sistema, al salir de la cámara dicho flujo presentará una menor concentración de CO<sub>2</sub> y un enriquecimiento en vapor de agua producto de la transpiración en relación al aire que entró en la cámara. Si las tasas de fotosíntesis, transpiración y flujo de aire a través de la cámara son constantes, las condiciones de la cámara alcanzan un estado estable. Los equipamientos que miden fotosíntesis en función de este equilibrio se llaman sistemas diferenciales (figura 1B; figura 2). En estos sistemas la ecuación básica de cálculo de la fotosíntesis neta es:

$$A_n = \frac{u_e c_e - u_o c_o}{L}$$

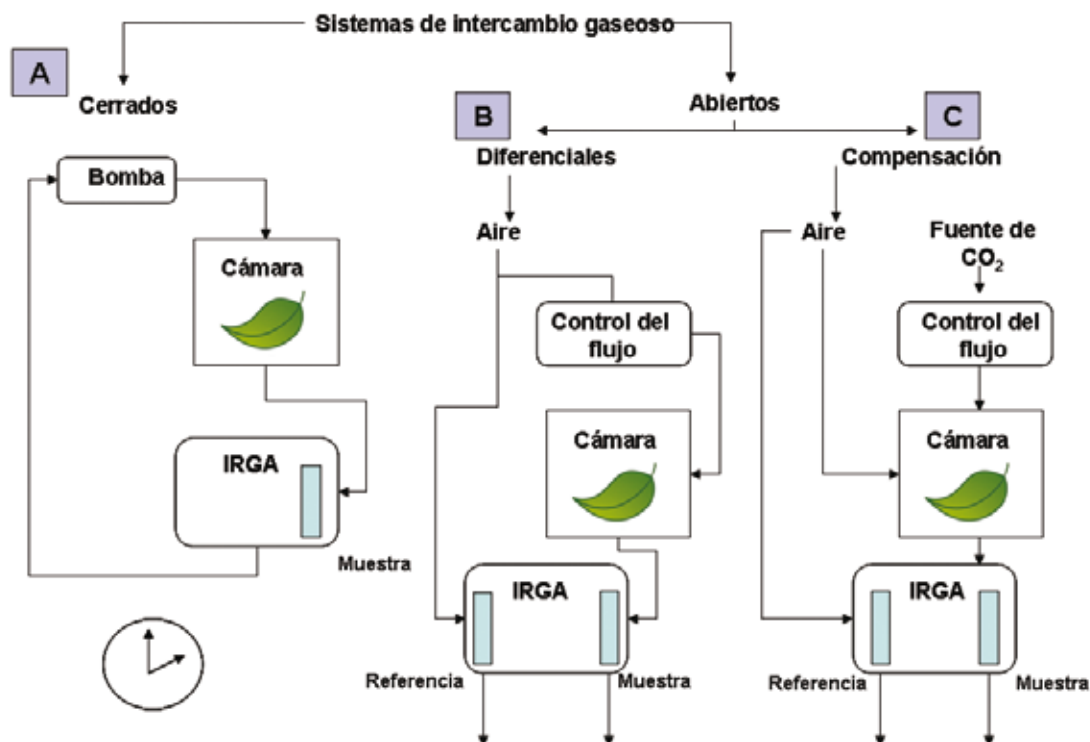
donde u<sub>e</sub> es el flujo de aire entrante a la cámara, c<sub>e</sub> es la concentración de CO<sub>2</sub> en el flujo de aire entrante a la cámara, u<sub>o</sub> es el flujo de aire que sale de la cámara, c<sub>o</sub> es la concentración de CO<sub>2</sub> en el flujo de aire que sale de la cámara y L es el área dentro de la cámara. Bajo condiciones donde el agotamiento de CO<sub>2</sub> encontrado en un sistema diferencial no es lo deseado, los sistemas de compensación (figura 1C), que son también sistemas abiertos y operan como sistemas estables, ofrecen una alternativa práctica. Los sistemas de compensación para el CO<sub>2</sub> están particularmente adaptados a instrumentos en los cuales los pequeños flujos de aire a través de la cámara causan grandes reducciones en el CO<sub>2</sub> bajo sistemas de tipo diferencial. En los sistemas de compensación, el CO<sub>2</sub> removido por

fotosíntesis es reemplazado mediante la inyección de  $\text{CO}_2$  dentro de la cámara (figura 1C). Cuando las tasas de  $\text{CO}_2$  inyectado generan que los valores de  $\text{CO}_2$  en el flujo de entrada y el de salida se equilibren, la tasa de fotosíntesis es proporcional a la tasa de inyección de  $\text{CO}_2$ . En la figura 2 se muestran los dos sistemas abiertos abordados en el presente capítulo.

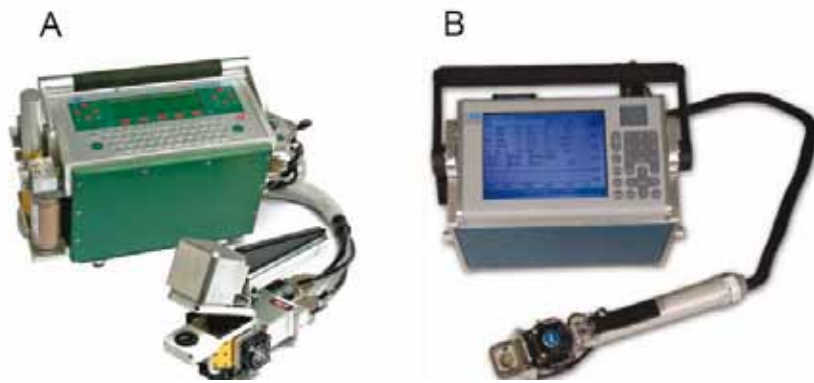
Como se mencionó anteriormente, los analizadores de gases infrarrojos IRGA son actualmente los sistemas más ampliamente utilizados para la medición de la actividad fotosintética a través de la cuantificación de las concentraciones de  $\text{CO}_2$  y vapor de  $\text{H}_2\text{O}$  atmosférico. Es importante destacar que lo que miden estos sistemas no es la fijación bruta de carbono, sino el balance neto ( $A_n$ ) entre la tasa de fijación de carbono por parte del tejido fotosintetizante y la liberación de  $\text{CO}_2$  como producto de la fotorrespiración. En condiciones de oscuridad es posible registrar la respiración con esta metodología, ya que la fotosíntesis es nula.

El análisis infrarrojo del  $\text{CO}_2$  y el  $\text{H}_2\text{O}$  se basa en que ambos gases absorben luz infrarroja (figura 3),

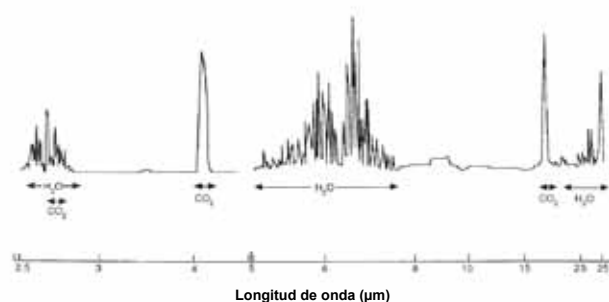
de manera que una determinada cantidad de estos gases absorberá una magnitud de radiación de manera proporcional a su concentración en la corriente de aire. Debido a que ambos gases presentan picos de absorción en zonas próximas o solapadas del espectro infrarrojo, es necesario el uso de filtros específicos para evaluar las concentraciones de cada uno. Esta proporcionalidad se determina por medio de un gas de referencia de concentración conocida, que al pasar por el equipo dará una determinada lectura de la concentración de  $\text{CO}_2$  expresada en partes por millón. Posteriormente, si una muestra semejante de gas pasa a través de una cámara con una hoja iluminada, la ocurrencia de fotosíntesis provocará la absorción de una parte del  $\text{CO}_2$  presente en el gas y un aumento en la concentración de vapor de  $\text{H}_2\text{O}$  (transpiración). De esta manera, la tasa de fotosíntesis es un parámetro calculado a partir de medidas indirectas como la concentración de  $\text{CO}_2$ , el flujo del aire, la humedad relativa, la temperatura del aire y de la hoja, y otros parámetros (ver explicación a continuación).



**Figura 1:** Esquema simplificado, modificado a partir del manual del equipamiento Licor 6400 (LiCor, 2004), ilustrando cómo es medida la fotosíntesis a través de los tres sistemas básicos de intercambio gaseoso.



**Figura 2:** Sistemas IRGA del tipo abierto para la medición de intercambio gaseoso. A) LI-6400 (Li-Cor, Nebraska, EE. UU.); B) Ciras-2 (PP Systems, Amesbury, EE. UU.)

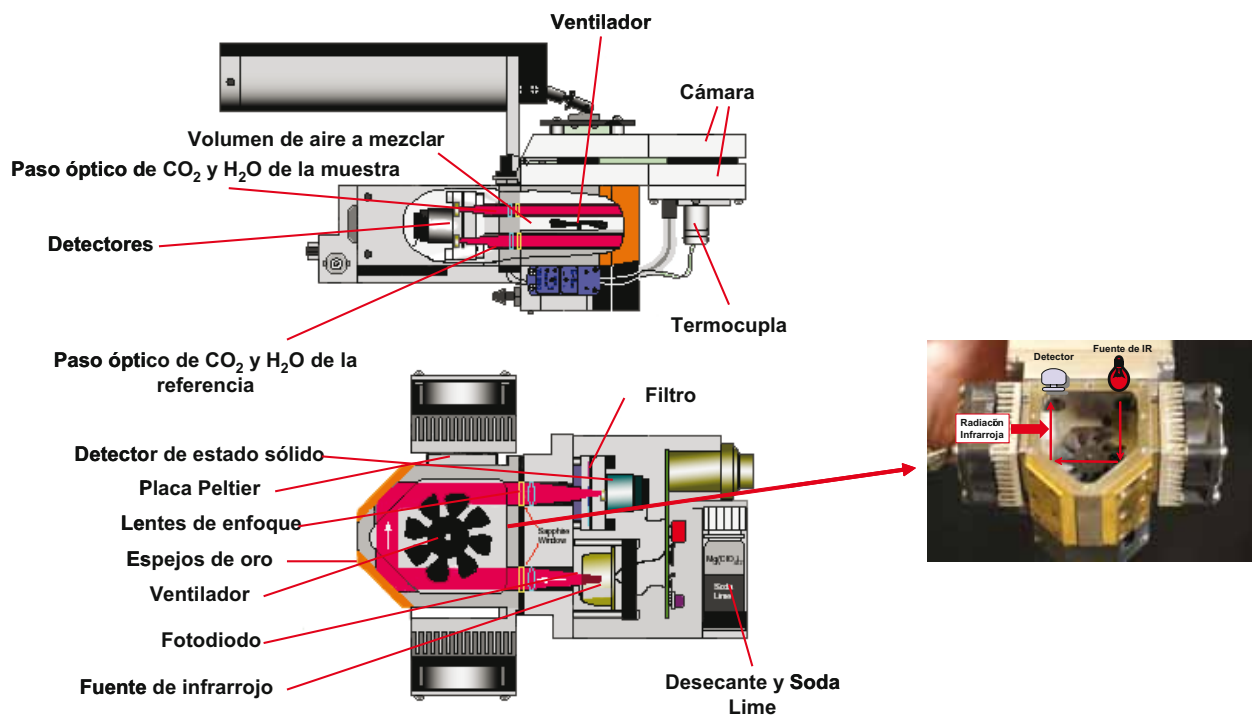


**Figura 3:** Absorción en el espectro infrarrojo del  $\text{CO}_2$  y del  $\text{H}_2\text{O}$  (modificado de Pearcy *et al*, 1989)

Desde un punto de vista tecnológico, un sistema IRGA consiste principalmente de tres partes (figura 4): (1) una fuente de radiación infrarroja de bajo voltaje que usualmente es una espiral de aleación níquel-cromo o tungsteno que se calienta a aproximadamente a 800 °C; (2) una celda de análisis de gas con una entrada y una salida de gases a través de la cual pasa el haz de radiación infrarroja, y (3) un detector de radiación infrarroja de estado sólido. Una bomba interna en el instru-

mento hace pasar el flujo que atravesó la cámara con la muestra y el flujo de referencia alternadamente a través de la celda de análisis por períodos de 2 segundos cada uno. La radiación infrarroja que atraviesa la celda es filtrada siendo finalmente la señal incrementada y almacenada. Posteriormente es comparada con la señal recibida en ciclos posteriores y en función de las diferencias entre muestra y referencias se calculan las variables de interés.





**Figura 4:** Esquema básico mostrando las diferentes partes de un sistema IRGA particularmente para el equipamiento LI-6400 y la trayectoria del haz de radiación infrarroja dentro del mismo.

### 3. Descripción de dos analizadores de gases portátiles

Los analizadores de gases portátiles permiten así realizar mediciones de intercambio gaseoso en hojas vivas de plantas en su ambiente natural o en laboratorio. De esta forma se puede estudiar el comportamiento fotosintético de una misma especie en distintos ambientes o de distintas especies en un ambiente común. En estudios agronómicos, pueden ser utilizados para relacionar la productividad de los cultivos con los distintos tipos de estrés y prácticas de manejo o para la comparación de diferentes genotipos bajo distintas formas de cultivo o ambientes (Ramos Tamayo *et al.*, 2001).

#### 3.1. Sistema abierto LI-6400 (Li-Cor Inc., Nebraska, EEUU)

A diferencia del modelo anterior LI-6200 (sistema cerrado), en donde el IRGA se encuentra en la consola junto a la computadora, el LI-6400 es un siste-

ma abierto en el que la concentración de gases se evalúa en la misma cámara de medición, evitando los errores causados por el flujo de gases hacia la consola que se observaron en el modelo anterior. El LI-6400 cuenta con dos IRGA, uno mide la concentración de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O que provienen de la atmósfera (referencia) y el segundo, colocado en contacto con la cámara (muestra), determina la concentración de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O producto del intercambio realizado por la hoja (figura 5).

El balance de masas de CO<sub>2</sub> está dado por la ecuación previamente mencionada:

$$A_n = \frac{u_e c_e - u_o c_o}{L}$$

donde  $A_n$  es la tasa de asimilación neta (mol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>),  $u_e$  y  $u_o$  son los flujos de entrada y de salida de aire (mol s<sup>-1</sup>) y  $c_e$  y  $c_o$  son las fracciones molares de entrada (referencia) y de salida (muestra) (mol CO<sub>2</sub> mol aire<sup>-1</sup>) y  $L$  es el área foliar dentro de la cá-

mara (m<sup>2</sup>). El flujo de salida está relacionado con el área foliar y la tasa de transpiración, motivo por el cual la ecuación anterior se puede reescribir como:

$$A_n = (u_e c_e - (u_e + L E) c_o) / L$$

y finalmente

$$A_n = [(u_e (c_e - c_o)) L^{-1}] E c_o$$

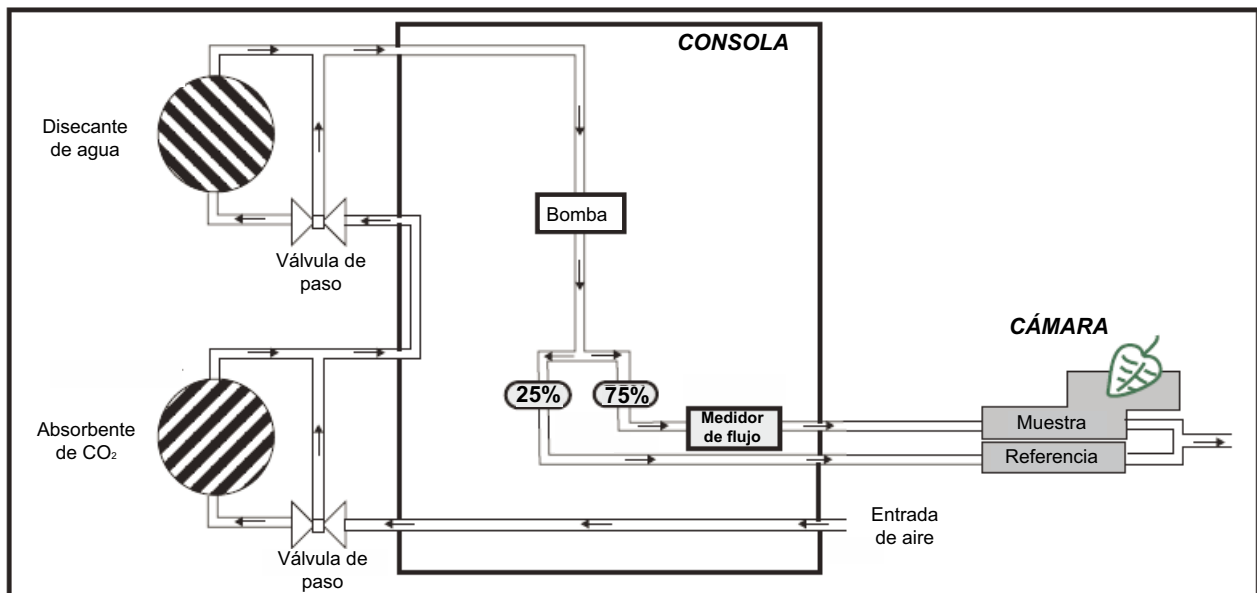
donde E es la tasa de transpiración (mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

### 3.1.1. ¿Por qué la transpiración aparece en la ecuación de fotosíntesis?

En relación con la cuantificación del proceso de fotosíntesis, es posible realizar mediciones sin medir la transpiración; sin embargo, es aconsejable medir ambas tasas por dos razones. En primer término, las dos mediciones son sinérgicas e interdependientes. La limitación de la fotosíntesis por el proceso de difusión debe ser vista como el producto de un compromiso entre las respuestas que tienden a incrementar la fotosíntesis y las que tienden a reducir la pérdida de agua. Sin la medición del intercambio de vapor de agua, este compromiso es muy difícil de evaluar. La segunda ra-

zón se basa en que la conductancia de la hoja al vapor de agua, calculada a partir de mediciones del intercambio de agua, es un parámetro crítico para la determinación del carbono intercelular de la cámara subestomática (C<sub>i</sub>) (Sharkey *et al.*, 1982). El C<sub>i</sub> es una medida de la disponibilidad del sustrato primario para la fotosíntesis y un parámetro necesario para la cuantificación de la limitación enzimática y aquella debida a procesos de difusión de la fotosíntesis (Sharkey *et al.*, 2007). Tanto las conductancias combinadas (hoja + capa límite, definida esta última como aquella porción de aire cercano a la hoja o cualquier superficie en que la concentración de un gas, temperatura y el patrón del flujo de aire se ven modificados por la hoja o superficie) como el C<sub>i</sub> derivados de las mediciones de intercambio de H<sub>2</sub>O poseen un importante valor en la interpretación de los valores de fotosíntesis.

Además de lo ya mencionado, de manera sencilla sirve como factor de corrección por dilución. A medida que la hoja agrega vapor de agua a la cámara se diluyen otros gases, entre ellos el CO<sub>2</sub>. Si bien se menciona puntualmente en esta sección, referente al equipamiento LI-6400, este punto es general a todos los equipos de medición que poseen dicho mecanismo.



**Figura 5:** Esquema de funcionamiento del LI-6400 sin el mixer ("mezclador") para controlar la concentración de CO<sub>2</sub>. Adaptado de los manuales de operación del Li-Cor (Li-Cor, 2004).



### 3.1.2. Control de las variables microambientales

Como fue citado anteriormente, las mediciones de fotosíntesis pueden ser influenciadas por numerosos factores internos y externos. Una de las ventajas que presenta el LI-6400, a diferencia del LI-6200, es que pueden controlarse las principales variables microambientales dentro de la cámara de mediciones, tales como la luz, humedad, temperatura y concentración de CO<sub>2</sub> (Li-Cor, 2004).

- Luz: El equipo ofrece tres posibilidades respecto a este parámetro: La opción “Sun+Sky” que no controla la intensidad de luz y utiliza radiación directa que ingresa a través de la parte superior de la cámara. Adicionalmente para marcar las tres opciones de luz las palabras “Sun+Sky” así como “Control de radiación mediante lámparas de LED rojos y azules”, ubicada al final de la primera columna y “Opción con Fluorómetro” en la columna dos (figura 6A). La radiación que alcanza la zona de medición se evalúa utilizando un sensor externo que mide la densidad de flujos de fotones (PPFD) en un rango de 400 a 700 nm. Si bien está colocado en una posición que busca minimizar el sombreado, no refleja exactamente la radiación que recibe la hoja. La hoja está sujeta al sombreado propio de la cámara, a distintos ángulos de incidencia y a la atenuación provocada por la lámina de film presente en la parte superior de la cámara (ver figura 6). Para solucionar este problema, el LI-6400 cuenta con otro sensor (gallium arsenide phosphide, GaAsP), de menor tamaño, colocado dentro de la cámara próximo a la hoja. Es de vital importancia colocar la cámara en forma normal a la radiación incidente en el momento de medición para evitar el sombreado, ya que es crítico disponer de una

iluminación pareja en las mediciones de intercambio de gases.

**Control de radiación mediante lámparas de LED rojos y azules.** El modelo 6400-02 (figura 6B) presenta un pico de radiación centrado en 670 nm y el modelo 6400-02B presenta un pico adicional de luz azul en 465 nm. En ambos casos se pueden fijar valores de PPFD (densidad de flujo de fotones fotosintéticos, del inglés “photosynthetic photon flux density”) en un rango de 0-2000  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . De esta manera se pueden realizar mediciones con la misma intensidad a distintas horas del día, a lo largo del año o inclusive evitando cambios producidos por nubes o el propio manejo del equipo. Adicionalmente se contribuye a evitar el calentamiento por parte de la radiación solar directa. La ventaja de contar con luz azul por separado es que permite indagar en la cinética de la apertura estomática (Zeiger *et al.*, 1987; Li-Cor, 2004). Dentro de la cámara, la intensidad de radiación se mide mediante un fotodiodo de silicón, que es parte de la lámpara y está calibrado sólo para medir la radiación de los LED con un error próximo al 10%.

**Opción con Fluorómetro** (6400-40; figura 6C), con el cual los LED rojos y azules pueden ser controlados independientemente para proveer radiación que induce la fotosíntesis. Los LED azules son esencialmente los mismos del 6400-02B y los LED rojos son de una longitud de onda de 635 nm. El mismo fluorómetro cuenta con dos sensores, uno de fluorescencia y uno de luz actínica. Los LED pueden ser modulados en frecuencia (0, 25, 1, 10 o 20 kHz) causando oscilaciones en la radiación incidente y cambios en la fluorescencia que pueden ser detectados por el mismo accesorio (para un detalle sobre la metodología de medición de fluorescencia de la clorofila ver capítulo 9).



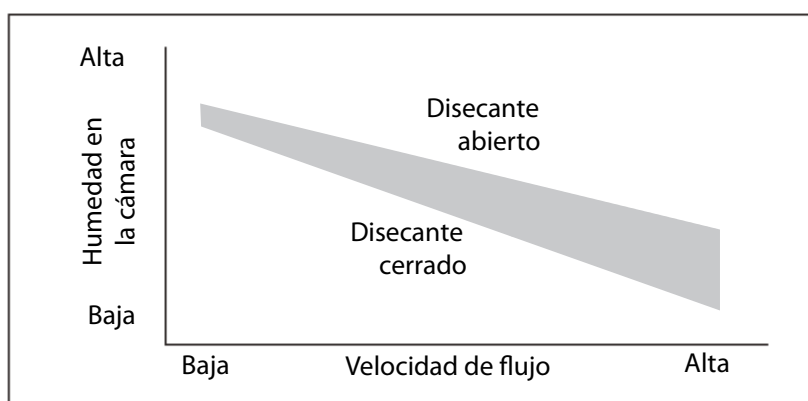
**Figura 6:** Distintos sistemas de iluminación utilizados por el sistema LI-6400. A) Sun+Sky; B) 6400-02; C) 6400-40.

- Humedad: La humedad dentro de la cámara puede ser controlada y mantenida constante durante la medición evitando cambios en la apertura estomática y así sobre la actividad fotosintética. Abriendo manualmente la válvula de paso del aire que ingresa al desecante de agua (en el LI-6400 sulfato de calcio anhídrido, "Drierite") se puede reducir el contenido de humedad ambiente. Si fuese necesario aumentar el contenido de humedad del aire que ingresa al sistema, existe la posibilidad de agregar agua (hasta 10 ml) al absorbente de CO<sub>2</sub> utilizado para eliminar el contenido de CO<sub>2</sub> del flujo de aire de entrada al equipo (en el LI-6400 compuesto por una mezcla de hidróxido de sodio, hidróxido de calcio y material inerte, "Soda lime"). Pese a esto, cabe aclarar que existe la posibilidad de que parte del polvillo de drierita húmedo, si los filtros no están en buen estado, ingresen al equipo siendo difícil su posterior extracción. Otra forma de controlar la humedad es ajustando, mediante la programación del equipo, la velocidad del flujo de aire que circula por la cámara. Mientras menor sea la velocidad del flujo de aire menor será el efecto de "barrido" sobre el intercambio total de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en la cámara (ver figura 7).

- Temperatura: El aumento de la temperatura en la cámara se logra utilizando un sistema dual de Peltier colocado a los lados de los IRGA en la zona del manillar (placa peltier, figura 4). Este dispositivo calienta el aire que circula por la cámara pudiendo

lograr cambios de hasta 6 °C respecto de la temperatura ambiente. El enfriamiento de la cámara se logra con ventiladores asociados a la placa de Peltier y cámara.

- Concentración de CO<sub>2</sub>: El sistema cuenta con dos opciones de control de la concentración de CO<sub>2</sub> en la cámara. La primera es regulando la cantidad de CO<sub>2</sub> que entra a la cámara mediante el accionamiento manual del absorbente de CO<sub>2</sub> ("Soda lime", mezcla de hidróxido de sodio e hidróxido de calcio). De esta manera se pueden mantener constantes valores más bajos respecto a la concentración del ambiente. La segunda forma de control es mediante un dispositivo adicional (6400-01 Mixer) que inyecta CO<sub>2</sub> al sistema y que se puede regular mediante programación; de esta manera se puede trabajar con las concentraciones normales o por sobre la concentración ambiente. Previo a accionar el Mixer se debe eliminar el ingreso de CO<sub>2</sub> del ambiente cerrando por completo la válvula de paso al absorbente de CO<sub>2</sub> ("Soda lime" full scrub). La capacidad de independizarse de la concentración de CO<sub>2</sub> del ambiente permite manejar por separado las concentraciones de H<sub>2</sub>O y de CO<sub>2</sub>. Además, el poder trabajar a mayores concentraciones de CO<sub>2</sub> atmosférico es fundamental para evaluar el comportamiento de la fase bioquímica de la fotosíntesis a partir de la concentración de carbono interno (curvas A-Ci).



**Figura 7:** Esquema de la combinación de mecanismos para el control de humedad. Adaptado de Li-Cor (2004). En la figura se muestra que mediante la combinación de la velocidad del flujo de aire en la cámara, y la apertura o cierre del paso del mismo por el desecante ("drierita") puede lograrse el balance de las condiciones de humedad relativa de la cámara. Así, por ejemplo, con velocidad de flujo bajo y la combinación con la apertura del desecante se logran valores altos de humedad relativa en la cámara.

### 3.1.3. Fugas

La precisión con que se pueda medir la concentración de CO<sub>2</sub> es fundamental para el cálculo de la tasa de asimilación. Considerando la baja concentración atmosférica del CO<sub>2</sub> (350 μmol mol<sup>-1</sup>) respecto a otros gases y su gran inestabilidad, es fundamental poder controlar las variables microambientales que influyen en la fotosíntesis en el momento de medición y evitar todo tipo de fugas. Existen dos tipos de fugas en estos sistemas: las pérdidas y la difusión. Las pérdidas ocurren cuando hay algún tipo de entrada o salida de aire al sistema adicional a las tomas especialmente concebidas para el funcionamiento del sistema abierto. Por otra parte, la difusión ocurre cuando algún gas se mueve a través de las paredes del sistema en respuesta a un gradiente.

- Pérdidas: Las presiones dentro de la cámara no son elevadas, motivo por el cual las pérdidas no suelen ser importantes y son fácilmente detectables. Para ello, se recomienda:

Revisar los O-rings (anillos selladores): Es frecuente que durante el cambio de las cámaras de medición algún O-ring quede mal colocado.

Revisar y mantener las juntas (almohadillas) de la cámara de medición: La parte blanca de la junta frecuentemente queda aplastada y la parte negra (neoprene) suele tomar la forma del material vegetal medido (por ejemplo, el pecíolo o tallo). Cuando la cámara está fuera de uso es recomendable aflojar el tornillo de regulación para evitar el aplastamiento. Adicionalmente, es recomendable reemplazar frecuentemente el material de esta junta.

Revisar el ajuste de la junta de la cámara al material vegetal al colocar el material vegetal en la cámara. Dependiendo de la porción que se coloque y de su dureza, pueden quedar huecos en las proximidades. En especies con bajas tasas de intercambio gaseoso o con un área foliar dentro de la cámara insuficiente para cubrir la misma, es necesaria la utilización de flujos bajos para captar la tasa de intercambio. En este caso el efecto de las pérdidas puede ser grave.

- Difusión: El CO<sub>2</sub> se mueve de altas a bajas concentraciones en el aire y en numerosos materiales

como plásticos o gomas sintéticas. La difusión dentro de la cámara del LI-6400 es proporcional a la diferencia de concentración interna y externa, a la relación entre la superficie de tubos y juntas, y al área foliar dentro de la cámara. Es bueno contar con grandes áreas foliares dentro de la cámara. Cuando las velocidades de flujo son altas, el flujo de difusión es despreciable; a la inversa, la difusión puede tener un efecto relevante. Para corregir los valores de fotosíntesis por efecto de la difusión se debe agregar un término más al balance de masas según:

$$A_n = (u_e (c_e - c_o) / L) - E + ((k(c_a - c_o) / L)$$

donde c<sub>a</sub> es la concentración de CO<sub>2</sub> ambiente y k es un coeficiente de difusión igual a 0,46.

La corrección por difusión es insignificante para mediciones próximas a la concentración de CO<sub>2</sub> ambiente pero se torna relevante cerca del punto de compensación de CO<sub>2</sub> (concentración de CO<sub>2</sub> mínima que se requiere para tener una fotosíntesis neta mayor a cero; ver capítulo 8 para una definición ampliada del término) momento en el que se puede sobreestimar la tasa de asimilación.

### 3.1.4. Mediciones

Para comenzar a medir con el LI-6400 es necesario esperar aproximadamente 10 minutos luego de encenderlo para permitirle al sistema alcanzar un valor de temperatura constante (etapa de calentamiento). Es recomendable seguir el siguiente listado de actividades sugerido por Li-Cor (2004):

**A-** Durante el calentamiento:

1. Preparar el Mixer o buffer de CO<sub>2</sub>. Colocar la cápsula de CO<sub>2</sub> (no olvidar el O-ring) o conectar el tanque buffer.
2. Controlar que los sensores de temperatura de aire, block y hoja arrojen valores similares y próximos a la temperatura ambiente (esto puede hacerse mediante el censado con la cámara abierta).
3. Controlar el funcionamiento y los valores de PPFD (densidad de flujo de fotones fotosin-

téticos) de la fuente de luz. Corroborar que esté el sistema configurado con la fuente de luz en uso.

4. Controlar los sensores de presión. Verificar su estabilidad y su valor. En este sentido, un valor razonable es de 100 kPa a nivel del mar.
5. Controlar el funcionamiento del ventilador. Apagar y prender el ventilador y escuchar el funcionamiento.
6. Controlar el flujo. Verificar los máximos valores y el funcionamiento de las válvulas de paso de los tubos con los químicos (soda lime y drierita). Abrir al máximo la válvula del soda lime con la bomba encendida para que circule aire externo por el sistema.

#### **B-** Luego del calentamiento

1. Controlar la caída a 0 del flujo. Apagar la bomba y el ventilador, el flujo debe caer a 1 o 2  $\mu\text{mol s}^{-1}$ .
2. Ajustar el cierre de la cámara.
3. Controlar que el  $\text{CO}_2$  alcance el 0. Fijar el flujo en 500  $\mu\text{mol s}^{-1}$ , cerrar la válvula de paso del  $\text{CO}_2$  (soda lime) y verificar que el  $\text{CO}_2$  de referencia esté por debajo de 5  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ . Si no se llega al valor de referencia se debe cambiar la soda lime.
4. Controlar que el  $\text{H}_2\text{O}$  alcance el 0. Fijar el flujo en 500  $\mu\text{mol s}^{-1}$ , cerrar la válvula de paso del  $\text{CO}_2$  (Drierite) y verificar que el  $\text{H}_2\text{O}$  de referencia esté por debajo de 0,2 o 0,3  $\text{mmol mol}^{-1}$ . Si no se llega al valor de referencia se debe cambiar el disecante, es común que presente una coloración azul violácea cuando está agotado (humedecido).
5. Calibrar el Mixer y la lámpara (opcional).
6. Controlar que la temperatura de hoja alcance la ambiental.
7. Fijar los valores de referencia de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Si está en uso el Mixer cerrar totalmente la válvula de la Soda lime y fijar el valor de  $\text{CO}_2$  de referencia por sobre la concentración ambiente (por ej. 400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ). El valor de humedad se fija regulando la válvula de paso del  $\text{H}_2\text{O}$  (drierita) al valor deseado (0-100 %). Antes de continuar se debe esperar a que el equipo alcance los valores fijados (puede tardar varios minutos).

8. Verificar pérdidas. Soplar alrededor de la cámara cerrada y vacía. El  $\text{CO}_2$  de la muestra no debería variar más de 1  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ .
9. Accionar el match de los IRGA. Esto permite verificar que ambos IRGAS sean capaces de estimar valores similares (cerca de 0 cuando la cámara esta vacía).  
Controlar el funcionamiento de la válvula.

#### **C-** Medición de la primera hoja

1. Fijar el valor de PPFd.
2. Fijar el  $\text{CO}_2$  de referencia en 400  $\mu\text{mol m}^{-1}$  y esperar a que estabilice (puede tardar varios minutos).
3. Si es necesario fijar el valor de temperatura.
4. Colocar la hoja en la cámara, la misma debe tocar la termocupla.
5. Definir el área foliar aproximada y la relación estomática.
6. Si es necesario fijar el valor de humedad.
7. Accionar el match.

Una vez colocada la hoja, definida la cámara a utilizar y lograda la estabilidad de los flujos, el sistema comenzará a arrojar automáticamente los valores de fotosíntesis, transpiración y el resto de los parámetros.

En algunos estudios fisiológicos o ecofisiológicos el interés está puesto, por ejemplo, en la respuesta fotosintética a variaciones del PPFd, en el efecto de distintos tipos de estrés sobre la fotosíntesis máxima o en la respuesta de la fase bioquímica. El LI-6400 cuenta con una función para realizar este tipo de evaluaciones, los autoprogramas.

#### *3.1.5. Autoprogramas*

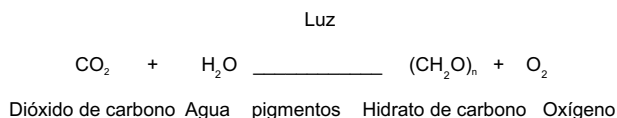
Los autoprogramas constan de una serie de parámetros programados por el fabricante. Se citan a continuación los más utilizados; sin embargo, el usuario puede programar sus propios programas (Li-Cor, 2004):

- Autologs (autoregistros): el mecanismo de auto-registro o autolog esta diseñado para registrar datos a intervalos regulares de tiempo. El usuario sólo debe fijar un valor de PPFd, el intervalo de tiempo entre mediciones, el tiempo total de medición y si se quiere, el intervalo de tiempo entre matcheos. Fi-

nalizado el intervalo de medición el sistema graba los valores medidos y su estabilidad. Para el análisis posterior de los datos debería tomarse el último valor registrado que correspondería al de mayor estabilidad.

- Curvas de tasa de fotosíntesis en función del PPFD (A-PPFD): el usuario debe fijar los valores de PPFD comenzando por saturación (ejemplo: 2000-1500-1000-750-250-100-0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). También, debe establecer un tiempo mínimo de duración de cada medición puntual y un máximo de espera para alcanzar la estabilidad para cada nivel de PPFD. Dichos tiempos deben ser estimados en función de la especie con la que se trabaje en particular así como las condiciones de tratamiento a las cuales se haya sometido a la misma. Esta estimación puede realizarse mediante mediciones preliminares. El sistema entregará los valores de fotosíntesis en cada nivel de PPFD y una estimación de la estabilidad de la medición (ver manual Licor 64000, 2004 para mas detalle). Durante la medición se puede ver el gráfico de evolución lo que permite seguir la construcción de la curva y hacer correcciones en caso de ser necesario. En el caso de construcción de curvas de respuesta a la luz, también conviene comenzar con una irradiancia similar a la que está expuesta la planta, e ir aumentándola (para mayor detalle sobre la metodología, ver capítulo 8). Una vez que se llegó a la máxima irradiancia que se quiere medir, volver a la inicial y comenzar el descenso paulatino de la intensidad de luz. Es muy importante verificar en cada punto que el valor de fotosíntesis se haya estabilizado, lo que puede llevar 5 minutos aproximadamente en cada nivel.

- Curvas de tasa fotosíntesis en función del carbono interno (A-Ci): el usuario debe fijar los valores de  $\text{CO}_2$  de referencia comenzando por valores próximos al ambiente, luego hacia el cero regresando a valores ambientales y finalmente superiores (ejemplo: 400-300-200-100-0-400-400-600-800-1200-1400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) (ver capítulo 8 para la descripción de porque seguir este orden de valores de  $\text{CO}_2$ ). Se establece el tiempo en cada nivel y los parámetros de estabilidad. El sistema entrega los datos de fotosíntesis en función del Ci. El cálculo de Ci surge de la siguiente ecuación:



donde  $C_i$  es el carbono interno ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ );  $g_{tc}$  es la conductancia total al vapor de agua ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), o sea estomática más cuticular;  $C_s$  concentración de  $\text{CO}_2$  en la muestra;  $A_n$  tasa de fotosíntesis y  $E$  transpiración. El usuario deberá ingresar el nivel de PPFD, el que deberá estar dentro del rango de saturación de fotosíntesis estimado a partir de curvas A-PPFD.

La construcción de curvas de respuesta a la luz y al  $\text{CO}_2$  son muy laboriosas, por lo que resulta muy importante definir qué información se quiere conseguir (ver capítulo 8), que tal vez se logre con la construcción de curvas parciales, con menor cantidad de puntos, lo que reducirá notablemente el tiempo de trabajo.

### 3.1.6. Recomendaciones generales

- Utilizar productos químicos (“soda lime” y “drierita”) en buen estado.
- Cambiar frecuentemente las juntas (almohadillas) de la cámara.
- Revisar el interior de la cámara, abriendo la misma, buscando restos vegetales que interrumpan el rayo del IRGA y retirarlos con pinza fina con mucho cuidado.
- En lo posible se debe tratar de cubrir con hoja la totalidad de la superficie de la cámara siempre y cuando la especie en estudio lo permita. En ningún caso la superficie utilizada debe ser menor que 1  $\text{cm}^2$  utilizando la cámara de 2 x 3 cm. Particularmente para la cámara de fluorescencia de 2  $\text{cm}^2$  este punto debe ser tenido muy en cuenta al medirse con dicha cámara la actividad fotosintética.
- Si se pretende comparar el efecto de algún tratamiento en la fotosíntesis o en las curvas de respuesta, es fundamental estandarizar la hoja en que se realizará la medición. Deben tener la misma edad, posición en el canopeo y exposición a la luz, ya que estas variables afectan la actividad fotosintética de la hoja dentro de una misma planta.
- Fijar, en lo posible, flujos superiores a 100  $\mu\text{mol s}^{-1}$ .



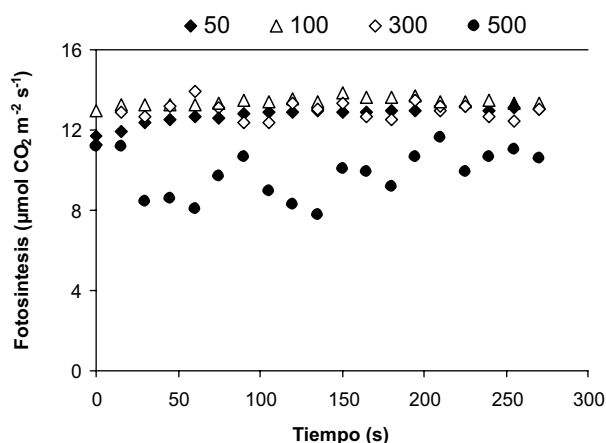
- Controlar durante la medición el  $\Delta\text{CO}_2$  (diferencia entre el  $\text{CO}_2$  de la muestra y de referencia). Debería ser superior a  $5 \mu\text{mol mol}^{-1}$  en los casos en que la hoja se encuentre fotosintetizando. Si esto no ocurriera se debe ajustar el flujo y/o el área foliar dentro de la cámara o el tiempo mínimo de espera en cada nivel de PPFD.

- Realizar un pre-muestreo para ajustar flujos, tiempos de espera y estabilidad en cada nivel de los autoprogramas. En las figuras 8 y 9 se muestran las diferencias en la respuesta fotosintética al variar los parámetros citados midiendo sobre una misma hoja.

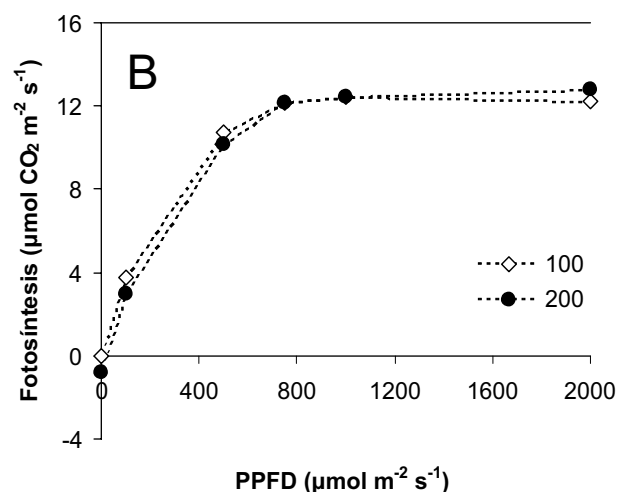
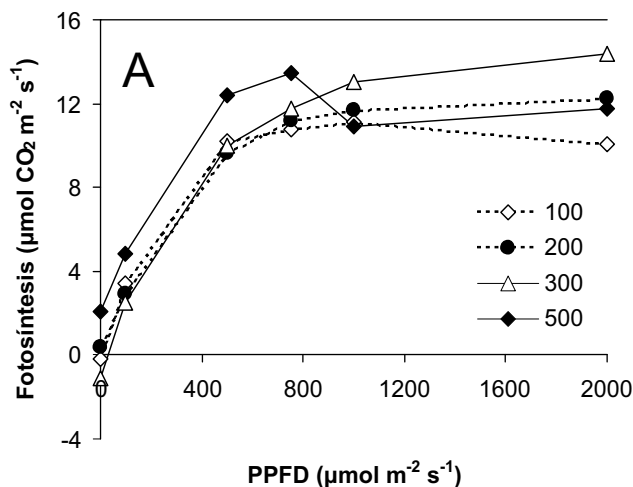
- Realizar "matcheos" periódicos para calibrar el funcionamiento de los IRGAs durante las mediciones.

**EJEMPLO:** La figura 8 muestra tasas de fotosíntesis similares en los menores niveles de flujo ( $50, 100, 300 \mu\text{mol s}^{-1}$ ) y una disminución notable con el flujo de  $500 \mu\text{mol s}^{-1}$ . Particularmente en este caso, se podría elegir un nivel de flujo promedio de  $200 \mu\text{mol s}^{-1}$ .

En la figura 9 se observa que al aumentar el flujo aumenta la tasa de fotosíntesis hasta un cierto nivel (figura 9A). Sería recomendable elegir el flujo de  $300 \mu\text{mol s}^{-1}$  a partir del cual no hay aumento de la asimilación de  $\text{CO}_2$ . Sin embargo, al aumentar el tiempo de espera en cada nivel de la curva no se ven diferencias notables entre el flujo de  $100$  y  $200 \mu\text{mol s}^{-1}$  (figura 9B).



**Figura 8:** Evolución de la tasa de fotosíntesis a lo largo del tiempo medida sobre la misma hoja variando el flujo ( $50, 100, 300$  y  $500 \mu\text{mol s}^{-1}$ ) (Caballé, sin publicar).



**Figura 9:** Evolución de la tasa de fotosíntesis en función del PPFD medida sobre la misma hoja. A) Tiempo de espera de  $60$  s por nivel y flujos de  $100, 200, 300$  y  $500 \mu\text{mol s}^{-1}$ ; B) Tiempo de espera de  $240$  s por nivel y flujo de  $100$  y  $200 \mu\text{mol s}^{-1}$ . (Caballé, sin publicar).

### 3.2. Sistema abierto CIRAS-2 (PP Systems, Massachusetts, EEUU)

El CIRAS-2 es otro sistema abierto y de tipo diferencial, pensado para permitir distinguir pequeñas diferencias en concentraciones de gases ( $\text{CO}_2$  y vapor de  $\text{H}_2\text{O}$ ), entre las muestras de análisis y de referencia en tiempo real. Su antecesor, el CIRAS-1, fue en 1992 el primer sistema abierto portátil con control automático de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , temperatura y luz (PP Systems, 2005). De acuerdo con el fabricante, la nueva versión se destaca por su sistema incorporado de auto calibración, que lo hace virtualmente libre de mantenimiento.



Asimismo, el equipo asegura excelente estabilidad de medición bajo condiciones ambientales cambiantes gracias al reseteo automático del cero del analizador (Auto-Zero) a intervalos regulares.

A diferencia del LI-6400, el CIRAS-2 cuenta con cuatro IRGA's ubicados en la consola principal: CO<sub>2</sub> de entrada (de referencia), CO<sub>2</sub> de salida de la cámara, H<sub>2</sub>O de entrada y H<sub>2</sub>O de salida (PP Systems, 2004). Esto es, según el fabricante, lo que lo convierte en un verdadero analizador diferencial. Respecto al Li-6400, cabe destacar que los IRGA's no están en la cámara sino en la consola, provocando un aumento en la posibilidad de error debido a la modificación que puede sufrir el flujo de aire desde la cámara hasta la consola y el diferencial de tiempo en la medición. La tasa de fotosíntesis neta ( $A_n$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) es calculada en base a la siguiente ecuación:

$$A_n = [(u_e \cdot (c_e - c_0)) - E \cdot c_0] / L$$

donde  $u_e$  es el flujo de aire de entrada ( $\text{mol s}^{-1}$ ),  $c_e$  y  $c_0$  son las concentraciones de CO<sub>2</sub> de entrada (referencia) y de salida de la cámara ( $\text{mol CO}_2 \text{ mol aire}^{-1}$ ),  $E$  es la tasa de transpiración ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y  $L$  es el área foliar dentro de la cámara ( $\text{m}^2$ ). Puede verse de esta forma la homología con la ecuación descripta para el equipamiento LI-6400.

### 3.2.1. Control de las variables microambientales

En el CIRAS-2, al igual en el LI-6400, es posible controlar las principales variables microambientales en mediciones de fotosíntesis: luz, temperatura, y concentraciones de CO<sub>2</sub> y de vapor de H<sub>2</sub>O.

- Luz: el equipo CIRAS-2 también permite trabajar con luz solar directa. En este caso, la radiación incidente puede ser registrada mediante dos pequeños sensores PPFD internos en la cámara, ubicados a nivel de la hoja.

Asimismo, el equipo cuenta con la posibilidad de emplear dos unidades externas de luz artificial, de lámpara halógena o de LEDs, para controlar la cantidad de PPFD que incide sobre la hoja, en un rango entre 0 y 2000  $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

La unidad que utiliza lámpara halógena de tungsteno (blanca incandescente) ofrece excelente distribu-

ción espectral en el rango de PPF, pero requiere el empleo de una batería de 12 V complementaria para suministrar suficiente energía para controlar la intensidad de radiación y el ventilador que enfría el dispositivo.

En tanto, la unidad lumínica en base a lámparas LED presenta menor consumo de energía, por lo cual puede alimentarse en base a las baterías internas del equipo, pero no consigue generar tan buena distribución espectral. Los picos de radiación estarían centrados en 665 nm y 470 nm, para longitudes de onda en rojo y azul respectivamente, con un error próximo al 10%.

También, al igual que en el LI-6400, CIRAS-2 permite trabajar con LEDs independientemente si se dispone del Módulo para Fluorescencia de Clorofila (CFM, por sus siglas en inglés) propio, que emplea la técnica de fluorescencia modulada (ver capítulo 9) para obtener parámetros de fluorescencia.

- Humedad: el equipo CIRAS-2 puede trabajar tanto con un porcentaje de la humedad relativa del ambiente como con un valor fijo controlado, o incluso con un determinado déficit de presión de vapor entre la hoja (considerada saturada) y la cámara. Para lograr distintas concentraciones de vapor de H<sub>2</sub>O en el aire que ingresa en la cámara, el equipo modifica el flujo de aire a través de las columnas con absorbentes. Este flujo puede variar entre 100 y 500  $\text{mL min}^{-1}$ , si bien normalmente se trabaja a alrededor de 200  $\text{mL min}^{-1}$ .

El equipo cuenta con dos tipos de desecantes: el "envirogel" y el "molecular sieve". El primero es sílica gel con el agregado de un indicador cromático (naranja cuando está seco y verde cuando está húmedo). A diferencia del Drierite, desecante que emplea el LI-6400, el sílica gel es capaz de absorber el 27% de su peso en agua (contra 7% del Drierite) y es un producto más económico. Cabe destacar que tanto el envirogel como el Drierite pueden ser recuperados deshidratándolos en estufa a 100 - 150 °C. El envirogel es menos eficaz en el desecado, logrando liberar el aire con una presión de vapor de alrededor de 0,04 mb (contra 0,005 mb del Drierite), pero esta efectividad se considera adecuada para este tipo de mediciones. Como criterio de uso, cuando el 50% de envirogel se muestre exhausto será necesario cambiarlo. El molecular sieve ("tamiz molecular") es el filtro final, tanto de H<sub>2</sub>O como de CO<sub>2</sub>. Se trata de un material blanco sin in-

dicador cromático de uso, por lo que se recomienda cambiarlo cada vez que se reemplace el envirogel presente en la misma columna.

Advertencia: Si se desea realizar mediciones con elevada humedad dentro de la cámara y el ambiente externo está muy seco, el equipo puede disminuir el flujo de aire para elevar la humedad interna. No se debe medir fotosíntesis en condiciones de flujo de aire menor a  $190 \text{ mL min}^{-1}$ . Para salvar esta situación es conveniente fijar un valor de humedad más bajo, o también colocar una servilleta húmeda en la parrilla de ingreso de aire al sistema, lo cual también puede permitir lograr valores superiores al del ambiente. De todas maneras, es importante que la humedad relativa dentro de la cámara nunca exceda el 75%, porque en esas condiciones el cálculo de la conductancia estomática se vuelve marcadamente inexacto debido a errores en las determinaciones de temperatura y humedad dentro de la cámara.

En la mayoría de los casos, tanto para mediciones puntuales como para curvas de respuesta, se recomienda utilizar un porcentaje de la humedad relativa ambiental ya que estos valores fijados permiten obtener mediciones estables en menor tiempo.

- Temperatura: el CIRAS-2 permite controlar la temperatura del aire que circula por la cámara en hasta  $8 \text{ }^\circ\text{C}$  por debajo de la del ambiente, y hasta un valor máximo de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . El control de la temperatura se realiza con componentes integrales de la propia cámara, constituidos por dos elementos Peltier (similar sistema que el del LI-6400): uno en la parte inferior de la hoja y otro en la superior. Las baterías internas del CIRAS-2 logran sólo un mínimo ajuste de la temperatura (variaciones no superiores a  $2 \text{ }^\circ\text{C}$  respecto a la temperatura del ambiente), por lo que para un mayor control térmico, o ante aumentos muy pronunciados de la temperatura dentro de la cámara cuando se opera con radiación solar directa, es necesario alimentar la pinza de medición con una batería de  $12 \text{ V}$  externa, que puede ser de automóvil o de moto. Para trabajos en laboratorio, el equipo puede trabajar conectado directamente a la red eléctrica, para lo cual es necesario que al menos una batería esté colocada en el aparato al encenderlo.

- Concentración de  $\text{CO}_2$ : en el control de la concentración de  $\text{CO}_2$  del aire que ingresa en la cámara es posible seleccionar que el valor fijado se alcance

de manera aproximada (más rápida) o exacta ( $\pm 2$  ppm). El equipo elimina primero el  $\text{CO}_2$  del aire que ingresa al sistema mediante el paso a través de columnas con absorbentes y luego inyecta la cantidad necesaria de  $\text{CO}_2$  para alcanzar los valores deseados. Nuevamente existe una homología entre la forma en la que funciona este equipo y el LI-6400. Los absorbentes o desdecantes utilizados en este proceso son el Soda lime (mezcla sólida de hidróxidos de sodio y de calcio, al igual que en el LI-6400) y el molecular sieve. El primero también cambia de color a medida que se consume (como el envirogel antes comentado), virando en este caso del verde al marrón, pero una vez exhausto no puede recuperarse y debe descartarse con mucha precaución. Cambiarlo cuando más de  $2/3$  del material presente en la columna haya virado de color.

### 3.2.2. Fugas

Las consideraciones hechas respecto a las fugas en el sistema LI-6400 resultan también válidas en el CIRAS-2. Para evitar o minimizar estos problemas es importante:

- Evitar realizar mediciones con flujos de aire demasiados bajos (no menor a  $190 \text{ mL min}^{-1}$ ).

- Revisar el estado de los O-rings de las columnas de absorción y del equilibrador de vapor de  $\text{H}_2\text{O}$ .

- Revisar periódicamente el estado de las almohadillas de cierre de la cámara. No dejar la pinza cerrada por largos períodos mientras el aparato no se encuentre en uso, porque las almohadillas quedan comprimidas y dejan de funcionar bien (consideración válida también para el LI-6400). Para verificar su hermeticidad, con el equipo en funcionamiento se sopla alrededor de la cámara cerrada y vacía (sin hoja en su interior), y se observa la medición de  $\text{CO}_2$ : un aumento repentino en la concentración indica que hay pérdidas en las juntas. Puede colocarse grasa siliconada en la almohadilla de cierre y repetirse esta evaluación. Si el problema persiste, es necesario cambiar las juntas.

- Si cuando se está realizando una medición los parámetros muestran comportamiento errático, es señal de que está habiendo fugas en el sistema. Verificar el estado de las almohadillas de cierre y que todas las mangueras estén correctamente colocadas. En operación a campo, o cuando el equi-

po se está manipulando en situaciones de trabajo incómodas, muchas veces las mangueras pueden soltarse, generando valores erráticos en alguno de los parámetros.

### 3.2.3. Precauciones con el inyector de CO<sub>2</sub>

El inyector emplea cilindros metálicos descartables de 10 cm<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub> puro a alta presión, con una duración media de 8 h. La colocación y recambio de estos cilindros requiere de ciertos cuidados y es necesario seguir una serie de recomendaciones:

1) El cilindro NO debe ser retirado mientras conserve cierta presión; se deben dejar pasar como mínimo 24 horas antes de retirarlo del equipo.

2) Si no es seguro que el cilindro que quedó inserto de una operación anterior esté vacío, es preferible verificar su carga. Para esto, encender el equipo y fijar la concentración de CO<sub>2</sub> de referencia en 1500 ppm: si la medición no alcanza rápidamente dicho valor y decrece paulatinamente, la carga del cilindro es insuficiente y debe reemplazárselo. Esto puede hacerse con el equipo en funcionamiento, pero tomar siempre la precaución de no exponer el rostro en la dirección en la que podría salir proyectado el cilindro.

3) Luego de la colocación de un cilindro nuevo y en caso de querer corroborar el adecuado flujo de CO<sub>2</sub>, puede sumergirse el dispositivo que porta el cilindro en un recipiente con agua y observar el burbujeo: debe aparecer alrededor de una burbuja por segundo.

4) Si el CO<sub>2</sub> de referencia comienza a disminuir durante la medición, verificar el estado de las baterías antes de cambiar el cilindro. Cuando la batería tiene baja carga puede que no logre controlar correctamente la inyección de CO<sub>2</sub>. Transcurrido un tiempo, el equipo detecta la baja carga y cambia automáticamente la fuente a la batería de repuesto, pero esto puede acelerarse retirando la batería con baja carga. En este caso, se debe esperar a que el CO<sub>2</sub> de referencia se establezca nuevamente antes de reiniciar la medición.

5) Luego de terminar las mediciones, el cilindro de CO<sub>2</sub> debe permanecer inserto hasta que se complete su descarga de manera segura, con el equipo apagado. Advertencia: el equipo NO debe quedar dentro de su bolso de transporte, porque el CO<sub>2</sub>

liberado consumiría los absorbentes y causaría la pérdida prematura de los mismos.

### 3.2.4. Mediciones

Al igual que en el LI-6400, el CIRAS-2 requiere un calentamiento previo al inicio de las mediciones de aproximadamente 10 minutos. Es recomendable asegurarse comenzar el trabajo con las baterías completamente cargadas, los químicos absorbente frescos y el cilindro de CO<sub>2</sub> con suficiente carga.

Por otro lado, a diferencia del LI-6400, el CIRAS-2 permite la visualización simultánea, en pantalla a color y en tiempo real, de hasta 15 variables de medición y gráficos, en el entorno de Microsoft Windows. El fabricante asegura que la pantalla del equipo ha sido optimizada para su uso a campo, pero en la práctica puede resultar de difícil visualización, sobre todo cuando se trabaja a pleno sol.

**A.** Previo a iniciar cualquier trabajo de medición, es necesario establecer en el programa los parámetros para la misma:

1. El tipo de cámara que porta la pinza y el área foliar que abarca (se recomienda cubrir toda la superficie de la cámara, para evitar problemas en la determinación del área foliar)
2. El flujo de aire (se recomienda un valor de 200 mL min<sup>-1</sup>, pero obviamente el seteo debe hacerse en función del material con el que se va a trabajar)
3. El tipo de luz en uso
4. La relación estomática entre las caras de la hoja (valores por defecto si no se conoce esta información)
5. El tipo de control del vapor de H<sub>2</sub>O (% del ambiental o valor fijo)
6. El tipo de control del CO<sub>2</sub> (valor aproximado o exacto). En la pantalla del equipo se muestran los valores medidos y calculados en cada instante, así como los valores fijados por el usuario (tabla 1).

**B.** Antes de comenzar a realizar las mediciones es necesario asegurarse de que los valores fijados son alcanzados efectivamente y se logra la estabi-

lidad de todos los valores medidos. Para esto se debe realizar el procedimiento de chequeo del sistema sin hoja dentro de la cámara cerrada:

1. El voltaje de las baterías debe ser superior a 13 V.
2. La temperatura de la cámara debe ser cercana a la ambiental y la de la hoja debe diferir en más de 2 °C.
3. Se debe calibrar la lámpara y chequear el valor fijado de luz.
4. Se fija el CO<sub>2</sub> de referencia (Cr) en cero y el valor que surja de la medición debe ser inferior a 10 ppm y permanecer estable. Si no se llega a este valor se debe cambiar el soda lime.
5. El diferencial de CO<sub>2</sub> (Cd) debe ser cercano a cero y estable ( $\pm 2$  ppm). De no ser así, chequear las almohadillas de cierre de la cámara.
6. Luego se fija el valor de CO<sub>2</sub> de referencia (Cr) en un valor de 1500 ppm. El valor final alcanzado debe estar situado alrededor de 30 ppm del valor establecido y debe ser es-

table ( $\pm 2$  ppm). Si no se alcanza dicho valor, reemplazar o conectar correctamente el cilindro de CO<sub>2</sub>.

7. Se fija el H<sub>2</sub>O de referencia (Hr) en cero y el valor medido debe ser inferior a 0,1 mb y permanecer estable. Si no se llega al valor de referencia se debe cambiar el envirogel.
8. El diferencial de H<sub>2</sub>O (Hd) debe ser cercano a cero y estable ( $\pm 0,2$  mb).

**C. Mediciones:** luego de realizar los chequeos del sistema, ya se pueden comenzar las mediciones en hojas con especial precaución de esperar la estabilización de las variables medidas antes de registrar los valores. Este proceso puede llevar varios minutos.

Periódicamente, el equipo verifica el cero del analizador (Zero); es decir, hace pasar una misma muestra de aire libre de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O a través de los distintos sensores IRGA y chequea que estén informando el mismo valor. Esto permite determinar el correcto estado de los absorbentes, así como la existencia de fugas en el sistema.

Valores medidos	
Cr CO <sub>2</sub> de referencia (ppm)	Cd Diferencial de CO <sub>2</sub> (ppm)
Hr H <sub>2</sub> O de referencia (mb o %)	Hd Diferencial de H <sub>2</sub> O (mb o %)
Ap Presión atmosférica (mb)	HR calculada (%)
Tc Temperatura en cámara (°C)	TI Temperatura de la hoja (°C)
Q PAR ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Vm Flujo de aire ( $\text{mL min}^{-1}$ )
Valores fijados por el usuario	Valores calculados
A Área Foliar ( $\text{cm}^2$ )	An Tasa de fotosíntesis neta ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
V Flujo de aire ( $\text{mL min}^{-1}$ )	E Tasa de transpiración ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
Q PAR ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Gs Conductancia estomática ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
C CO <sub>2</sub> de referencia (ppm)	Ci Concertación interna de CO <sub>2</sub> (ppm)
H H <sub>2</sub> O de referencia (mb o %)	VPD Déficit de presión de vapor (mb)
T Temperatura en la hoja (°C)	

**Tabla 1:** Variables medidas, calculadas y fijadas por el usuario en el CIRAS-2

Asimismo, para conocer la precisión en la determinación de diferencias entre los valores absolutos de concentración en las muestras de referencia y de análisis, el equipo permite hacer balances de la información generada por los sensores para emparejarlos. Esto se logra haciendo pasar a intervalos regulares la misma muestra de referencia por todos los sensores, de entrada y salida de la cámara ("Diferencial Balancing"). En el caso de que hubiera alguna diferencia, el sistema determina el balance diferencial (la diferencia medida entre los sensores) y lo almacena para aplicarlo a las futuras mediciones.

Es recomendable realizar un cero cada media hora y un balance diferencial luego de cada medición. También puede solicitarse un cero manual en cualquier momento durante la operación del equipo.

#### 3.2.4.1. Tipo de medición

- Manual: este es el método más apropiado para la mayoría de las mediciones en el campo, en las que se quiere evaluar la tasa de fotosíntesis natural o bajo luz saturante de plantas con buen estado hídrico. En estos casos, luego de transcurridos 6 segundos de cerrar la cámara sobre una hoja, se empezarán a observar valores de diferencial de CO<sub>2</sub> negativos y de H<sub>2</sub>O positivos. Previo a registrar un dato, es necesario esperar que la hoja se ajuste a las condiciones de la cámara, lo cual puede demorar entre 45 y 60 segundos dependiendo de las condiciones. Para evaluar la estabilización de los valores se recomienda basarse en el diferencial de CO<sub>2</sub> graficado a lo largo del tiempo. Una vez lograda esta estabilidad, se puede tomar el dato manualmente, presionando el botón correspondiente en la pinza.

-A lo largo del tiempo: este método resulta interesante para evaluar la fotosíntesis de una hoja a lo largo del día, bajo condiciones naturales de luz y temperatura. El CIRAS-2 puede ser programado para tomar datos automáticamente a lo largo de un período con intervalos preestablecidos al igual que como se mencionó para los auto programas y auto-registros del LI-6400. Para la toma de cada valor se puede especificar que se cumplan ciertas condiciones de estabilidad. El manual sugiere utilizar como condición el rango de variación en la tasa de fotosíntesis neta (An), el cual no debe superar los 0,5 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> por un periodo superior a los 10 segundos.

#### 3.2.5. Autoprogramas: Curvas de respuesta

De manera similar a lo descrito para el LI-6400, también es posible con el CIRAS-2 realizar curvas de tasa de fotosíntesis en función de la radiación (A-PPFD) y del carbono interno (A-Ci). En general, estas curvas de respuesta son muy arduas y requieren un tiempo considerable que puede fácilmente superar los 30 minutos, por lo que la suficiente disponibilidad de baterías cargadas puede ser un factor limitante a prevenir (siendo válida esta consideración para cualquier tipo de equipamiento). Suelen realizarse sobre hojas estandarizadas, en condiciones más o menos estables de humedad relativa y con una temperatura constante de alrededor de 25 °C. En estas curvas se establecen una serie de niveles con distintos valores, o bien de intensidad de luz o de concentración de CO<sub>2</sub>. En cada nivel es necesario un tiempo de espera de al menos 120 segundos para permitirle a la hoja ajustarse a las condiciones micro-ambientales de la cámara. Una vez concluido este tiempo, pueden establecerse ciertas condiciones de estabilidad para registrar cada dato, tal como fue desarrollado anteriormente.

### 4. Consideraciones finales

En el presente capítulo queda demostrado que las técnicas de intercambio gaseoso y particularmente la utilización de equipos IRGA han provisto y proveen de valiosa información para el estudio macroscópico de la respuesta de las plantas al ambiente (McDermitt *et al.*, 2000). Por este motivo, agrónomos, fisiólogos de cultivos, ecofisiólogos vegetales y horticultores han utilizado esta técnica y equipamientos para estudiar la respuesta de las plantas a tratamientos experimentales, así como los fisiólogos vegetales y los bioquímicos las han utilizado para obtener el conocimiento exacto de los mecanismos químicos y físicos causantes de dichas respuestas. Por lo expuesto, el campo de aplicación de esta técnica y equipamientos es amplio y debido a que el funcionamiento y más aún la correcta utilización de los mismos no es tarea fácil o de corto plazo el presente capítulo intentó ser una breve descripción de dos de los equipamientos más utilizados actualmente y un resumen de los aspectos críticos a considerar en la utilización de los mismos.



## 5. Bibliografía

- Bohnert H J y R G Jensen (1996) Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol.* 14: 89-96.
- Brodribb T J y N M Holbrook (2004) Stomatal Protection against Hydraulic Failure: A Comparison of Coexisting Ferns and Angiosperms. *New Phytol.* 162: 3 663-670.
- Li-Cor (2004) Using the LI-6400. Portable Photosynthesis System. Version 5. LI-COR Biosciences, Inc., Lincoln, Nebraska, EEUU.
- McDermitt DK, RL Garcia, JM Welles y TH Demetriades-Shah (2000) Common errors in gas exchange measurement. En: Yunus, M.; Pathre, U.; Mohanty, P. (Eds.) *Probing Photosynthesis.* London, New York. Taylor and Francis.
- Medrano H, J M Escalona, J Bota, J Gulías y J Flexas (2002) Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: the interest of stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany.* 89:895-905.
- Pearcy R W, J Ehleringer, H A Mooney y P W Rundel (1996) *Plant physiological ecology: field methods and instrumentation.* Chapman & Hall. Londres. pp 457.
- PP Systems (2004) CIRAS-2. Portable Photosynthesis System Operator's Manual. Version 2.02. PP Systems, Amesbury, Massachusetts, EEUU.
- PP Systems (2005) Product catalog. PP Systems, Amesbury, Massachusetts, EEUU.
- Ramos Tamayo P, O Weiss y A M Sánchez-Moreiras (2001) Gas exchange techniques in photosynthesis and respiration. *Infrared Gas Analyzer. Handbook of Plant Ecophysiology Techniques.* In: Manuel J. Reigosa Roger, M. J. (Ed.), Kluwer Academic Publishers. pp 452.
- Sharkey T D, K Imai K, G D Farquhar e IR Cowan (1982) A direct confirmation of the standard method of estimating intercellular partial pressure of CO<sub>2</sub>. *Plant Physiol.* 69:657-659.
- Sharkey T D, C J Bernacchi, G D Farquhar y E L Singaas (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant Cell and Environ.* 30: 1035-1040.
- Sitte P, E W Weiler, J W Kadereit, A Bresinsky y C Körner (2002) Strasburger, *Tratado de Botánica.* Ediciones Omega, España. pp 1134.
- Taiz L y E Zeiger (1998) *Plant Physiology.* Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. pp 792.
- Tardieu F y T Simoneau (1998) Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modeling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany.* 49:419-432.
- Zeiger E, M Lino, K I Shimazaki y T Ogawa (1987) "The Blue-Light Response of Stomata: Mechanism and Function." En: *Stomatal Function.* Zeiger E, DD Farquhar, I R Cowan (Ed). Stanford, California: Stanford University Press.
- Zhang N y A R Portis (1999) Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:9438-9443.
- Zhang N, R P Kallis, R G Ewy y A R Portis Jr (2002) Light modulation of Rubisco in Arabidopsis requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:3330-3334.
- Zlatev Z, M Berova y A Vassilev (2003) Use of physiological parameters as stress indicators. *Journal of Experimental Protection and Ecology* 4(4):841-849.