

## ÍNDICE GENERAL

### TÉCNICAS DE MEDICIÓN EN ECOFISIOLOGÍA VEGETAL: CONCEPTOS Y PROCEDIMIENTOS

Prólogo de los editores  
Prólogo de invitados  
Agradecimientos de los editores  
Listado de autores  
Listado de revisores

Capítulo 1: Control versus realismo en estudios ecofisiológicos: opciones de diseño y procedimientos en experimentos de sequía

1. Introducción
2. Preguntas, diseño y compromisos
  - 2.1. Los objetivos de la investigación
  - 2.2. Compromisos de diseño: estadística y tipos de variable
3. Experimentos de sequía: del plan general al detalle
  - 3.1. Tipos de experimentos
  - 3.2. Control de la disponibilidad de agua
  - 3.3. Variables, cosechas y duración
  - 3.4. Macetas: sustrato, volumen y consumo de agua
  - 3.5. Planificación y gestión del experimento
4. Conclusión
5. Bibliografía

Capítulo 2: Introducción al uso de colectores de datos y sensores

1. Introducción
2. Algunas definiciones a tener en cuenta
3. Tipos de colectores de datos
4. Capacidad de almacenamiento de datos
5. Tipos de puerto de los colectores de datos
6. Tipos de sensores según su señal
7. Algunos principios de funcionamiento de sensores de mayor uso en el campo de la ecofisiología vegetal
  - 7.1. Contenido de agua en el suelo
  - 7.2. Contenido volumétrico de agua en el suelo
  - 7.3. Contenido de humedad en el aire
  - 7.4. Viento
  - 7.5. Radiación solar
  - 7.6. Temperatura
  - 7.7. Precipitación
8. Programación 38

Capítulo 3. Flujo de savia mediante el método de disipación de calor

1. Introducción
  - 1.1. Circulación del agua en un árbol
  - 1.2. Xilema activo
2. Descripción de algunos métodos de estimación de flujo de savia
  - 2.1. Método de disipación de calor
  - 2.2. Método de pulso de calor (Pulse heat velocity)
  - 2.3. Método de balance de calor (Thermal heat balance) 42
3. Funcionamiento de una termocupla

4. Armado de los sensores
5. Determinación de la cantidad de corriente según la resistencia del sensor
6. Armado de sistema de alimentación eléctrico
  - 6.1. Conexión a un sistema eléctrico domiciliario (110 o 220volts)
  - 6.2. Conexión del equipo a paneles solares
7. Instalación del sistema en el campo
  - 7.1. Instalación del sistema de 12V
  - 7.2. Instalación de los sensores en los árboles
  - 7.3. Instalación de cables de los sensores al regulador de tensión y al colector de datos o al multiplicador de canales
8. Cálculo de flujo de savia
9. Relleno de series temporales
  - 9.1. Identificación de huecos temporales en los datos
  - 9.2. Identificación de períodos de datos con errores
  - 9.3. Llenado de datos faltantes y errores
10. Posibles problemas durante la instalación en el campo (cortocircuitos, falta de señal, temperatura en el tronco)
11. Listado de equipamiento y herramientas útiles
12. Algunas soluciones prácticas (distintos tipos de termocuplas, sistema de promedio de señal)
  - 12.1. Sensores de longitud variable para medir la densidad de flujo de savia a distintas profundidades
  - 12.2. Método de medición de flujo de savia para promediar los valores de distintos sensores
  - 12.3. Método de medición con energía no continua para estimar los flujos naturales de temperatura
13. Cambio de escala de árbol a rodal
14. Grupo de trabajo de flujo de savia
15. Bibliografía

#### Capítulo 4. Conductancia y conductividad hidráulica

1. Introducción
2. Definiciones
  - 2.1. Ecuación de Darcy
  - 2.2. Conductancia hidráulica (K)
  - 2.3. Conductancia hidráulica total entre el suelo y las hojas ( $K_{\text{planta}}$ )
  - 2.4. Conductividad hidráulica (k o kh)
  - 2.5. Conductividad hidráulica específica (ks)
  - 2.6. Conductividad hidráulica foliar específica (kl)
3. Estimación teórica de la conductividad hidráulica
4. Mediciones en tallos finos o ramas (segmentos de madera con corteza)
  - 4.1. Conductímetro para medir varias muestras a la vez (multicanal)
  - 4.2. Perfusionador de alta presión
  - 4.3. Medición del área de xilema activo
5. Mediciones en trozos de madera sin corteza (trozo de un tallo)
6. Medición de conductividad hidráulica específica localizada (en anillos de crecimiento)
7. Consideraciones al coleccionar el material en el campo
8. Conductancia hidráulica en sistemas radicales
9. Conductancia hidráulica en hojas
  - 9.1. Conductancia a nivel de hoja ( $K_{\text{hoja}}$ )
  - 9.2. Conductancia de la lámina
  - 9.3. Conductividad del peciolo
10. Otros métodos para medir conductividad hidráulica
  - 10.1. Medidor de flujo de alta presión (HPFM)
  - 10.2. Método de flujo evaporativo
  - 10.3. Medidor de conductividad mediante la utilización de cámaras de vacío

## 11. Bibliografía

Anexo 1

Anexo 2

### Capítulo 5. Curvas de vulnerabilidad a la cavitación

1. Introducción
2. Definición de curva de vulnerabilidad a la cavitación
3. Construcción de una curva de vulnerabilidad a la cavitación
  - 3.1. Cálculo de la pérdida porcentual de conductividad hidráulica (PCH)
  - 3.2. Cálculo de conductividad máxima ( $k_{max}$ )
  - 3.3. Medición en segmentos simples o apareados
  - 3.4. Métodos de generación de embolismos (deshidratación natural, inyección de aire – cámara de doble entrada, fuerza centrífuga, etc.)
4. Ejemplos de medición de curvas de vulnerabilidad en otros órganos de las plantas
  - 4.1. Medición en raíces
  - 4.2. Medición en leño
  - 4.3. Medición en pecíolos

### Capítulo 6. Curvas presión-volumen para estimación de parámetros hídricos

1. Introducción
2. Metodología para la construcción de las curvas PV
  - 2.1. Obtención de los datos
  - 2.2. Construcción de la curva PV
3. Precauciones y normas de seguridad
4. Bibliografía

### Capítulo 7. Sistemas IRGA en la medición de intercambio gaseoso

1. Introducción
2. Análisis infrarrojo de gases
  - 2.1. Sistemas cerrados
  - 2.2. Sistemas abiertos
3. Descripción de dos analizadores de gases portátiles
  - 3.1. Sistema abierto LI-6400 (Li-Cor Inc., Nebraska, EEUU)
  - 3.2. Sistema abierto CIRAS-2 (PP Systems, Massachusetts, EEUU)
4. Consideraciones finales
5. Bibliografía

### Capítulo 8. Técnicas de medición de intercambio de gases en plantas: curvas de respuesta de la fotosíntesis a la luz y al CO<sub>2</sub>

1. Introducción
2. Curvas de fotosíntesis versus luz (PPFD)
  - 2.1. Fundamentos y parámetros
  - 2.2. Algunas aclaraciones respecto de las curvas de fotosíntesis vs PPFD
  - 2.3. Obtención de la curva  $A_n$ / PPFD
3. Curvas de respuesta  $A_n$  versus CO<sub>2</sub>
  - 3.1. Fundamentos y parámetros derivados
  - 3.2. Realización de la curva
  - 3.3. Algunas consideraciones respecto a las curvas A/C
4. Manipulación del nivel de oxígeno (condiciones no-fotorrespiratorias)
5. Bibliografía

### Capítulo 9. La fluorescencia modulada de la clorofila: método del pulso saturante

1. Introducción
2. Fundamentos
3. Fluorescencia modulada y método del pulso saturante

- 3.1. Parámetros y coeficientes básicos de fluorescencia
- 3.2. Procedimiento operativo para la evaluación de los distintos parámetros
4. Algunas consideraciones y precauciones importantes a tener en cuenta
5. Coeficientes recomendados según el objetivo de estudio
6. Bibliografía

#### Capítulo 10. Uso de isótopos estables como marcadores de procesos ecológicos

1. Introducción
2. Uso de isótopos estables del carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) para determinar la eficiencia en el uso del agua de las plantas 154
  - 2.1 Muestreo para estudios con  $^{13}\text{C}$
3. Uso de isótopos estables del hidrógeno ( $\text{D}/^1\text{H}$ ) y oxígeno ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) para determinar fuentes de agua e interacciones planta-planta
  - 3.1. Muestreo para estudios con  $^{18}\text{O}$  y D
  - 3.2. Modelos de mezclas y cuantificación de aportes de distintas fuentes
4. Otros usos de los isótopos estables en ciencias ambientales
5. Bibliografía

## PRÓLOGO DE LOS EDITORES

Esta es la primera versión de un libro que nace sabiendo que debe crecer y actualizarse permanentemente. Se origina intentando satisfacer una necesidad de todo aquel que intenta formar ecofisiólogos o intenta por sí mismo empezar a trabajar en esta apasionante disciplina. Como ecofisiólogos “autodidactas” (no en referencia a lo conceptual, pero sí en lo metodológico), formándonos en el contexto de la ciencia argentina, es decir, sin un técnico-idóneo en electrónica que nos asistiera, sufrimos la ausencia de un manual al que consultar para armar ciertos equipos y manejar otros (en particular, cómo medir flujo de savia de árboles, vulnerabilidad a la cavitación, fotosíntesis, etc), y debimos dedicar meses enteros a descifrar un lenguaje que muchas veces se hace incomprensible para los biólogos u otros profesionales de las ciencias ambientales. Bien, recordando esos tiempos (no tan viejos) es que pensamos en reunir la experiencia de nosotros y de otros como nosotros, tratando de allanar el camino de las nuevas generaciones y de esa manera, hacer más eficiente el uso del tiempo dedicado a la generación de conocimiento. En general, las técnicas aquí expuestas no han sido “inventadas” por los autores de los distintos capítulos (a veces, sí mejoradas), sino que fueron aprendidas a partir de contactos con profesionales en otros países, lectura de bibliografía dispersa e inclusive, charlas de café. Es la intención de este libro reunir la información existente en torno a distintas técnicas para que quede plasmada de manera formal, sujeta a futuros análisis, discusión y actualización. La formalidad de los capítulos no excluye, sin embargo, aquellas “*recetas de cocina*” que muchas veces son determinantes del éxito en el empleo y aplicación de una determinada técnica. Estas pocas veces aparecen en las publicaciones especializadas, salvo en el desarrollo inicial de las mismas, y en ocasiones quedan lejos de poder ser aplicadas en primera instancia por grupos alejados de la vanguardia científica que las vio nacer.

Por supuesto, el desarrollo de técnicas de cuantificación y análisis de variables biológicas está en permanente avance, yendo a veces más rápido aún que el desarrollo de los conceptos teóricos relativos a los principios biofísicos de las variables que se intentan medir. Por eso, la vocación de este libro es ir avanzando a medida que se sumen los esfuerzos y la generosidad de distintos profesionales que, desinteresadamente, deseen aportar su experiencia en el uso de técnicas de medición.

Alguien mencionó que este libro podría tener como precursor a –o más ambicioso aún, ser el sucesor de– el famoso “libro rosa” (*Plant Physiological Ecology: Field Methods and Instrumentation*, editado por RW Pearcy, J Elheringer, HA Mooney y PW Rundel, 1991). Nosotros somos más humildes. Ese libro es excelente y difícil de igualar por la calidad científica y técnica de aquellos que fueron sus autores. Este otro intenta abarcar temáticas que en dicha obra no son abordadas, y en el caso de incurrir en la repetición de algún tópico, se ha escrito desde una visión muy práctica, apuntando al profesional en formación, que podrá consultar otras fuentes para ampliar el fundamento teórico de la misma técnica.

¿Por qué elegimos los temas que elegimos? Los temas surgieron de la experiencia personal en el campo de la ecología funcional, y de la experiencia de profesionales de éste u otros campos de la investigación con los que tenemos un intercambio frecuente de ideas. Asimismo, este libro es el fruto de la planificación de un proyecto de investigación financiado por el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Proyecto Específico “Bases ecofisiológicas para la silvicultura de implantación y conducción”), que involucra cierto contexto conceptual y recursos humanos. Si bien los temas y autores de los capítulos exceden ampliamente el ámbito de dicho proyecto, de ninguna manera pretendimos cubrir todos los aspectos que un libro así pudiera abordar, ni convocamos a todos los excelentes profesionales que la propia ciencia argentina, y del resto del mundo hispano-hablante, podrían haber proporcionado. Queremos remarcar este aspecto enfatizando que no se excluyó adrede a absolutamente a nadie, ni a ningún tema; por el contrario, queda abierta la convocatoria a todo aquel que quiera sumarse en las próximas ediciones de actualización que debe tener todo libro nacido con vocación de ayudar en los aspectos prácticos del desarrollo de una disciplina científica. Tal y como está, el libro comprende diez capítulos que, a nuestro entender, tienen una buena cobertura (aunque no exhaustiva) de temas referidos a aspectos tan variados de la ecología funcional como el intercambio gaseoso de CO<sub>2</sub> y agua, cuestiones relativas a la hidráulica de especies leñosas y de relaciones hídricas en general, el diseño experimental relativo al control de la intensidad y

tasa de imposición de la sequía, e instrumental científico específico para la monitorización ambiental y la recolección de datos que existen en general.

Quedan para futuras ediciones tópicos más relacionados con interceptación de radiación y nutrición, además de posibles actualizaciones o técnicas alternativas para medir variables ya cubiertas en esta versión. Para nosotros es un orgullo presentar este libro, y es nuestro deseo que sirva como una herramienta de trabajo e inspiración para todos aquellos profesionales de la investigación interesados en los aspectos más prácticos de la ecofisiología. Deseamos expresar nuestro agradecimiento a todos los autores y revisores de los distintos capítulos, sin cuya valiosa labor este libro no hubiera podido ver la luz. Esperemos que esa luz ilumine la tarea diaria de muchos profesionales de habla hispana, principales destinatarios de este esfuerzo.

**María Elena Fernández y Javier Gyenge**  
**CONICET-INTA EEA Bariloche San Carlos de Bariloche, abril de 2010.**

## PRÓLOGO INVITADO

La ecofisiología vegetal está experimentando un marcado desarrollo en los últimos años en el país, con valiosos aportes a diversas cadenas productivas. El INTA cuenta con un Área Estratégica en esta disciplina que tiene como misión la consolidación, mediante redes, de las capacidades y acciones de investigación ecofisiológica, tanto dentro como fuera de la Institución, que contribuyan a: i) mejorar la producción en cantidad y calidad, ii) producir de manera eficiente y sustentable, iii) asistir al mejoramiento genético vegetal a través de la identificación de rasgos morfo-fisiológicos relevantes y iv) proveer un marco conceptual para el desarrollo de modelos para estudios de los sistemas de producción. Además, el Área Estratégica fijó como objetivo prioritario la tarea de consolidación de grupos referentes en la temática que actúen como nodos de capacitación y formación de recursos humanos en la disciplina para las distintas regiones del país. En el ámbito forestal, la EEA Bariloche de INTA posee un grupo de investigación de referencia con ecofisiólogos formados que desarrollan importantes actividades de investigación en ecofisiología de forestales y acreditan una profusa producción científica de calidad. Dicho equipo de trabajo viene desarrollando también una valiosa tarea de formación de recursos humanos en estrecha interacción con unidades académicas de jerarquía a través de la dirección y asesoramiento de estudiantes de postgrado de distintas localidades del país y el dictado de cursos en la especialidad. Esta obra titulada “Técnicas de medición en ecofisiología vegetal: Conceptos y procedimientos” y editada por los investigadores María Elena Fernández y Javier Gyenge, ambos pertenecientes al grupo de ecofisiología de forestales de la EEA Bariloche, constituye otro claro ejemplo del significativo aporte de dicho equipo de trabajo al Área Estratégica en lo referente a investigación y capacitación de investigadores en la disciplina. Los editores de esta obra han logrado convocar e integrar investigadores de distintas regiones del país que han desarrollado capacidades y habilidades en el manejo de las técnicas relacionadas con la ecofisiología de cultivos. El libro reúne nutrida información sobre técnicas y métodos de utilidad para estudios de ecofisiología vegetal y ecología funcional. Los distintos capítulos de esta obra tratan sobre el diseño de procedimientos y métodos para la imposición de sequía, el uso de colectores de datos y sensores, la medición del flujo de savia mediante el método de disipación de calor, las técnicas de medición de conductancia y conductividad hidráulica y de intercambio de CO<sub>2</sub>, la obtención de las curvas de vulnerabilidad a la cavitación y de presión-volumen para estimación de parámetros hídricos, las curvas de respuesta de la fotosíntesis a la luz y al CO<sub>2</sub>, la medición de fluorescencia modulada de la clorofila y el uso de isótopos estables como marcadores de procesos ecológicos. Por su contenido, la obra trasciende el ámbito forestal y es aplicable a todas las cadenas productivas que involucran la ecofisiología vegetal. Tal como mencionan los editores, el libro se expandirá y actualizará continuamente en futuras ediciones, sumando aportes de distintos investigadores que puedan desarrollar experiencias y conocimientos en técnicas relacionadas con la disciplina. Dada la proyección esperada en el Área Estratégica de INTA en cuanto a consolidación y formación de grupos de investigación en distintas regiones del país, esos futuros aportes estarán garantizados. Los editores expresan el deseo de que este libro sirva como una herramienta de trabajo e inspiración para todos aquellos profesionales de la investigación interesados en aspectos prácticos de la ecofisiología vegetal. Con los grupos de investigación que se están consolidando y dada la gran cantidad de jóvenes que actualmente están capacitándose en la disciplina, este deseo sin dudas se cumplirá. Esta obra va a ser seguramente objeto de consulta recurrente por parte de los numerosos y entusiastas investigadores en la disciplina. Felicitaciones a los editores por la inspiración, la calidad del trabajo y la vocación de servicio, no sólo plasmadas en esta obra, sino también en los cursos de capacitación y en las actividades de dirección y asesoramiento de jóvenes profesionales que vienen desarrollando. Felicitaciones también a todos aquellos que han contribuido para que esta iniciativa se concrete.

**Fernando Andrade Alfredo Cirilo**

*Coordinador AE Ecof Vegetal* *Coordinador PPR AE Ecof. Vegetal*  
**Instituto nacional de Tecnología Agropecuaria-Argentina**

## AGRADECIMIENTOS DE LOS EDITORES

Ambos Editores queremos expresar nuestra gratitud al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de Argentina. Siendo el primer lugar que nos albergó al inicio de nuestras carreras profesionales, sentimos al INTA como nuestra casa. A pesar de las sucesivas crisis económicas y sociales por las que ha atravesado nuestro país en sus últimos años, dicha institución nos brindó la posibilidad física que permitió desarrollarnos profesionalmente, hasta alcanzar los méritos para ingresar a la Carrera del Investigador Científico del CONICET, institución que ha sabido reconocer nuestro esfuerzo (y retribuirlo, más allá de las palabras, pagando nuestro salario).

Como toda estructura, de nada vale sin el corazón de las personas. Por ello, también queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento para nuestro director, Tomás Schlichter, quien con su esfuerzo y dedicación casi paternal, nos guió en esta maravillosa aventura de conocer los mecanismos por los cuales la naturaleza se expresa. Hoy, fruto de la semilla sembrada, la guía oportuna y del esfuerzo compartido con autores y revisores, nace este libro que esperamos, se alce como una herramienta generadora de nuevos aventureros.

### AUTORES (en orden alfabético)

#### **Caballé, Gonzalo**

INTA Estación Experimental Agropecuaria Bariloche CC287, (8400) San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina Correo electrónico: gcaballe@bariloche.inta.gov.ar

#### **Curetti, Mariela**

INTA-Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle Ruta Nacional 22 Km 1190, Allen, Río Negro, Argentina Correo electrónico: mcuretti@correo.inta.gov.ar

#### **Dalla Salda, Guillermina**

INTA-Estación Experimental Agropecuaria Bariloche CC287, (8400) San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina Correo electrónico: gdsalda@bariloche.inta.gov.ar

#### **Fernández, María Elena**

CONICET-INTA Estación Experimental Agropecuaria Bariloche CC287, (8400) San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina Correo electrónico: mefernandez@bariloche.inta.gov.ar

#### **Fernández, Roberto J.**

CONICET-Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Buenos Aires. Av. San Martín 4453 (C1417DSE), ciudad de Buenos Aires,

Argentina Correo electrónico: fernandez@ifeva.edu.ar

#### **Graciano, Corina**

CONICET-Instituto de Fisiología Vegetal, Centro Científico Tecnológico CONICET -Universidad Nacional de La Plata Calle 55 entre 13 y 14 N°910, (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina Correo electrónico: corinagraciano@yahoo.com

#### **Gyenge, Javier Enrique**

CONICET-Estación Experimental Agropecuaria Bariloche CC287, (8400) San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina Correo electrónico: jgyenge@bariloche.inta.gov.ar

#### **Keller, Aldo**

INTA-Estación Experimental Agropecuaria Montecarlo Av. Libertador 2472, (3384) Montecarlo, Misiones, Argentina Correo electrónico: akeller@montecarlo.inta.gov.ar

#### **Licata, Julián**

INTA-Estación Experimental Agropecuaria Concordia CC 34 (3200) Concordia, Entre Ríos, Argentina Correo electrónico: julianlicata@lifetime.oregonstate.edu

**Portela, José A.**

INTA-Estación Experimental Agropecuaria  
La Consulta Ex -ruta 40 km 96, La Consulta.  
(5567), Mendoza, Argentina Correo electrónico:  
jportela@laconsulta.inta.gov.ar

**Tambussi, Eduardo**

CONICET-Instituto de Fisiología Vegetal, Centro Científico Tecnológico CONICET – Universidad Nacional de La Plata Calle 55 entre 13 y 14 N°910, (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina Correo electrónico: tambussi35@yahoo.es

**Tesón, Natalia**

INTA-Estación Experimental Agropecuaria  
Concordia CC 34 (3200) Concordia, Entre Ríos, Argentina Correo electrónico: nteson@correo.inta.gov.ar

**Varela, Santiago**

INTA- Estación Experimental  
Agropecuaria Bariloche  
CC287, (8400) San Carlos de Bariloche,  
Río Negro, Argentina Correo electrónico:  
svarela@bariloche.inta.gov.ar

**REVISORES (en orden alfabético)**

Este libro contó con la colaboración de los siguientes revisores que contribuyeron a mejorar significativamente los contenidos y presentación de los distintos capítulos.

**Andrade, Fernando**

CONICET- INTA EEA Balcarce  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Universidad Nacional de Mar del Plata  
Argentina

**Aranda, Ismael**

Centro de Investigación Forestal  
Instituto Nacional de Investigación y  
Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)  
España

**Bucci, Sandra**

CONICET- Dto.de Biología, Facultad de  
Ciencias Naturales - Sede Comodoro -  
Universidad Nacional de la Patagonia  
"San Juan Bosco"  
Argentina

**Campanello, Paula**

CONICET- Dto. de Ecología y  
Conservación  
Facultad de Ciencias Forestales  
Universidad Nacional de Misiones  
Argentina

**Díaz, Diana**

INTA EEA Concordia  
Argentina

**Faustino, Laura**

CONICET-Instituto de Fisiología Vegetal  
Centro Científico Tecnológico CONICET  
La Plata  
Argentina

**Fernández, Esteban**

Facultad de Agronomía  
Universidad Nacional de Buenos Aires,  
Argentina

**Guarnaschelli, Ana**

Facultad de Agronomía  
Universidad Nacional de Buenos Aires,  
Argentina

**Insausti, Pedro**

Facultad de Agronomía  
Universidad Nacional de Buenos Aires,  
Argentina

**Jobbágy, Esteban**

CONICET-Instituto de Matemática  
Aplicada de San Luis  
Centro Científico Tecnológico CONICET  
San Luis  
Argentina

**Martínez Vilalta, Jordi**

CREAF Unidad de Ecología  
Universitat Autònoma de Barcelona  
España

**Nogués Mestres, Salvador**

Facultad de Biología  
Universitat de Barcelona  
España

**Nosetto, Marcelo**

CONICET- Instituto de Matemática  
Aplicada de San Luis

Centro Científico Tecnológico CONICET  
San Luis  
Argentina

**Ploschuk, Edmundo**

Facultad de Agronomía  
Universidad Nacional de Buenos Aires,  
Argentina

**Rousseaux, Cecilia**

CONICET-Centro de Investigaciones  
Científicas y Transferencia Tecnológica  
de Anillaco, La Rioja  
CONICET, Argentina

**Scholz, Fabián**

CONICET- Dto.de Biología, Facultad de  
Ciencias Naturales - Sede Comodoro -  
Universidad Nacional de la Patagonia  
"San Juan Bosco"  
Argentina

**Stecconi, Marina**

CONICET-Instituto de Investigaciones en  
Biodiversidad y Medioambiente  
Centro Científico Tecnológico CONICET  
Comahue  
Argentina

**Videla, Cecilia**

Facultad de Ciencias Agrarias  
Universidad Nacional de Mar del Plata,  
Argentina

**Villagra, Pablo**

CONICET-Instituto Argentino de  
Nivología, Glaciología y Ciencias  
Ambientales  
Centro Científico Tecnológico CONICET  
Mendoza  
Argentina

**REVISIÓN DE ESTILO Y FORMATO:**

**Marqués, Beatriz**

San Carlos de Bariloche  
E.mail: beatrizmarques@speedy.com.ar

# CAPÍTULO 1

## CONTROL VERSUS REALISMO EN ESTUDIOS ECOFISIOLÓGICOS: *Opciones de Diseño y Procedimientos en Experimentos de Sequía*

**Autor:** Roberto J. Fernández

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, IFEVA-Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

### 1. Introducción

Las preguntas posibles para los estudios ecofisiológicos en plantas abarcan una escala casi tan amplia como la de los niveles de organización biológica (Lambers *et al.*, 2008): van desde las relacionadas con la activación de genes y cambios metabólicos a nivel celular frente al estrés, pasando por el comportamiento de las hojas en respuesta al aumento de la temperatura durante el día, los ajustes fisiológicos estacionales, los cambios anatómicos y morfológicos de individuos genéticamente similares creciendo en sitios con distinta oferta de recursos, hasta las adaptaciones diferenciales de ecotipos y especies como producto de la evolución (por ej. Wright *et al.*, 2004).

Un principio organizador muy útil, relacionado con la escala de la pregunta, es el eje “control vs. realismo” propuesto por Diamond (1986) en el contexto de los experimentos en ecología de comunidades. (Siguiendo a ese autor, usaremos la palabra experimento en sentido amplio, incluyendo todo tipo de observaciones con propósitos de investigación y no sólo ensayos manipulativos.) El planteo es que no existe un tipo de experimento perfecto para todos los objetivos, sino que hay compromisos, determinados básicamente por la escala. En un extremo, están los experimentos “de laboratorio” que aseguran un buen control de los factores causales (por ejemplo, las influencias del largo del día en una cámara de crecimiento), y en el otro los “experimentos naturales” que aseguran el mayor grado posible de realismo (por ejemplo, observaciones en el campo durante una década de lluvias escasas). A medida que nos movemos de estudios del primer tipo hacia los del segundo, au-

menta el grado de autenticidad de las conclusiones (aunque no siempre su generalidad), pero disminuye la posibilidad de contar con repeticiones y testigos (en inglés, controles) apropiados, y lo que es más importante, con niveles precisos del tratamiento que queremos imponer. Como a lo largo de ese *eje control*  $\Rightarrow$  *realismo* la escala espacial y temporal suele ampliarse, a igual grado de esfuerzo también tiende a disminuir el número de variables que pueden estudiarse y la frecuencia de observaciones.

En este capítulo se detallan las consideraciones más generales a tener en cuenta en los estudios ecofisiológicos, destacando los compromisos de diseño (en sentido amplio, no sólo estadístico), y enfatizando las ventajas de una planificación temprana del uso del tiempo, la ayuda técnica y los equipos. Estas sugerencias se ejemplifican luego con mayor detalle para los experimentos de sequía, especialmente aquéllos a escala planta y en macetas.

### 2. Preguntas, diseño y compromisos

#### 2.1. Los objetivos de la investigación

¿Cómo diseñar un experimento ecofisiológico? es una pregunta casi tan amplia como la de cómo hacer investigación en cualquier tema. En ambos casos, la respuesta es la misma: nunca será demasiado el esfuerzo que se ponga en explicitar los objetivos del proyecto. En otras palabras, siempre el énfasis inicial, antes del diseño, debe estar en la delimitación del problema o las preguntas a abordar.

Se da por sentado que la intención es generar resultados potencialmente publicables en una revista científica de buen nivel, aún cuando se trate de investigación financiada con fondos privados que, por motivos empresariales, se decida no publicar. Las pautas estándar de la bibliografía internacional no son una cuestión de moda o una manera de “hacer *curriculum*”; tampoco una manifestación de colonialismo cultural. Son una guía de procedimientos que maximizan la eficiencia de uso de los recursos de investigación, ya sean de origen privado o público, los que ninguna persona responsable querrá malgastar. Una versión muy breve e ilustrativa de esa guía es la dada

por la prestigiosa revista *Nature* para el párrafo-resumen de sus trabajos: “Una o dos oraciones que provean una introducción básica al asunto, redactadas de un modo comprensible para cualquier científico; dos o tres oraciones con antecedentes más detallados, comprensibles para los científicos de las disciplinas más afines; y una oración presentando claramente el problema general considerado por este trabajo en particular.” Nótese que este desarrollo debe ser incluido dentro de las 250 palabras que la revista reserva en total para el resumen, antecediendo a los métodos, resultados y conclusiones, lo que da una clara idea de la importancia que se le debe asignar al planteo del problema y su contexto.

Para dar un ejemplo relacionado con la sequía, la “comparación de respuestas” al estrés (de dos o más especies o genotipos de supuesto distinto grado de tolerancia) no es hoy justificación suficiente para un experimento, menos aún si esa comparación no incluye alguna medida de relevancia directa para el rendimiento forestal o agronómico o la aptitud darwiniana (*fitness* y sus componentes: fecundidad y supervivencia). Puede ser útil tener presente la antipática pregunta de un revisor anónimo: “Les dieron poca agua y las plantas crecieron menos: *so what?*”). Toda la energía que se pueda poner para contestarla *antes* de iniciar el trabajo físico estará bien empleada, y después no habrá análisis, por sofisticado que sea, capaz de extraer del experimento información que éste no haya estado preparado para brindar.

Hay dos aspectos a los que es necesario prestar atención. Uno de ellos es el diseño estadístico, del que nos ocupamos en la sección siguiente, pero el más importante de todos es el otro: la lógica argumentativa del planteo (lo que Plencovich *et al.*, [2008] llaman itinerarios lógicos y metodológicos), y dentro de ella la clara identificación del problema. Ya sea que el objetivo se presente en términos de responder una pregunta o de poner a prueba una hipótesis, resulta imprescindible imaginarse qué resultados deberían formar parte de la mejor respuesta o cuáles determinarían un claro rechazo de la hipótesis. Quizá, el mejor signo de que este paso se ha cumplido exitosamente es el planteo de un esquema o gráfico con las distintas respuestas posibles.

Pocas cosas resultan más dañinas y frustrantes que darse cuenta, después, que lo que *a priori* se consideraba el grupo exhaustivo de respuestas posibles era sólo un subconjunto de ellas (Platt, 1964). El problema no es que esto pueda generar una sorpresa, sino que probablemente deje las preguntas sin contestar y el problema irresuelto.

Una práctica sana y casi siempre educativa (no sólo para los más jóvenes) es la discusión de las publicaciones, propias o de otros grupos, que sirven como antecedentes al trabajo que se piensa llevar adelante —sea éste sólo un experimento o todo un proyecto de investigación. Por otro lado, se debe evitar a toda costa medir algo porque otros lo han hecho o, lo que es peor, simplemente porque se puede: el error de ver todos los problemas como clavos cuando sólo se dispone de un martillo. Esto muchas veces ocurre cuando se cuenta con equipos sofisticados tales como espectrómetros de masa o sistemas de medición de fotosíntesis. La ventaja de estos equipos reside en que nos permiten contestar preguntas que sin ellos no podríamos, pero nuestro trabajo es encontrar (como decía Luis Federico Leloir) cuáles de ellas valen la pena.

A veces, resulta útil plantear la pregunta o hipótesis en términos de dicotomías tales como “tolerancia vs. evitación” del estrés, o clasificaciones del tipo de las “estrategias” o, mejor, “síndromes” ecofisiológicos. Por ejemplo, que una especie tenga mayor sensibilidad estomática al estrés hídrico que otra no nos indica en verdad cuál de las dos es más resistente a la sequía, ya que eso depende del contexto ambiental —la de comportamiento estomático más sensible (y aparentemente menos resistente) puede terminar ahorrando más agua del suelo y prolongando su actividad estacional. En otras palabras, en este ejemplo una especie poco tolerante resultó ser la más resistente por la vía de evitar mejor la sequía. Peters (1991), sin embargo, ha alertado sobre los riesgos del uso acrítico de tales categorías, las que pueden ser útiles como herramientas conceptuales en la medida que se definan en el contexto de hipótesis y predicciones claramente explicitadas *a priori*. De otro modo, se cae en el riesgo de que casi cualquier resultado resulte igualmente aceptable a través de su encasillamiento en las categorías adecuadas, lo que evidentemente no es de ningún modo informativo.

## 2.2. *Compromisos de diseño: estadística y tipos de variable*

Como ya se dijo, para que los resultados de un experimento lleven a conclusiones inequívocas hay que respetar los principios básicos del diseño en términos estadísticos. Lo más importante es que las inferencias que se hagan a partir de los resultados sean válidas, para lo que es indispensable que se prevea a qué tipo de análisis se los someterá. El modelo de análisis, a su vez, requerirá el cumplimiento de una serie de supuestos, el más importante de los cuales es la independencia de los errores en los distintos tratamientos, lo que sólo se asegura con una adecuada aleatorización y réplicas (repeticiones verdaderas). Disponer de muchas plantas dentro de un invernáculo sometido a alta temperatura para compararlas con las de otro a menor temperatura no significa contar con repeticiones sino con submuestras, ya que este esquema no permite distinguir si las posibles diferencias se deben al efecto de la temperatura o a otras causas (por ej. diferencias de iluminación) entre los invernáculos. Un ejemplo análogo de “pseudoréplicas” sería la comparación de individuos de dos especies, cada una de las cuales ocupa en el campo un área separada de la otra; aunque se midan muchos individuos, se estarán confundiendo los efectos de especie con los de sitio.

Una vez decididos los tratamientos que permiten distinguir mejor las distintas predicciones (los que en el caso de experimentos factoriales surgen de las combinaciones posibles entre los “factores” de interés), debe prestarse atención a la conveniencia de trabajar en bloques. Aunque hay variantes más complejas, en general cada bloque agrupa en el espacio o en el tiempo una repetición completa del experimento, de modo que la variabilidad de los factores que no están siendo objeto del estudio sea la menor posible. Otra herramienta metodológica, que puede estar combinada con la de los bloques, es la de las llamadas parcelas divididas. Éstas se usan cuando existe la conveniencia de aplicar un tratamiento en unidades mayores (como la temperatura en los invernáculos del ejemplo del párrafo de más arriba); a éstas se las considera parcelas principales, dentro de las cuales luego se aleatorizan los otros tratamientos en

subparcelas (por ejemplo, los niveles de sequía). Estadísticamente, la mayor ventaja del diseño en parcelas divididas es que confiere una alta potencia estadística (menor probabilidad de error de “tipo II”; por ej. [Toft y Shea, 1983]) al factor asignado a las subparcelas y sus interacciones.

Hay dos compromisos directamente relacionados con la necesidad de contar con repeticiones. Ambos derivan de las limitaciones impuestas por los recursos disponibles, y por lo tanto del esfuerzo y tiempo necesarios para hacer las observaciones. Por un lado, existe competencia entre el número de repeticiones y el número de tratamientos: a igualdad de medios y esfuerzo, cada pregunta o tratamiento adicional impacta sobre las repeticiones posibles. Debe evaluarse, entonces, aún si se trata de una pregunta que vale efectivamente la pena, el riesgo de no poder contestarla (y de no contestar tampoco la pregunta central del estudio) por falta de potencia estadística. Por otro lado, hay un compromiso entre el número de repeticiones (y tratamientos) y el número de variables que pueden incluirse en el experimento.

Cabe aquí hacer una distinción importante entre dos grupos de variables usadas para evaluar las respuestas de las plantas, a las que llamaremos estructurales vs. funcionales. Ejemplos de las primeras son biomasa aérea de las plantas, área foliar o longitud de raíces (en todos los casos, expresadas por individuo o por unidad de área del suelo). Generalmente, se las considera “destructivas”, porque su determinación requiere la toma de muestras físicas de las plantas. Aún cuando algunas se puedan determinar no destructivamente (por ej., el área de cada hoja a través de su largo y ancho), de todos modos primero requieren un doble muestreo, que incluye la toma de muestras en algunos órganos o individuos, para establecer las relaciones de interés (ecuaciones de regresión y su grado de ajuste). Lo que no es tan obvio para estas variables estructurales, y sin embargo es crucial desde el punto de vista de la planificación del experimento, es que la mayoría permite, con las precauciones del caso, un almacenamiento de las muestras (ya sea secas, bajo frío o con líquidos conservantes).

La importancia de esto reside en que el tiempo de procesamiento para la obtención de los datos finales, que generalmente es mucho

mayor que el que lleva la toma de muestras, no necesariamente debe presupuestarse dentro del lapso del experimento en sí. En otras palabras, es como si se tratase de datos de obtención “postergable”. En esto, las variables estructurales se diferencian de las funcionales, que son más “percederas” y pueden ser de obtención más lenta. Algunas variables funcionales estándar a escala de planta son el intercambio de gases (agua, dióxido de carbono) en las hojas y el potencial hídrico ( $\psi_w$ ) en distintos puntos del *continuum* suelo-planta. Algunos avances técnicos, en particular la existencia de aparatos de registro de datos, han permitido reducir el tiempo de obtención de ciertas variables funcionales, pero para las variables funcionales de obtención más lenta queda particularmente clara la relación entre las posibilidades experimentales y los recursos, especialmente la disponibilidad de instrumental y el personal con experiencia técnica.

Hay otra categoría de variables que, si bien puede abarcar en principio tanto a las estructurales como a las funcionales, tienen otro propósito. No se trata de datos recolectados con el objetivo de evaluar el efecto de los tratamientos sobre las plantas, sino con el de evaluar la magnitud misma de los tratamientos. Por ejemplo, si éstos son de estrés, son las variables que documentan el grado de estrés; a éstas podemos llamarlas variables de *documentación* (en este caso, de la sequía). Los datos más simples de este tipo caracterizan directamente al ambiente; por ejemplo, la diferencia de precipitación o déficit de presión de vapor entre dos localidades, o la diferencia en potencial hídrico del suelo a determinada profundidad entre dos tratamientos. Para estos registros, se cuenta con la invaluable ayuda de los sensores ambientales compatibles con registradores automáticos (ver capítulo 2).

### **Experimentos de sequía: del plan general al detalle**

En esta segunda parte del capítulo ilustraremos los compromisos planteados usando como ejemplo los experimentos de sequía. Se seguirá la secuencia presentada en la figura 1, focalizándonos en los estudios a escala planta y brindando re-

comendaciones particulares para experimentos en maceta.

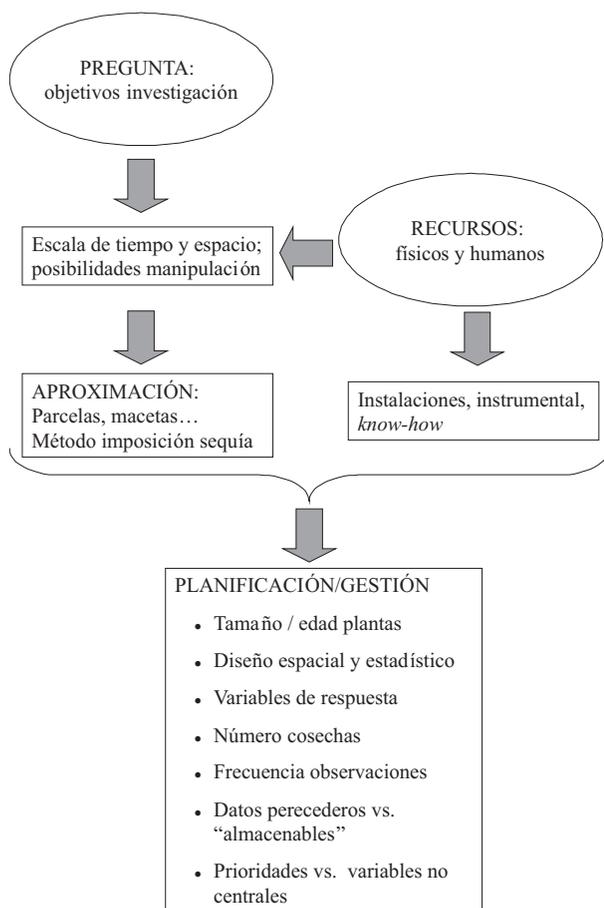
### *3.1. Tipos de experimentos*

Las opciones generales disponibles para estudios de sequía ordenadas, según el compromiso planteado en la Introducción, de mayor a menor realismo (y por lo tanto de menor a mayor control), son:

- Sitios con distinta precipitación, o con diferente balance hídrico por tener suelos de distinta textura o profundidad;
- Ciclo natural de sequía en el campo (por ej. fase húmeda vs. seca de un ciclo Niño/Niña);
- Parcelas experimentales regadas vs. no regadas;
- Exclusión total de lluvia por cubierta permanente o estacional (ver, por ej. Reynolds *et al.*, 1999);
- Exclusión parcial de lluvia por cubiertas que evitan la llegada de una proporción del agua al suelo (Yahdjian y Sala, 2002; Nepstad *et al.*, 2007);
- Exclusión de lluvia por cubierta corrediza, ya sea manual o automática (*rainout shelters*, por ej., English *et al.*, 2005).
- Invernadero con mayor o menor grado de control ambiental (en un extremo, equivalente a exclusión de lluvia por cubierta permanente, y en el otro a cámaras de crecimiento con iluminación natural);
- Cámaras de crecimiento con iluminación artificial;
- Medios de cultivo hidropónicos o soluciones de riego con distintos potenciales.

Los tres últimos tipos de manipulación están asociados casi siempre con trabajo en macetas (término usado aquí para todo tipo de recipiente), y los tres primeros casi siempre con trabajo en parcelas, pero esto no es para nada rígido y, de hecho, ni siquiera estas categorías deberían verse como totalmente excluyentes entre sí. Por ejemplo, uno podría regar parcelas con soluciones de distinto potencial hídrico, o hacer experimentos de riego a lo largo de un gradiente natural de precipitación e incluir en la comparación parcelas cercanas no regadas. Las cámaras de crecimiento suelen albergar plantas aisladas, pero también se usan para experimentos de comunidades en “microcos-

mos”. Los trasplantes recíprocos diseñados para mejorar la evaluación de los efectos genotípicos vs. los efectos ambientales o de sitio son otro ejemplo de la combinación de más de una de estas aproximaciones (por ej. Quiroga *et al.*, 2010). A los métodos en los que se agrega agua se los ha llamado de manipulación “activa”, en oposición a los “pasivos”, en los que se evita la llegada de agua (Hanson, 2000), pero en la práctica pueden combinarse, por ejemplo manteniendo plantas bajo una cubierta en la que se imponen distintos tratamientos, incluyendo el agregado de agua (ver, por ejemplo, Trillo y Fernández (2005), Yahdjian y Sala (2006).



**Figura 1:** Resumen de las consideraciones generales de diseño, ejemplificadas en el texto para el caso de experimentos de sequía.

### 3.2. Control de la disponibilidad de agua

Una vez decidida la aproximación o tipo de experimento, la pregunta siguiente es cómo se controlará

la cantidad y disponibilidad de agua (figura 1). Una primera decisión suele ser si los distintos tratamientos se basarán en diferentes frecuencias o en diferentes volúmenes de riego. Está claro que no es lo mismo duplicar la precipitación natural de un sitio duplicando el volumen de agua caído en cada lluvia que reduciendo a la mitad los intervalos promedios entre lluvias (por ej. Heisler *et al.*, 2008). Desde el punto de vista puramente físico, la profundidad a la que el agua llega en cada caso será diferente (ver más abajo), y por lo tanto el desarrollo de raíces probablemente también. Dentro de los métodos que controlan la frecuencia de riego, a su vez, uno debe decidir si mantendrá esas frecuencias fijas (por ej. semanal vs. quincenal), o si el momento del riego estará determinado por cierto umbral de disponibilidad de agua. Ésta puede ser evaluada por el agua en el suelo (porej. ver Trillo y Fernández, 2005) o, tomando ciertas precauciones, a través de alguna medida tomada en las plantas, como por ejemplo el potencial hídrico de las hojas al mediodía (esto último se desarrolla más abajo).

Dentro de los métodos que controlan el volumen de riego, algunos mantienen los volúmenes constantes dentro de cada tratamiento y otros aplican distintas proporciones de la demanda (estimada meteorológicamente o a través del consumo del tratamiento testigo). Cuando con los riegos se rehidrata toda la maceta, suele decirse que se regó hasta capacidad de campo, lo que es casi una tautología: por métodos normales no se puede regar un suelo a medias. Uno inevitablemente repone agua hasta capacidad de campo; lo que varía con el volumen de agua agregado es hasta qué profundidad alcanzará el agua a ser repuesta (ver caja 1).

Algunos métodos que podrían considerarse más artificiales (y con mayor grado de control, *sensu* Diamond 1986) reemplazan el agua de riego o la solución hidropónica por sustancias osmóticamente activas del tipo del polietilenglicol (PEG), o la suministran a través de dispositivos que de algún modo modifican su disponibilidad. Kramer y Boyer (1995) discuten la historia de los métodos que han intentado mantener la disponibilidad del agua del suelo constante; los que han tenido mayor grado de éxito en general sólo son útiles para volúmenes de suelo pequeños. Un método de este tipo es el de subirrigación propuesto por Snowy Tingey (1985),

que ha mostrado ser capaz de suministrar agua a potencial constante independizándose de la tasa de consumo y, en cierto grado, también del volumen de la maceta (ver figura 2 y Fernández y Reynolds, 2000). Otro grupo de métodos aplica el agua sólo a una parte del volumen del sistema radical, por ejemplo mediante jeringas o dividiéndolo entre macetas diferentes; la técnica de Bertiller *et al.*, (1996) lo logra mediante el auxilio de bandas de celulosa que, a modo de mechas, transportan el agua hacia sólo una parte del sistema radical.

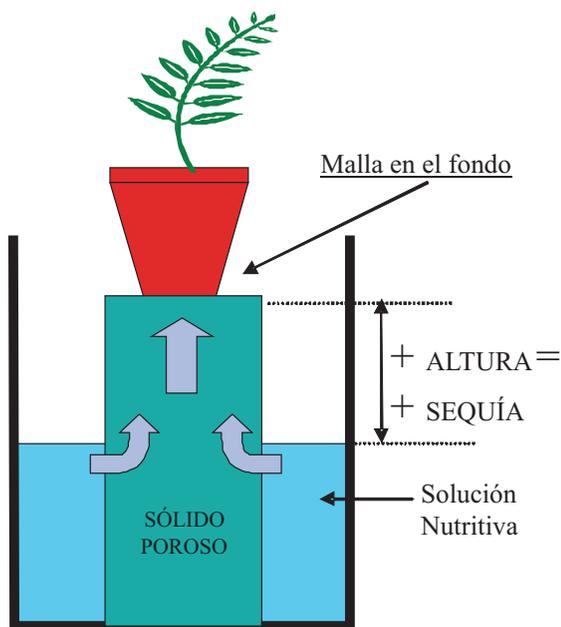
Por último, y como ejemplo de un método muy elegante y hasta cierto punto extremo, se puede citar la técnica de centrifugado (ver capítulo 5). Se trata de someter órganos aislados (típicamente secciones de tallos o raíces leñosos) a una alta velocidad de rotación. Así, centrando el tejido en un rotor diseñado al efecto, se puede lograr un preciso control del nivel de estrés a través de la frecuencia de rotación, que puede alcanzar varios miles de revoluciones por minuto (obviamente, una situación alejadísima de todo realismo). Estos segmentos

luego pueden ser sometidos a distintos tipos de mediciones, tales como evaluación de potencial hídrico (por ej. para validar la técnica de medición; Holbrook *et al.*, 1995) o de pérdida de conductividad hidráulica, repitiendo las mediciones sobre el mismo tallo para la construcción de curvas de vulnerabilidad (Pockman *et al.*, 1995)), e incluso más de una vez para evaluación de la posible "fatiga" (Hacke *et al.*, 2001).

### 3.3. Variables, cosechas y duración

En el resto de este libro se desarrollan en detalle algunos de los métodos más sofisticados usados en ecofisiología vegetal. En esta sección se describen algunas variables que, aunque pueden ser evaluadas sin necesidad de instrumental costoso, no por ello resultan menos importantes que aquéllas y muchas veces proveen una referencia necesaria para interpretarlas. Como se destacó más arriba, lo más importante al decidir las variables de respuesta principales del experimento es ver que se ajusten a la pregunta planteada, ya que de ese modo podrán establecerse con claridad las prioridades. Por ejemplo, si se intenta evaluar la respuesta en la producción de biomasa de varias especies forrajeras frente a diferentes ofertas de agua, un estudio detallado de la conductancia estomática y sus controles (aunque pueda contribuir a explicar la respuesta final) difícilmente sea útil, y sí en cambio lo sería una descripción de la producción estacional de macollos y su crecimiento y demografía. Con la misma pregunta y menos recursos, datos de biomasa/m<sup>2</sup> en el pico de la estación de crecimiento serán probablemente suficientes para una primera evaluación.

Para preguntas a escala planta, algunas de las variables estructurales más comunes y útiles son la biomasa total (aérea más subterránea), ya sea final o en distintos momentos ("cosechas"), la partición de la biomasa en esas dos fracciones (por ej., relación vástago/raíz) y otras (por ej., entre hojas y tallos), el área foliar y el área o longitud de raíces. Con algo más de detalle, podríamos estar interesados en la relación entre el área de las hojas y su peso seco (área foliar específica= SLA), entre la longitud de las raíces y su peso (longitud radical específica= SRL), las propiedades



**Figura 2:** Sistema de subirrigación, basado en Snow y Tingey (1985). La distancia entre la base de la maceta y el nivel de agua determina los tratamientos: un testigo típico corresponde a 1-5 cm; sequía moderada unos 10-15 cm y sequía fuerte alrededor de 20-25 cm. *Diagrama gentileza de Pablo Maseda.*

anatómicas (por ej. proporción de área ocupada por vasos xilemáticos y su diámetro individual) y la composición química de los tejidos (nitrógeno total, carbohidratos solubles, contenido de taninos o lignina). Una lista de variables de respuesta funcionales estándar a la escala de parcela y planta incluye: flujo de savia, consumo de agua por balance hídrico (incluyendo la evaluación del cambio de peso de las macetas), intercambio de gases (agua, dióxido de carbono) en las hojas y a través de la superficie del suelo, y potencial hídrico en distintos puntos del continuum suelo-planta (usando bomba de Scholander o psicrómetros).

Para documentar la sequía suelen registrarse variables micrometeorológicas. A veces, pueden usarse datos de las plantas mismas, tales como producción de biomasa o de semillas (por ej., porcentaje de reducción con respecto al testigo en el promedio de las especies estudiadas), pero el uso de variables más funcionales entraña algunos riesgos. Aún existiendo un efecto de la sequía, el potencial hídrico diurno mínimo puede no diferir entre tratamientos o especies si se trata de plantas con fuerte control estomático (isohídricas; ver Tardieu y Simmoneau, 1998), las que por otro lado sí manifestarán claras diferencias en conductancia estomática. Lo contrario sucederá en plantas anisohídricas, por lo que no conviene confiar en una sola de estas medidas salvo que exista buena información previa. En relación al agua y otros recursos del suelo, se debe tener clara la distinción entre *efectos* y *respuestas* sobre la que ha alertado Goldberg (1990): su disponibilidad determina las respuestas de las plantas, pero a su vez está influenciada por el efecto de su consumo.

Luego de decidida la pregunta, la escala del estudio y los tratamientos necesarios, hay un punto de la planificación que impacta en varias cuestiones de diseño y es el de la duración del experimento. Por ejemplo, al analizar las repeticiones deseables y posibles para cada variable, debe decidirse cuántas cosechas se harán para las variables destructivas: si cada fecha se analizará independientemente, el número de repeticiones efectivas deberá multiplicarse por el número de cosechas. (En los estudios llamados de "análisis de crecimiento", en cambio, se usan ecuaciones de regresión que resumen el cambio de las variables a lo largo del tiempo; Hunt,

1982). Además, debe tenerse en cuenta que hay un compromiso entre la duración del experimento y la intensidad de la sequía aplicada: si fuese demasiado intensa podría debilitar o hasta matar las plantas, pero si fuese demasiado suave podría tomar demasiado tiempo en expresarse. También, en general, cuanto más largo sea el experimento, mayores dificultades habrá por el excesivo crecimiento de los testigos. En relación con esto, un factor poco tenido en cuenta es el de los cambios de forma o alométricos, es decir en las dimensiones relativas de los distintos órganos (por ej. vástago vs. sistema radical). Como la forma cambia en función del tamaño de los individuos, y la aplicación de estrés modifica la velocidad de crecimiento, es importante no confundir los efectos del tamaño con los del estrés (Maseda y Fernández, 2006). Esto puede hacerse a través del descuento de los efectos alométricos como una covariable (por ej. Gebauer *et al.*, 1996), o a través del análisis de sus cambios en función del tamaño y no del tiempo (por ej. Fernández *et al.*, 2002).

Si bien poco comunes, no debería dejarse de lado la posibilidad de experimentos que evalúen los efectos poblacionales de la sequía (y otros factores del ambiente abiótico). Si además de fecundidad se planea evaluar supervivencia, la intensidad del estrés y el número de repeticiones deberán exceder los normalmente considerados para experimentos ecofisiológicos.

#### 3.4. Macetas: sustrato, volumen y consumo de agua

Para los experimentos en maceta, una decisión muy importante es la del volumen del recipiente y el tipo de sustrato (Passioura, 2006). En cuanto a esto último, hay dos puntos a tener en cuenta. El primero es que se debe favorecer un buen drenaje, por lo que además de prever orificios de salida del posible exceso de agua, en la mayoría de los casos conviene usar una textura algo más gruesa que aquella en la que crecen las plantas en el campo. Esto puede hacerse mezclando buena tierra de jardín (o del sitio original de recolección) con una parte equivalente de arena ("1:1"; o 1:2 ó 2:1). El otro punto es que cuanto más heterogénea sea la composición de partículas del sustrato mayor será su capacidad

de retención hídrica (texturas “francas”); en otras palabras, si se usase tierra pasada a través de un tamiz fino y uniforme se estaría asegurando que toda el agua esté disponible a prácticamente el mismo potencial hídrico, y por lo tanto sólo durante un lapso demasiado breve (ver Fernández y Trillo, 2005). El agregado de materia orgánica suficientemente descompuesta (por ej. “resaca”) suele contribuir positivamente tanto a un mejor drenaje (en texturas finas) como a una mayor capacidad de retención hídrica (en texturas gruesas). Para esto último, a veces se agrega algún elemento inerte del tipo de la vermiculita.

El volumen de la maceta a usar depende de varias cuestiones. Por un lado, cuanto más grandes sean, a igualdad de duración del experimento menores serán los problemas desde el punto de vista del buen desarrollo del sistema radical. En inglés, las plantas cuyo crecimiento está limitado por el espacio reciben un nombre particular: pot bound; Passioura (2002), en términos más familiares, se refiere al “efecto bonsai”. Un test general de la existencia de limitaciones al crecimiento, por volumen de maceta u otros factores, es la desviación de la relación  $\log(\text{biomasa})$  vs. tiempo con respecto a una recta. Por otra parte, un menor tamaño ahorra espacio y cuando éste sea limitante, como por ejemplo en un invernáculo o cámara, puede permitir un mayor número de repeticiones. Desde otro punto de vista, debe tenerse en cuenta que, para un sustrato dado, el volumen de la maceta determina el volumen de agua disponible. Así, las macetas chicas pueden hacer que la sequía se desarrolle demasiado rápidamente (de un modo que no ocurre en la naturaleza y por lo tanto impide la aclimatación), y las macetas demasiado grandes en relación al tamaño de las plantas pueden demorar y hasta evitar la aparición de la sequía. Estos extremos pueden evitarse haciendo un ensayo piloto (en el que se combinen distintos volúmenes de maceta, frecuencias o volúmenes de riego, etc.), estudiando los antecedentes bibliográficos con especies similares, o a través del cálculo previo del consumo esperable.

Para plantas creciendo en una parcela al aire libre, el consumo de agua máximo posible (con área foliar bien desarrollada y suelo sin restricciones) es cercano a la demanda atmosférica. Como

dato orientativo, en verano ésta puede ser de 1 a 5 milímetros por día, lo que equivale a 0.001-0.005  $\text{m}^3/\text{m}^2$ , 1-5  $\text{litros}/\text{m}^2$ , y 10-50  $\text{m}^3/\text{ha}$ . Para plantas creciendo en macetas, la relación área foliar/área de suelo puede ser mayor que en el campo, y la lámina puede no ser una buena referencia (e incorrecta en recipientes de caras laterales no verticales). En estos casos, habría dos aproximaciones útiles para una estimación preliminar de las necesidades de agua: una a través de la estimación del área foliar, y otra a través de la estimación del crecimiento. En el primer caso, puede preverse un consumo máximo de alrededor de 10-20  $\text{g dm}^{-2} \text{ día}^{-1}$  en el segundo, de unos 300 a 1.000  $\text{g}$  de agua por gramo de materia seca producida. A partir de estos datos y el almacenaje esperable por volumen de suelo (ver caja 1) podrá decidirse el volumen de maceta más adecuado a los objetivos del experimento.

Dos precauciones relativas al agua de riego. Un análisis previo propiedades físicoquímicas nunca está de más: aún el agua de red perfectamente apta para el consumo humano puede tener propiedades (por ej. pH) inadecuadas para las plantas. También debe prestarse atención a su temperatura: ambos extremos pueden causar estrés; el agua de pozo puede estar demasiado fría para su aplicación directa.

### 3.5. Planificación y gestión del experimento

Una vez decidido el diseño, incluyendo el modo de aleatorización y arreglo espacial de las unidades experimentales, es menester hacer una buena planificación, incluyendo cierto margen para imprevistos. Un cómputo del tiempo que llevará cada tarea (un “presupuesto” de tiempo), aunque sea aproximado, puede llevar a revisar los objetivos iniciales, muchas veces planteados más en función de los deseos que las posibilidades reales de ayuda técnica y equipos. Como ya se planteó en la sección sobre diseño, la inclusión de una variable independiente nueva (un factor causal más) en un experimento factorial especie x sequía (por ejemplo, dos niveles de nitrógeno) conlleva el costo de duplicar el tamaño del experimento. Si la pregunta referida a ese factor (por ej. nitrógeno) o a su interacción con la sequía es la más importante del proyecto,

entonces habrá que considerar trabajar con menos factores o menos niveles de los demás factores (por ej. menos especies o menos grados de sequía).

Además de los factores causales, en este momento deberán decidirse las variables de respuesta, las que como ya se dijo pueden dividirse a los efectos prácticos en estructurales (muchas veces destructivas y hasta cierto punto almacenables), y funcionales. Para éstas, el tiempo que lleva cada medición y el casi siempre inevitable cambio en las condiciones ambientales a lo largo de las mediciones son muchas veces factores condicionantes del número de repeticiones posibles cada día. Por lo tanto, se deberá evaluar hasta qué punto es deseable o permisible extender las mediciones en bloques temporales (ver sección Compromisos de diseño). Para las mediciones estructurales, el presupuesto de tiempo puede ayudar a prever los momentos críticos (por ej. trasplante, cosecha final), para los que, agendada con suficiente antelación, quizá pueda conseguirse ayuda extra. Por último, debe preverse el uso de equipos y personal para el registro de las variables que documentarán la duración e intensidad de la sequía, incluyendo si fuese necesario repeticiones extra para hacerlo (por ej. medidas destructivas de agua en el suelo o potencial hídrico en las plantas).

Si el experimento es suficientemente grande o complejo, para cada tarea o variable podrán asignarse responsables, cada uno de los cuales debería estar al tanto de los objetivos generales del experimento, y por lo tanto con cuáles son las variables de mayor importancia para el análisis final y cuáles las accesorias. En cualquier tipo y tamaño de experimento, los momentos de cosecha requieren una organización de ese tipo. De otro modo, no sería raro, por ejemplo, que las submuestras de hojas tomadas para determinar su área foliar específica terminen sin rotular y se pierda no sólo esa variable sino también la contribución de esas partes a la biomasa foliar total.

#### 4. Conclusión

Este capítulo brinda una orientación general sobre el diseño, la organización y ejecución de experimentos en ecofisiología vegetal, sobre todo aquellos a escala de parcela e individuo. El

énfasis se ha puesto en destacar los “compromisos”, el más importante de los cuales es el que se da entre el grado de control de las variables bajo estudio y el realismo y relevancia de los datos obtenidos. Otros compromisos de diseño son aquellos entre el número de tratamientos y el número de repeticiones (que determinan el número total de unidades experimentales a evaluar) y, quizá menos obviamente, entre el número de unidades experimentales y el número y tipo de variables a evaluar. Dentro de éstas, se hace una distinción entre aquellas de más o menos rápida evaluación durante el experimento (por ej., cosechas de biomasa aérea que luego será procesada en el laboratorio con más tiempo) y aquellas más restrictivas por su determinación necesariamente más lenta (como por ejemplo muchas mediciones fisiológicas). Para el caso particular de los experimentos a escala planta que evalúan la respuesta al estrés hídrico, se destaca el compromiso entre la duración del experimento y la intensidad de la sequía, y las interacciones entre estos dos factores y el volumen de las macetas.

Se subraya la importancia de tener claras desde un principio cuáles son las preguntas que se quieren investigar. Sólo así se podrá decidir qué aspectos de ellas son factibles de ser respondidas en el marco de las restricciones impuestas por los recursos materiales y humanos disponibles (figura 1). También se explica cómo las preguntas y objetivos de la investigación, al determinar el nivel de organización (≈escala espacial, por ejemplo hoja vs. planta entera) y de ese modo la escala de tiempo, en gran medida definen las posibilidades de manipulación y restringen las opciones metodológicas. Ya que en la bibliografía no parece haber ninguna guía de este tipo, se dan suficientes detalles como para servir de recurso a quienes se inician en el tema, proponiendo un esquema de organización del trabajo que, siendo flexible, permite orientar sobre la marcha las decisiones frente a imprevistos de modo de no perder de vista los objetivos centrales. De ese modo, se plantea que con algo de organización y previsión, podrán obtenerse mejores datos a igualdad de esfuerzo.

**Agradecimientos:** Gran parte de las ideas y procedimientos presentados surgieron de las dis-

usiones relacionadas con el trabajo de Pablo Maseda, Nicolás Trillo, Luciana Couso y Esteban Fernández, financiado por la UBA, el CONICET, la

ANPCyT, y el IAI. El capítulo se enriqueció con los aportes y comentarios de Pablo Villagra y Esteban Jobbágy.

### Caja 1: Medidas de contenido de agua en el suelo

La cantidad de agua contenida en el suelo se puede expresar de varias formas, pero las más comunes son tres: como fracción del volumen de suelo (contenido volumétrico), como fracción del peso de suelo (contenido gravimétrico), o como lámina (volumen por unidad de área de suelo). El contenido volumétrico es la relación entre el volumen de agua y el volumen de suelo que la contiene, y puede expresarse en porcentaje o como fracción (en "tanto por uno"); en este último caso, suele simbolizarse con la letra griega  $\theta$ . Las mediciones de algunos instrumentos, tal como la sonda de neutrones y los que operan por el principio de TDR o similares (por ej. FDR), se correlacionan directamente con  $\theta$ . En otros casos, el dato se obtiene multiplicando el contenido gravimétrico por la densidad aparente del suelo (1,1 a 1,5 g cm<sup>-3</sup>).

El contenido gravimétrico es el más fácil de obtener, ya que no requiere ningún instrumental especial en el campo, y en el laboratorio sólo una balanza y una estufa de secado (reemplazable por cualquier superficie suficientemente caliente). Se determina luego de pesar las muestras de suelo húmedo y compararlas con las del suelo seco (típicamente, secado durante 24-48 h a 105°C). El contenido se expresa como gramos de agua cada 100 g de suelo seco. Para ser obtenido a partir de  $\theta$ , ésta debe ser dividida por la densidad aparente (suponiendo 1,2-1,3 g cm<sup>-3</sup> si no se dispone de otro dato).

La tercera forma de expresión tiene unidades de distancia, ya que representa el volumen de agua por unidad de área de suelo (por ej. m<sup>3</sup> m<sup>-2</sup>, ó m). Esta expresión brinda la lámina equivalente de agua almacenada, y es independiente del área considerada. Quizá el modo más simple de visualizar su significado sea pensar en un suelo imaginario sin sólidos, en el que por lo tanto por metro de profundidad podría almacenarse un metro de agua (=1.000 mm). Los suelos reales tienen aproximadamente la mitad de su volumen ocupado por sólidos y la otra mitad por poros.

Por lo tanto, cuando éstos están completamente ocupados por agua (por ej. suelo saturado), la lámina almacenada es de ca. 500 mm por metro de perfil, y en todas las demás situaciones se almacenan láminas menores. Una ventaja de esta forma de expresión es que los mm almacenados por distintos estratos son directamente aditivos. La conversión a  $\theta$  se efectúa dividiendo la lámina por la profundidad en la que está contenida; por ejemplo, 20 mm almacenados en 20 cm de perfil equivalen a  $\theta = 0,1$ , o sea 10% de humedad volumétrica promedio.

Al agregar agua a un suelo, éste inicialmente se satura pero luego de 1-2 días el exceso percola en profundidad y se llega a un valor aproximadamente en equilibrio con la gravedad llamado "capacidad de campo" (CC). Éste equivale a un contenido hídrico volumétrico de 5 a 7% en suelos arenosos, 20-30% en suelos francos, y hasta 40% en los arcillosos. Por lo tanto, si se encontrasen inicialmente secos, para mojarlos totalmente hasta un metro de profundidad harían falta unos 60, 250, y 400 mm (ó litros/m<sup>2</sup>), respectivamente. Estos volúmenes, sin embargo, no pueden ser aprovechados en igual proporción por las plantas, por lo que se debe descontar en cada caso el agua residual o en el "punto de marchitez permanente" (PMP), que es de aproximadamente 0,5-2, 10-15 y 25% (o unos 10, 120 y 250 mm/metro). La llamada "agua útil", o diferencia entre CC y PMP, es una estimación del consumo máximo que tendrían las plantas si no se volviese a regar; ésta es máxima en texturas medias a finas.

## 5. Bibliografía

- Bertiller MB, P Zaixso, MP Irisarri y ER Brevedan (1996) The establishment of *Festuca pallescens* in arid grasslands in Patagonia (Argentina): the effect of soil water stress. *Journal of Arid Environ.* 32: 161-171.
- Diamond, J (1986) Overview: laboratory experiments, field experiments, and natural experiments. *En: Community Ecology.* Diamond J, TJ Case (Ed.), Harper y Row. pp. 3-22.
- English NB, JF Weltzin, A Fravolini, L Thomas y DG Williams (2005) The influence of soil texture and vegetation on soil moisture under rainout shelters in a semi-desert grassland. *Journal of Arid Environ.* 63:324-343.
- Fernández, RJ y J F Reynolds (2000) Potential growth and drought tolerance of eight desert grasses: Lack of a trade-off? *Oecologia.* 123: 90-98.
- Fernández, RJ y N Trillo (2005) La textura del suelo como fuente de heterogeneidad; sus efectos sobre la oferta de agua para las plantas. *En: La heterogeneidad de la vegetación de los agroecosistemas.* Editorial Fac. M. Oesterheld, MR. Aguiar, CM Ghersa y JM Paruelo (Eds.) Agronomía Univ. Buenos Aires. pp. 171-192.
- Fernández, RJ, M Wang y JF Reynolds (2002) Do morphological changes mediate plant responses to water stress? A steady-state experiment with two C4 grasses. *New Phytol.* 155: 79-88.
- Gebauer, RLE, JF Reynolds y BR Strain (1996) Allometric relations and growth in *Pinus taeda*: the effect of elevated CO<sub>2</sub> and changing N availability. *New Phytol.* 134: 85-93.
- Goldberg, D (1990) Components of resource competition in plant communities. *En: Perspectives on Plant Competition.* JB Grace y D Tilman (Ed.) Academic Press, San Diego. pp. 27-49
- Hacke, UG, V Stiller, JS Sperry, J Pittermann y KA McCulloh (2001) Cavitation Fatigue. Embolism y Refilling Cycles Can Weaken the Cavitation Resistance of Xylem. *Plant Physiol.* 125: 779-786
- Hanson, PJ (2000) Large scale water manipulations. Cap. 23 *En: Methods in Ecosystem Science.* O. E. Sala, R B Jackson, H A Mooney y R W. Howarth (Ed.). Springer Verlag, New York. pp. 341-352.
- Heisler JL, AK Knapp y EF Kelly (2008) Increasing precipitation event size increases aboveground net primary productivity in a semi-arid grassland. *Oecologia.* 158: 129-140.
- Holbrook, NM, M J Burns y C B Field (1995) Negative xylem pressures in plants: A test of the balancing pressure technique. *Science.* 270: 1193-1194.
- Hunt R (1982) Plant growth curves: the functional approach to growth analysis. London, UK: Edward Arnold. pp. 256
- Kramer PJ y JA Boyer (1995) Water relations of plants and soils. San Diego: Academic Press. pp. 495.
- Lambers H, FS Chapin y TL Pons (2008) Plant physiological ecology, 2nd ed. New York: Springer Verlag. pp. 604.
- Maseda, PH y RJ Fernández (2006) Stay wet or else: Three ways in which plants can adjust hydraulically to their environment. *Journal of Experimental Botany.* 57: 3963-3977.
- Nepstad DC, IM Tohver, D Ray, P Moutinho y G Cardinot (2007) Mortality of large trees and lianas following experimental drought in an Amazon forest. *Ecology.* 88: 2259-2269.
- Passioura, JB (2002) Soil conditions and plant growth. *Plant, Cell and Environ.* 25: 311-318.
- Passioura, JB (2006) The perils of pot experiments. *Functional Plant Biol.* 33: 1075-1079.
- Peters, RH (1991) A critique for Ecology. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 352.
- Platt, JR (1964) Strong Inference: Certain systematic methods of scientific thinking may produce much more rapid progress than others. *Science.* 146(3642): 347-353.
- Plencovich MC, A Bocchicchio, A Ayala Torales, R Golluscio, G Jaurena y M Aguiar (2008) Cómo formular trabajos científicos en las ciencias agropecuarias. Editorial Hemisferio Sur. pp. 352.
- Pockman WT, JS Sperry y JW O'Leary (1995) Sustained and significant negative water pressure in xylem. *Nature.* 378: 715-716.
- Quiroga RE, RA Golluscio, L Blanco y RJ Fernández (2010) Aridity and grazing as convergent selective forces: an experiment with an Arid Chaco bunchgrass. En prensa en *Ecological Applications*, DOI: 10.1890/09-0641.
- Reynolds, JF, RA Virginia, PR Kemp, AG De Soyza, y DC Tremmel, (1999) Impact of drought on desert shrubs: Effects of seasonality and degree of resource island development. *Ecological Monog.* 69: 69-106.
- Snow MD y DT Tingey (1985) Evaluation of a system for the imposition of plant water stress. *Plant Physiol.* 77: 602-607.
- Tardieu F y T Simonneau (1998) Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany.* 49: 419-432.
- Toft CA y PJ Shea (1983) Detecting

- Community-Wide Patterns: Estimating Power Strengthens Statistical Inference. *The American Naturalist*. 122: 618-625.
- Trillo, N y RJ Fernández (2005) Wheat plant hydraulic properties under prolonged experimental drought: Stronger decline in root-system conductance than in leaf area. *Plant and Soil*: 277: 277-284.
- Wright IJ, PB Reich, M Westoby, DD Ackerly, Z Baruch, FBongers, JCavender-Bares, FSChapin, JHC Cornelissen, M Diemer, J Flexas, E Garnier, PK Groom, J Gulias, K Hikosaka, BB Lamont, T Lee, W Lee, C Lusk, JJ Midgley, M-L Navas, U Niinemets, J Oleksyn, N Osada, H Poorter, P Poot, L Prior, VI Pyankov, C Roumet, SC Thomas, MG Tjoelker, EJ Veneklaas y R Villar (2004). The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*: 428: 821-827.
- Yahdjian, L y O E Sala (2002) A rainout shelter design for intercepting different amounts of rainfall. *Oecologia*.133:95-101.
- Yahdjian, L y OE Sala (2006) Vegetation structure constrains primary production response to increased water availability in the Patagonian steppe of Argentina. *Ecology*. 87:952-962.

## CAPÍTULO 2

### INTRODUCCIÓN AL FUNCIONAMIENTO Y USO DE COLECTORES DE DATOS Y SENSORES

**Autor:** Javier Gyenge

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Bariloche

#### 1. Introducción

Con el avance de la ingeniería de materiales y los sistemas de programación, se ha logrado tanto miniaturizar los equipos como generar sistemas más amigables facilitando la interacción de los mismos con los usuarios no especializados en electrónica. En general, han proliferado pequeños colectores de datos con sensores incluidos que pueden fácilmente ser programados mediante el uso de programas específicos. Otros equipos poseen la característica de ser sistemas inteligentes, los cuales reconocen los distintos sensores y el usuario sólo debe programar la tasa de toma de datos. Sin embargo, aún se comercializan colectores de datos los cuales deben ser programados (por ejemplo, los colectores de datos fabricados por Campbell Scientific Inc o Delta-T Devices Ltd, entre otros) que poseen la cualidad distintiva de su versatilidad a la hora de la necesidad de trabajar con un amplio abanico de sensores. El objetivo de este capítulo es el de contribuir para cubrir el vacío de información entre uno y otro extremo, ofreciendo información a aquellas personas con escaso conocimiento de electrónica y que necesitan decidir la utilización de un sistema de medición.

Es importante resaltar que la sola mención de las distintas marcas y modelos no significa que se esté realizando propaganda o recomendación alguna sobre su uso y sólo son brindadas a manera de ejemplos por ser los más frecuentemente utilizados por los ecofisiólogos en el mundo. Asimismo, queremos destacar que no todos los temas están cubiertos con el mismo nivel de detalle. Así como tampoco se tocan todos los tópicos posibles dentro de la amplia temática que abarca éste capítulo. Un

análisis exhaustivo de todos los equipos y su funcionamiento sería motivo de varios libros los que a su vez, deberían ser actualizados de forma continua, debido al avance permanente de la electrónica y la informática.

#### 2. Algunas definiciones a tener en cuenta

**Colector de datos:** instrumento que traduce las señales de los sensores y los convierte en datos o lecturas, los que son almacenados en algún elemento de memoria para posteriormente ser transferidos a una computadora. A diferencia de una interfase, los colectores de datos pueden funcionar independientemente de la computadora. Si bien existen colectores de datos inteligentes que reconocen la señal de algún sensor y se autoprograman (por ejemplo, las estaciones meteorológicas HOBO®), también se utilizan asiduamente colectores a los que se les deberá ingresar la información con respecto a la señal electrónica que recibirán por un determinado puerto, además de la tasa de adquisición y almacenamiento del dato (por ej., el colector de datos CR10X de Campbell Scientific Inc.).

**Sensor:** Es un dispositivo que convierte una cantidad física o química en una señal, generalmente eléctrica, que puede ser interpretada por el colector. Si bien se detallan en el punto 6 el principio básico de funcionamiento de distintos sensores, un ejemplo práctico y sencillo de traducción de señal es la del termómetro de mercurio. El mismo indica la temperatura del aire gracias a la capacidad de dilatarse o contraerse del mismo. Así, una vez que se determina la escala en °C, las personas pueden medir la temperatura mirando la escala graduada. Otro ejemplo está dado por el cambio de temperatura de un cuerpo negro en relación a la radiación solar (en este caso no se mide la radiación, sino el cambio de temperatura del objeto). De esta manera, el colector de datos tomará la señal (cambios en la conductividad eléctrica) y la convertirá (o no, dependiendo de su programación) a las unidades de medición correspondiente (por ejemplo, de mV a  $W m^{-2}$ ) aplicando la escala correspondiente (por ejemplo, una ecuación de la recta).

**Exactitud:** es la diferencia entre el valor que transmite el sensor y el verdadero valor de la me-

Esta puede deberse al funcionamiento del instrumento o a fallas de calibración. En este sentido, es importante exigir un certificado de calibración a la fábrica en la adquisición del mismo, ya que, de lo contrario, el usuario deberá recalibrar el sensor. Es posible realizar la calibración de un sensor por comparación con la señal de otro sensor calibrado; o bien producir voluntariamente el estímulo sobre el sensor a calibrar y observar la lectura para luego traducirla al verdadero valor (por ejemplo, calibrar un pluviómetro mediante la medición de un volumen conocido de agua).

**Precisión:** se refiere a la dispersión en la respuesta de un sensor ante un estímulo de igual magnitud. De esta manera, es posible que un sensor sea preciso pero inexacto.

**Estabilidad:** Algunos sensores pueden variar su respuesta por interferencia de otros factores, como por ejemplo, la temperatura. Esto deberá tenerse en cuenta a la hora de calibrar el sensor o de analizar los resultados de las mediciones.

**Sensibilidad:** se refiere al mínimo estímulo al cual responde el sensor. Por ejemplo, los anemómetros comienzan a girar a partir de una determinada velocidad de viento dado por el rozamiento de sus elementos.

**Resolución:** Se refiere a la menor división en la escala. En este sentido, un equipo puede tener una alta resolución y sensibilidad, pero baja exactitud.

**Tiempo de respuesta:** Se refiere al tiempo que necesita un sensor para detectar un cambio de la magnitud del estímulo. El mismo depende del sensor, por ejemplo, el tiempo de respuesta del sensor de radiación LI-COR® LI-190SA es de 10 segundos mientras que el piranómetro LP02 de Campbell Scientific Inc. es de 18 segundos.

### 3. Tipos de colectores de datos

Si bien no existe una clasificación formal, podemos separarlos según capacidades y prestaciones en:

**Con o sin sensores incorporados:** Existen una gran cantidad de modelos; algunos se comercializan con sensores incorporados (*sensores internos*; por ejemplo de temperatura o de humedad relativa

del aire; figura 1), mientras que otros poseen entradas o puertos a los que se pueden adosar los distintos sensores (*sensores externos*; figura 1). El usuario deberá entonces, informarse sobre los tipos de sensores que pueden conectarse al colector de datos.

A la vez, los colectores de datos que poseen *sensores externos* pueden dividirse en:



**Figura 1:** Colectores de datos con sensores HOBO® (Onset Computer Corporation). A la izquierda modelo Pro Series con sensores de temperatura y humedad relativa del aire internos. A la derecha, modelo "H8 Outdoor/ Industrial 4 channel external" con sensores de temperatura externos consistentes de termistores encapsulados en acero inoxidable.

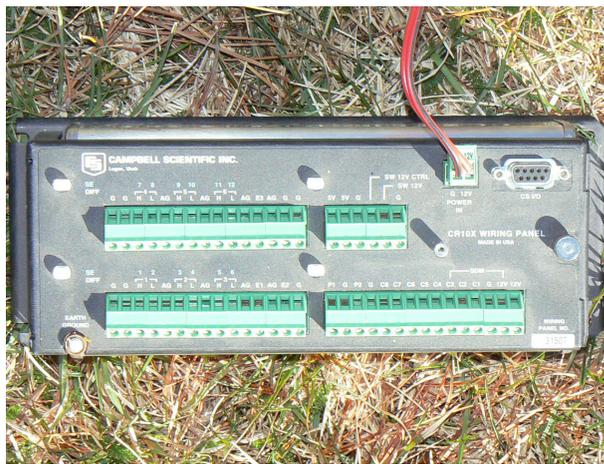
**Específicos:** Algunos colectores de datos están específicamente desarrollados para aceptar un determinado tipo y modelo de sensor. De esta manera, el usuario sólo deberá programar la tasa de toma de datos ya que el colector de datos se encuentra previamente programado para transformar una determinada señal. Entre muchos modelos podemos nombrar por ejemplo, los colectores HOBO® H8, los que poseen 4 canales para conectar sondas de temperatura (figura 1 a la derecha).

**No específicos:** Son aquellos colectores de datos que poseen una serie de entradas o puertos en los que el usuario deberá indicar cómo transformar la señal del sensor para obtener una lectura. Son típicos aquellos colectores de datos diseñados para construir una estación meteorológica ya que poseen puertos en los que podrá conectar sensores

que respondan a distintos estímulos (luz, temperatura, etc.; figura 2). Algunas empresas desarrollaron sistemas de colectores de datos y sensores “inteligentes”. En este caso, el colector de datos “detecta” el tipo de sensor conectado e instrumenta las ecuaciones necesarias para transformar la señal. Así, el usuario sólo deberá programar la tasa de toma de datos (La figura 3 muestra el colector de datos inteligente Smart Logger de la firma ICT Internacional que reconoce determinados tipos de sensores, por ejemplo meteorológicos y de medición de variables tales como la densidad de flujo de savia en el xilema de los árboles). Otros modelos, como el colector de datos CR10X de Campbell (figura 3, izquierda), si bien posee puertos específicos para determinado tipo de señales (analógicas, digitales, pulsos, etc.) admite una amplia gama de sensores o sondas de medición.



**Figura 2:** Estación meteorológica Davis Instruments modelo Wizard III® la cual consta de sensores para medir la velocidad del viento (anemómetro) y su dirección, precipitación (pluviómetro), radiación solar (radiómetro), y temperatura y humedad relativa del aire.



**Figura 3:** Colectores de datos. Arriba, modelo CR10X de Campbell Scientific, Inc. Abajo, Smart Logger de ICT International.

#### 4. Capacidad de almacenamiento de datos

Dentro de la memoria o capacidad de almacenamiento de un dispositivo, una letra, número o signo de puntuación equivale a 1 byte. Por lo tanto, un sistema de memoria de 1 kilobyte (K, mil bytes en el sistema SI o 1024 bytes en el sistema binario) permitiría guardar unos mil elementos (1024 bytes en el sistema binario).

Ejemplo de cálculo de capacidad de memoria de un colector de datos:

Se poseen 4 sensores conectados a un colector. El sistema está programado para guardar datos de 4 dígitos a una tasa de almacenamiento de uno cada 5 minutos ¿Cuánta memoria deberá tener nuestro colector para recabar toda la información generada en 7 días?

4 sensores x 4 bytes = 16 (cantidad de bytes en cada toma de datos).

60 minutos / 5 minutos = 12 (cantidad de veces que guardamos por hora)

12 veces x 16 bytes = 192 (cantidad de bytes por hora que guardamos de información) 192 bytes x 24 horas = 4608 (cantidad de bytes por día que guardamos de información) 4608 bytes x 7 días = 32256 bytes.

Por ejemplo, un dispositivo de 128 Kbytes podría almacenar los datos anteriores que se generen durante un poco más de 27 días.

Este cálculo es aproximado, ya que deberá sumársele al consumo de memoria los datos de la fecha, hora y otros elementos que permitan el manejo posterior de la base de datos. Este aspecto ha sido facilitado en muchos sistemas, ya que en los programas de comunicación entre el colector de datos y la computadora se muestra al usuario la cantidad de días de memoria remanentes dada por la tasa de toma y grabación de datos.

## 5. Tipos de puerto de los colectores de datos

Como mencionamos, algunos colectores de datos no se fabrican con sensores internos. Esto permite una mayor flexibilidad a la hora de armar redes de toma de datos con un determinado número y calidad de sensores. Dependiendo del modelo y su especificidad, podemos encontrar distintos tipos de puerto:

Puertos de toma de datos

- *Puertos analógicos*: se refiere a aquellos desarrollados para recibir una señal analógica (ver *sensores analógicos*).

- *Puertos digitales*: Se refiere a aquellos desarrollados para recibir una señal digital (ver *sensores digitales*). En algunos modelos, estos puertos permiten tanto la toma como la transmisión de señales digitales (por ejemplo, en colectores que producen un control de ambiente).

- *Puerto de conteo de pulsos*: Son aquellos desarrollados para recibir un pulso de señal (ver *sensores de pulso*).

Puertos de salida de alimentación: estos puertos están desarrollados para transmitir un determina-

do voltaje en milivolts o volts (por ejemplo, de - a +2500mV, 5 ó 12V).

Puerto de comunicación: generalmente existe un puerto para conectar el colector de datos a una computadora, tanto para poder introducir el programa al colector o bien, copiar los datos obtenidos. En general, se utilizan puertos estándar de 9 pins tipo RS232, aunque en muchos casos, las empresas utilizan elementos electrónicos o una configuración distinta de conexión de los distintos pins, por lo que se deberá comprar el cable o interfase (que actúa como "llave") provisto por la empresa. Debe ser señalado que también existen colectores de datos que poseen la capacidad de conectarse de manera inalámbrica mediante señal infrarroja, el uso de celulares y/o Internet.

## 6. Tipos de sensores según su señal

Sensores analógicos: Se trata de sensores que miden un rango de respuestas que puede representarse mediante una función matemática continua (por ejemplo, radiación, temperatura, etc.).

Sensores digitales: Son sensores que muestran respuestas de tipo discreto (0/1, encendido/apagado, etc.). En algunos casos, si bien la variable medida puede tener una señal continua (analógica), existen sistemas que la digitalizan ofreciendo diversas ventajas, como por ejemplo, su transferencia a largas distancias. Un ejemplo es la medición de la densidad de flujo de savia en el xilema de árboles (medición directa de diferencia de temperaturas entre termistores o termocuplas) cuya señal analógica es transformada a digital en los sensores y colectores de datos de la firma ICT International. Esto también puede hacerse en algunos colectores de datos Campbell Scientific, Inc. mediante la incorporación de ecuaciones en la programación. Además de la señal de temperatura, el sistema registra el número de cada sensor de una red pudiéndose identificar la señal analizada.

Sensores de pulso: Son sensores que poseen un dispositivo electromagnético que genera pulsos de señal. El colector de datos determinará el número de pulsos entre tiempos sucesivos.

## 7. Algunos principios de funcionamiento de sensores de mayor uso en el campo de la ecofisiología vegetal

En los estudios ecofisiológicos, uno de los aspectos importantes a caracterizar es la disponibilidad de los recursos necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas (agua, radiación, nutrientes, etc.) y otras variables ambientales que limitan su metabolismo, (temperatura, humedad relativa del aire, etc.). Asimismo, es deseable registrar algunos mecanismos relacionados con el funcionamiento de las plantas en respuesta al ambiente (transpiración, fijación de carbono, crecimiento, etc.). A continuación, indicaremos aspectos importantes de los dispositivos disponibles, destacando con distinto grado de profundidad su funcionamiento y condicionantes.

### 7.1. Contenido de agua en el suelo

Si bien existen un gran número de pequeños dispositivos, la cantidad de agua en el suelo se puede determinar a partir de mediciones del potencial hídrico en el suelo o del contenido volumétrico del agua en el mismo. Ambas variables se relacionan, aunque dicha relación depende de la textura del suelo.

Potencial hídrico del suelo: en el mercado pueden encontrarse distintos sensores capaces de ser conectados a colectores de datos para registrar sistemáticamente el potencial hídrico. Así, podemos nombrar los modelos de tensiómetros desarrollados por UMS GMBH (Munich, Alemania) y comercializados por diversas empresas como Delta-T Devices, Decagon, Sentek, Eijelkamp, entre otros. Básicamente, un tensiómetro es un dispositivo que estima el potencial mátrico del suelo (valores en el rango de 0 a -0,85 bar, habiendo modelos que pueden medir hasta -2 bares) mediante la medición de la presión interna (vacío) del tensiómetro. Este vacío se genera cuando el agua que contiene el tensiómetro sale del mismo hacia el suelo a través de una cápsula de cerámica hasta llegar a un estado de equilibrio. Así, el vacío generado representa el potencial mátrico del suelo.

Otro sistema ampliamente usado es el psicrómetro. Los psicrómetros a termocupla (figura

4) se pueden utilizar para medir el potencial hídrico del suelo, o el potencial osmótico de hojas, tallos, raíces y otros órganos vegetales. Si bien son sistemas exactos ( $\pm 0,02$  MPa) y con posibilidades de medir en un amplio rango de potenciales hídricos (de 0 a 8 MPa), ha de tenerse en cuenta el efecto de la temperatura sobre la exactitud y precisión de la medición. Por lo tanto, es importante utilizarlos con precaución, teniendo en cuenta todas las correcciones y calibraciones que ameritan su uso.

Otros tipos de sensores utilizados en ambientes productivos son los denominados bloques de resistencia de suelo ("soil matric potential block"). Generalmente, miden en un rango de -0,2 a -10 bares. Los mismos están conformados por un elemento poroso en cuyo interior se encuentran embebidos los electrodos. Así, la resistencia eléctrica entre ambos electrodos dependerá del contenido de agua de dicho bloque, el cual se encuentra en equilibrio con el contenido de agua en el suelo. Este sistema es



**Figura 4:** Detalle de la cápsula de malla de acero inoxidable de la sonda Wescor que envuelve a las termocuplas para la determinación de la temperatura y potencial agua del suelo. Al fondo de la imagen se observa el conector (sonda Wescor Inc.).

afectado por aquellos factores que cambien la resistencia eléctrica del agua, tal como la presencia de sales (por ejemplo, producto de fertilizaciones). Dada su vasta comercialización por diversas empresas, podemos mencionar al sensor watermark® (Irrometer Company, EEUU) desarrollado en la década de 1980, como un típico modelo que utiliza esta tecnología.

### 7.2. Contenido volumétrico de agua en el suelo

En la mayoría de los sensores se utiliza la técnica de capacitancia o bien la de reflectometría de dominio temporal (time-domain reflectometry o TDR), las cuales se basan en la medición de la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) del suelo por distintos arreglos electrónicos. Un material dieléctrico es aquel que no conduce electricidad. En el caso del suelo, el valor de  $\epsilon$  varía directamente con el contenido de agua en el mismo. Existen distintas marcas y modelos que permiten medir de manera continua (por ejemplo, dejando el sensor instalado en el suelo) o periódica (midiendo el contenido de agua en suelo en distintos lugares trasladando el sensor). En el caso de la técnica del TDR, la presencia de aire y contenido de sales en el suelo puede inducir a problemas en la medición. La técnica de capacitancia, o de reflectometría de dominio de frecuencia (Frequency Domain Reflectometry, FDR) es relativamente nueva. Esta técnica permite estimar el contenido volumétrico de agua en el suelo así como su salinidad. Entre otros, podemos nombrar los sistemas desarrollados por Sentek Technology Pty. Ltd. o los sensores de Decagon Devices (figura 5).

Finalmente, aunque de manera sucinta, nos referiremos a la sonda de neutrones. Dicha técnica se basa en la reducción de la velocidad de neutrones emitidos por una fuente radioactiva al chocar con los átomos de hidrógeno del agua intersticial contenida en el terreno. Así, el número de neutrones reflejados (o de baja velocidad) desde el suelo son detectados por un receptor, y por lo tanto, dicho número, será proporcional a la cantidad de colisiones producidas. Finalmente, deberá calibrarse el sistema para poder determinar el contenido de agua del suelo particular en el que se está trabajando. Este método no es destructivo y la medición puede repetirse en el mismo punto. Si bien la técnica es to-



**Figura 5:** Sensor ECH<sub>2</sub>O® de Decagon para determinar el contenido de agua en el suelo basado en el principio FDR.

davía ampliamente utilizada, es importante recalcar que cuando la sonda está fuera de su blindaje de protección, el operador está expuesto a radiación gamma y neutrones rápidos, lo cual, debe ser absolutamente evitado.

### 7.3. Contenido de humedad en el aire

En principio, es necesario definir la humedad relativa (HR) como la cantidad de agua que contiene una masa de aire en relación a la máxima humedad absoluta que pueda admitir bajo las mismas condiciones de temperatura y presión atmosférica, expresado en forma porcentual (%).

Uno de los sensores más utilizados por distintos fabricantes de sistemas de medición fue desarrollado y presentado en 1973 por la empresa Vaisala (Finlandia). De manera sintética, desarrollaron un sensor que posee un polímero capacitivo de película fina (TFPC), el cual adsorbe o libera agua manteniéndose su cantidad en equilibrio con el aire. Así, sus propiedades dieléctricas, y por lo tanto su capacitancia, cambian según el contenido de agua. Esta empresa ha desarrollado sensores denominados INTERCAP® y HUMICAP®, los cuales pueden ser comercializados directamente, o a través de sensores propios por otras empresas, como Campbell. Otros sensores de humedad relativa utilizan sistemas integrados que miden HR y temperatura del aire como el sensor Sensirion SHT7x o el microchip CMOSens® (Sensirion AG) cuya señal de salida

es del tipo digital. Estos sensores son ampliamente utilizados como las empresas Campbell u Onset (HOBO). Es importante entonces, conocer el tipo de sensores con los que se cuenta ya que sus señales son distintas.

#### 7.4. Viento

Básicamente, los sensores desarrollados para medir la velocidad del viento pueden dividirse en sistemas *mecánicos* y *sónicos*. En el sistema mecánico (figura 6), los anemómetros poseen un sistema de copas o propelas unidas a un eje que giran al soplar el viento. Según la marca del sensor, algunos sistemas poseen lengüetas metálicas que cierran el circuito al pasar por un conector o un inductor magnético que produce una señal eléctrica alterna sinusoidal cuya frecuencia es directamente proporcional a la velocidad, es decir, estos sensores emiten una señal de pulso o frecuencia. De esta manera, es posible determinar las revoluciones alcanzadas por el eje que luego será transformada a velocidad del viento.

Los sistemas sónicos se basan en la medición del tiempo que a un pulso de ultrasonido le lleva viajar desde un transductor emisor a un receptor en comparación al tiempo en realizar el camino contrario, es decir, desde el receptor al emisor. Un ejemplo de este tipo de dispositivo es el sistema Wind Sonic de Gill Instrument (Reino Unido), que consta de 4 transductores que deberán orientarse en sentido ortogonal norte-sur y este-oeste. Campbell ha desarrollado un modelo para medir flujos no ortogonales denominado CSAT3 basado en el mismo principio. En este caso, la señal de salida puede ser tanto analógica como digital.

Para medir la *dirección del viento* (figura 6), se recurre a un transductor que emite una señal analógica de voltaje continuo que es proporcional a la dirección cardinal establecida. En este tipo de sensores, es de suma importancia instalar el sensor alineado con los puntos cardinales.

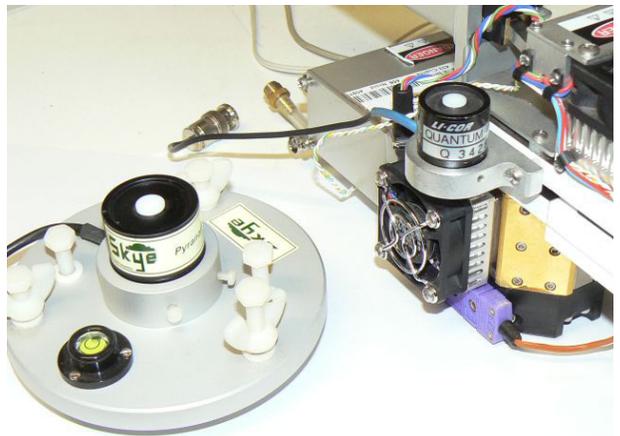
#### 7.5. Radiación solar

Esta variable se determina con sensores denominados piranómetros (también se denominan radiómetros PAR o Quantum dependiendo la longitud



**Figura 6:** A la izquierda se observan las copelas del anemómetro y la paleta del sistema para determinar la dirección del viento (sistema mecánico). A la derecha se muestra un pluviómetro, ambos modelos HOBO® de Onset.

de onda medida) que miden la radiación total proveniente de todo el hemisferio atmosférico por encima del sensor que llega a un horizonte plano como la superficie del suelo (figura 7). Los piranómetros pueden agruparse en termoelectrónicos y fotoelectrónicos. Los primeros utilizan los cambios de temperatura de un objeto negro en relación a los cambios de otro reflectivo o protegido de la radiación. La diferencia de temperatura se determina mediante el uso de termopilas (ver medidores de temperatura). En general, miden en un rango de longitudes de onda de



**Figura 7:** Piranómetros. A la izquierda se observa un modelo de Sky Int. ubicado en el plato con nivel de burbujas para su correcta orientación. A la derecha, un medidor de radiación fotosintéticamente activa marca LICOR instalado en la cámara de medición del sistema analizador de rayos infrarrojos LICOR6400.

entre 300 a 2800 nm. En cuanto a los sensores fotoeléctricos, son sustancias sólidas que generan un determinado voltaje en la unión de distintos materiales cuando son expuestas a determinadas longitudes de onda (fotodiodos). Así, existen distintos tipos que reaccionan ante determinados espectros de longitudes de onda, por ejemplo, los sensores de silicio responden a un rango de entre 350-400 a 1100nm, mientras que los de fosforo de galio y arsénico (o gallium arsenide phosphide GaAsP) generan respuesta en un rango de entre 400 a 700 nm (más modelos pueden encontrarse en los catálogos de semiconductores de la empresa Hamamatsu Corporation). Es posible mediante filtros acortar el rango de medición pudiendo así, estudiar determinadas bandas de longitudes de onda. Este tipo de sensores cuentan con un corrector de coseno del ángulo de incidencia de la radiación. Estos filtros permiten pasar los rayos perpendiculares pero no los provenientes a 90°. Los ángulos intermedios son aceptados de acuerdo al coseno del mismo con respecto a la perpendicular. En el campo de la ecofisiología vegetal, la *radiación fotosintéticamente activa* (RFA, o PAR por su sigla en inglés) delimitada entre las longitudes de onda de 400 y 700 nm es uno de los principales parámetros a medir. Distintas empresas fabrican sensores para medir PAR, como LICOR, Delta-T o Sky Instruments (figura 7). Básicamente constan de fotodiodos de silicio con un corrector de coseno que emiten una señal analógica.

## 7.6. Temperatura

Existen numerosas maneras de determinar la temperatura. Además de lo mencionado con anterioridad, podemos incluir a los termómetros de resistencia, termopares y termistores. Los termómetros de resistencia (o RTD Resistance

Temperature Detector así como también PRT Platinum Resistance Temperature) se basan en que ciertos metales como el platino, cobre o tungsteno, varían apreciablemente su resistencia eléctrica ante un cambio de temperatura. Como ejemplo, podemos mencionar la sonda 41342 desarrollado por Young o el medidor de temperatura en los sensores HUMICAP® de Vaisala. En el caso de los termopares, se aprovecha el efecto Seebeck (ver capítulo 3), de acuerdo al cual en un circuito for-

mado por dos metales distintos, con dos uniones a diferente temperatura, se genera una fuerza termoelectromotriz (f.t.e.m.) que depende de los metales utilizados en la unión y de la diferencia de temperatura entre las dos uniones. Como el objetivo es determinar la temperatura absoluta de una de las uniones, necesitamos tener una referencia en la otra unión que mida 0 °C. Sin entrar en más detalles, existen maneras electrónicas de realizar esta referencia o se deberá colocar la termocupla de referencia en un recipiente a dicha temperatura. Si bien tal vez el más difundido entre los ecofisiólogos es el termopar tipo T, existen distintos tipos de termopares dependiendo de los metales (por ejemplo, el tipo J es de hierro - constantán mientras que las tipo E son de cromo - constantán; más ejemplos pueden verse en las páginas web de Omega Engineering). Cada tipo de termocupla posee diferente sensibilidad a los distintos rangos de temperatura, dependiendo además del medio en el cual se quiere medir. Es posible armar un sistema en serie de termocuplas para ampliar su señal denominado termopila, usado ampliamente en los piranómetros. Si se disponen en paralelo, se puede estimar el promedio de temperatura de una superficie u objeto (por ejemplo, una hoja).

Por último, los termistores son semiconductores cuya resistencia eléctrica varía en función de la temperatura. Existen dos tipos dependiendo si su resistencia eléctrica aumenta o disminuye a un incremento de la temperatura (PTC y NTC, o positive y negative temperature coefficient). En general, los termistores se ubican en cápsulas de aluminio o acero inoxidable para su protección (figura 1). Existen distintos modelos de sensores de temperatura con termocuplas o termistores comercializados por COncet o Delta-T, entre otros. En general, se considera que los termómetros de resistencia o con termistores son más precisos y estables que los de termocuplas. Sin embargo, dado que las termocuplas pueden tener diversos tamaños y son fáciles y baratas de construir, son activamente utilizadas en distintos sistemas de medición, por ejemplo en aparatos para medir fotosíntesis.

## 7.7. Precipitación

La cantidad de agua precipitada se mide utilizando pluviómetros (figura 6 derecha). Si bien

existen diversas marcas y modelos, la gran mayoría cuentan con un balancín que pivotea u oscila sobre un eje luego de una determinada carga (por ejemplo, 0,2 mm de agua; figura 8). De esta manera, cada vez que se produce media oscilación se cierra un circuito eléctrico y el colector de datos cuenta el pulso emitido. Cuando se trabaja en regiones templadas, en donde la temperatura puede alcanzar valores inferiores a 0°C, existen dispositivos que no permiten el congelamiento del agua y por lo tanto, la pérdida del movimiento del balancín.



**Figura 8:** Detalle del interior del pluviómetro HOBO®. Se observa el balancín y el circuito electrónico que mide la frecuencia de balanceo.

## 8. Programación

En la actualidad, los equipos son diseñados para que el colector de datos reconozca automáticamente los sensores, mientras que los programas específicos de comunicación facilitan la programación general de la toma y tratamiento de datos. Es importante mencionar que distintas empresas comercializan estaciones meteorológicas con un determinado número de sensores (entre otras empresas el modelo Vantage Pro2TM de Davis, Watch-Dog weather station de Spectrum Technologies, HOBO® weather station de Onset Computer Corporation o el modelo WS-GP1 Weather Station de Delta-T), los cuales poseen sus programas de comunicación acorde a sus prestaciones. En otros casos, ciertas empresas desarrollaron programas

(software) que facilita la programación, ya que cuentan con librerías de sensores con los parámetros adecuados de transformación de datos y llevan al usuario por una serie de preguntas en relación a la tasa de toma de datos y manejo de los mismos. De ese modo el software genera el programa que finalmente será cargado en el colector de datos. Basta mencionar el programa, o paquete, PC200W® de Campbell Scientific Inc., para comunicarse y programar las mediciones de los colectores de datos Campbell; o el programa Ls2Win para programar el colector DL2e de Delta-T Devices. En estos dos casos, los colectores de datos poseen distintos puertos a los distintos sensores mencionados oportunamente.

Un sistema que merece seguramente una mención especial es el modelo de medición y control de sistemas CR10X de Campbell, el cual ha sido ampliamente utilizado por numerosos grupos de investigadores dada su versatilidad. Actualmente, este modelo fue suplantado por el modelo CR1000 al cual se le han agregado nuevas capacidades de comunicación, más memoria, más entradas analógicas (es decir mayor capacidad de conexión simultánea de sensores) y un lenguaje de programación diferente (CRBASIC). Además de los inconvenientes habituales que surgen al iniciarse en la programación, otro problema frecuente con el que se han encontrado quienes comienzan a utilizar estos equipos es el modo de conexión de los distintos sensores. En el caso particular de los sensores comercializados por Campbell, se detalla en sus manuales en qué puerto debe conectarse cada cable, se indican los valores por los que se debe multiplicar el valor de lectura (por ejemplo, en un anemómetro para pasar de frecuencia de pulsos a km h-1 o en un termopar para pasar de mV a °C) y además, generalmente se brinda un ejemplo de programación. Esto puede parecer inicialmente difícil de comprender, sobre todo para quienes se enfrentan por primera vez a este tipo de sistemas. Sin embargo, actualmente Campbell ofrece gratuitamente el programa PC200W, con el cual el usuario puede conectarse directamente con el colector de datos, generar nuevos programas y grabarlo en su memoria. Este programa incluye un "Short-Cut" para crear programas simples de modo de indicarle al colector de datos qué tipo de sensor posee,

cómo transformar su señal y a qué tasa debe tomar el dato. En cada paso del programa se puede pedir el archivo de ayuda (Help) en el cual se explican los elementos observados.

## CAPÍTULO 3

### FLUJO DE SAVIA MEDIANTE EL MÉTODO DE DISIPACIÓN DE CALOR

**Autores:** Javier Gyenge<sup>(1)</sup>, Natalia Tesón<sup>(2)</sup>, Julián Licata<sup>(2)</sup>, Aldo Keller<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Bariloche

<sup>(2)</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Concordia.

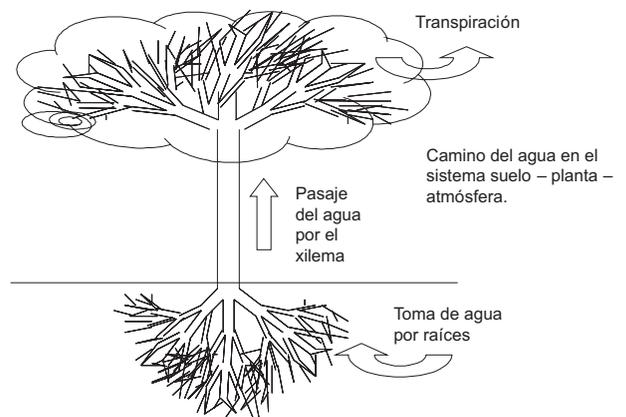
<sup>(3)</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Montecarlo.

#### 1. Introducción

##### 1.1. Circulación del agua en un árbol

Dentro de las plantas, el agua circula desde las raíces hasta las hojas a través del xilema del tallo (figura 1). El agua almacenada en el suelo ingresa a las raíces atravesando una serie de capas de células hasta alcanzar el xilema siguiendo un diferencial de tensión hídrica. A partir de allí y siguiendo dicho diferencial de potencial hídrico, el agua será conducida hasta los tejidos a mayor altura en donde se produce la evaporación de la misma (hojas, tallos fotosintetizantes, etc.). Sucintamente, el xilema es un tejido que conforma un camino simple y de baja resistencia. El mismo está formado por células anatómicamente especializadas para el transporte de agua denominadas traqueidas (en el caso de gimnospermas) y elementos de vaso (en el caso de angiospermas y Gnetales). En el caso de las gimnospermas, las traqueidas comparten el objetivo de transportar agua y servir de sostén al árbol, mientras que en las angiospermas los vasos cumplen principalmente con la función de conducir el agua, mientras que se observan otros tipos de células como radiales, fibras y fibrotraqueidas más relacionadas con estructuras de sostén. En el caso de las traqueidas, la comunicación entre las mismas se realiza a través de poros en donde sólo existe la pared primaria, la cual es delgada y porosa. Así, el

poro de una traqueida se encuentra en la posición opuesta al poro de una traqueida adyacente. En el caso de los elementos del vaso, además de los poros, poseen paredes terminales perforadas denominadas placas cribosas o perforadas. Así, los elementos del vaso se comunican entre sí por sus extremos perforados formando vasos de longitud variable. El xilema además, puede definirse a través de tres cualidades importantes: integración, compartimentación y redundancia (Cruziat *et al.*, 2002). Como integración se refiere a que el sistema vascular trabaja como una red, en donde el sistema radical se encuentra, en mayor o menor grado, interconectado con el sistema foliar. Esto se debe a las interconexiones laterales de las células de transporte de agua. Por otro lado, el sistema presenta una compartimentación dada por la cantidad de células que conforman el tejido. Así, el sistema posee un sistema de seguridad ante el caso de entrada de aire que impide parcialmente el pasaje de la burbuja de una célula a otra (ver capítulo 5), y de esta manera, el mismo opera siguiendo la premisa de ser continuo para el agua y discontinuo para el aire. Por último, es un sistema redundante, ya que en caso de que algún elemento conductor pierda su capacidad, el agua fluye de una célula a otra ubicada en forma paralela, evitando la interrupción total del flujo.



**Figura 1:** Esquema de circulación normal de agua en una especie leñosa.

##### 1.2. Xilema activo

Si bien el xilema es un tejido con mayor o menor homogeneidad, en general, existe una mayor

resistencia al flujo de agua en los tejidos más viejos. Así, comparando el flujo de agua en distintos puntos del radio del tronco, es posible observar cambios desde la porción más nueva (anillos externos, menor resistencia hidráulica) hacia el centro del mismo (anillos más viejos, mayor resistencia hidráulica). De esta manera, la parte hidroactiva del xilema es la más externa del tronco. Como lo menciona Čermák y Nadezhdina (1998), la cantidad de xilema activo en un árbol cambia con la edad y/o tamaño del individuo, la especie y la disponibilidad de agua en el suelo. Estos mismos autores mencionan que el contenido de agua en el xilema puede ser igual, mayor o menor en la porción hidroactiva que en la no activa, dependiendo de la especie. Es por ello, que sugieren medir el flujo de savia en distintos puntos en el radio del xilema para estimar el uso de agua de todo el individuo.

## **2. Descripción de algunos métodos de estimación de flujo de savia.**

Si bien existen distintos sistemas de medición de flujo de savia, la gran mayoría se basa en los métodos de disipación, pulso y balance de calor. En éste capítulo describiremos con mayor detalle el método de disipación de calor, brindando algunos detalles de los últimos dos.

### *2.1. Método de disipación de calor.*

El método de disipación de calor (o thermal dissipation method, TDP) fue desarrollado por André Granier (Granier, 1985; 1987). El mismo consiste en un sistema de dos sensores de temperatura que son insertos de manera radial en el xilema activo, en el cual uno de ellos es calentado por medio de una resistencia eléctrica y, por diferencia con otro no calentado, permite estimar el flujo de savia. En general, el sensor con la resistencia se ubica a una distancia de aproximadamente 10cm arriba del sensor sin calentamiento. Si bien dicho calentamiento no es crítico para el cálculo de flujo de agua, ambas termocuplas deben de estar lo suficientemente alejadas unas de otras de manera tal de que la termocupla de referencia no se vea afectada por el calor generado por la resistencia de la termocupla ubicada a mayor altura así como tam-

co influenciada por gradientes térmicos dentro del tronco (ver punto 7.2.). Sin embargo, es necesario determinar si dicha distancia es la correcta, realizando alguna medición preliminar sin utilizar una resistencia eléctrica (es decir, no se debería medir diferencias de temperatura entre ambos sensores).

Cada sensor se compone de una termocupla de cobre-constantán ubicada dentro de una aguja hipodérmica de acero inoxidable. En el caso del sensor que será calentado, además de la termocupla, éste tiene un cable de constantán enrollado alrededor de la aguja formando una resistencia eléctrica de resistencia conocida que será alimentada con una corriente constante provocando de esta manera su calentamiento. Los sensores son untados con grasa siliconada para disipación de calor y colocados dentro de cilindros de aluminio previamente insertos en el árbol de manera perpendicular a la longitud del tronco y siguiendo el radio del mismo.

Como la cantidad de calor aportada por la resistencia de constantán se mantiene constante, la diferencia de temperatura entre ambos sensores depende de la tasa de disipación de calor producida por el pasaje del agua alrededor del sensor. Así, mientras mayor sea la tasa de flujo de savia, menor será la diferencia de temperatura entre ambos sensores.

### *2.2. Método de pulso de calor (Pulse heat velocity)*

En ésta técnica, se mide el tiempo que le lleva recorrer a un pulso de calor desde su fuente hasta un punto fijo siguiendo la dirección de la corriente de savia. El flujo de savia se calcula teniendo en cuenta la geometría y velocidad del flujo, y el área de la sección de xilema activo.

### *2.3. Método de balance de calor (thermal heat balance)*

Este método se basa en que, en un sistema ideal en donde no hay pérdidas de calor, existe una igualdad entre el calor disipado de una sección por un flujo de agua y la cantidad de calor provista a la misma (Čermák *et al.*, 1973; Kučera, 1977). Si bien la lista bibliográfica es extensa, se sugiere la lectura de los siguientes trabajos en donde se aportan mayores

detalles técnicos, fortalezas y debilidades de cada técnica, así como la comparación de los resultados obtenidos con cada uno de ellos: Swanson, (1994); Köstner *et al.*, (1998); Becker, (2001); Burgess *et al.*, (2001); Lundblad *et al.*, (2001).

### 3. Funcionamiento de una termocupla

Una termocupla se forma al unir dos metales o semiconductores diferentes. Como resultado de la unión es posible medir en los cabos libres una diferencia de voltaje que es función de la diferencia de temperatura entre ambos extremos (efecto Seebeck). Existen distintos tipos de termocuplas dependiendo de los metales utilizados: Cobre, constantán, hierro y otras aleaciones. En el caso del método de disipación de calor, la termocupla utilizada es de cobre-constantán o tipo T.

### 4. Armado de los sensores

#### Materiales

- Agujas hipodérmicas 19 G 1 1/2 (también denominadas 40 x 10)
- Cable de termocupla cobre- constantán
- Cable de constantán
- Tubos de aluminio: 3/32" de diámetro exterior, 0,014" grosor de pared
- Cable de 2 pares para uso en telefonía
- Conectores
- Otros: cola vinílica, cemento líquido o pegamento universal, mangueritas plásticas, termocontraíbles, cinta aisladora, estaño para soldar, sierra, soldador, multímetro

#### Instrucciones:

Sensor con resistencia:

1- Cortar en bisel las agujas hipodérmicas con un largo total del tubo de acero de 2,1 cm en la parte más larga y de 2 cm en la más corta (figura 2 y 3). Hacer una muesca con un pequeño agujero, a 1 cm de distancia desde la base de la aguja para poder ubicar correctamente la termocupla.

2- Realizar un agujero en la base plástica de la aguja utilizando una aguja entera.

Limpiar los bordes recién cortados para evitar que



Figura 2: medición de la aguja

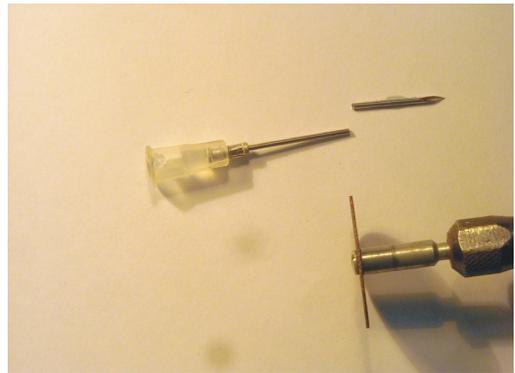


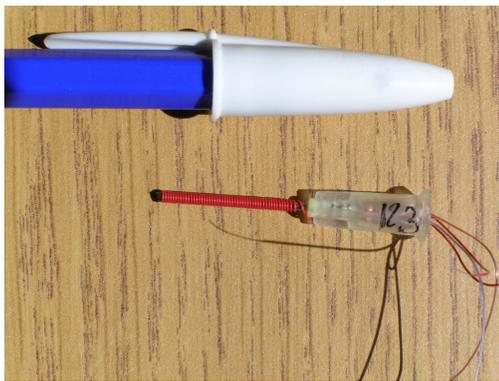
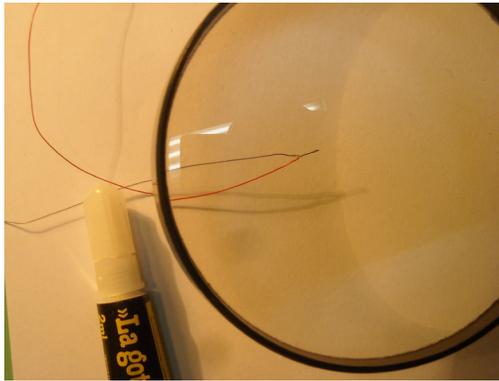
Figura 3: corte de la aguja

las rebabas de metal puedan dañar el recubrimiento de los cables y generar un paso de corriente entre la resistencia y la termocupla. Es posible también hacer pasar un cable para eliminar restos que hayan quedado dentro de la aguja.

3- Cortar aproximadamente 50 cm del cable de constantán. Descubrir el extremo e insertarlo dentro de la aguja por el extremo cortado hasta que sobresalga 5 cm de base de la aguja. Dejar el resto del cable suelto momentáneamente.

4- Cortar el cable de termocupla de aprox. 15 cm de largo. Con una trincheta o una hoja de afeitar separar el cable azul del rojo, sin dañar la cubierta de cada cable. Con cuidado descubrir 5 mm del extremo de ambos cables, retorcer los extremos juntos y soldar con la mínima cantidad de estaño posible, luego cortar con un alicate para ajustar esta

unión a 1 - 1,5 mm de largo. Aplicar una pequeña cantidad de cemento líquido en la soldadura y dejar secar (figura 4).



**Figura 4:** arriba: detalles de la soldadura; abajo: sensor armado.

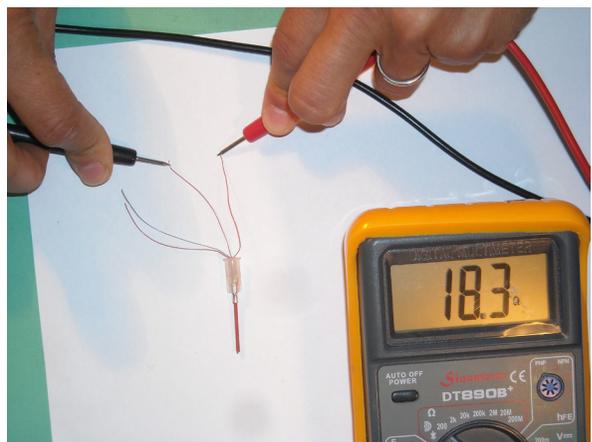
5- Con cuidado introducir la soldadura en la aguja hasta que esta sea visible por el agujero de la muesca realizada en el paso 1. No debería haber conductividad entre la aguja y la soldadura, esto debe ser comprobado mediante un multímetro. Para fijar la termocupla coloque pequeñas gotas de cemento líquido (tipo la gotita) en el agujerito hecho en el medio de la aguja hasta que la aguja no absorba más. Deje secar. Limpie los excesos de cemento del exterior de la aguja.

Comenzando desde el extremo cortado enrolle el cable de constantán a lo largo de la aguja, lo más cercano posible pero sin que se superponga el cable. La aguja debe quedar completamente cubierta con el cable de constantán. Luego de enrollar el metal de la aguja, inserte el extremo del cable en el agujero realizado en la base de la aguja.

6- Tire del extremo para ajustar el cable y rellene con cola la base de la aguja. Esto asegurará los cables. Deje secar. Corte el cable para que queden los dos extremos de un largo de aprox. 5 cm desde la base de la aguja (ver sensor terminado en la figura 4, abajo).

7- Determine el valor de la resistencia de la aguja midiendo el valor de la resistencia del cable de constantán que calentará la aguja. Utilice un multímetro para medir resistencias en ohms ( $\Omega$ ) y registre el valor de resistencia total ( $R_t$ ) que debe ser de aproximadamente  $20 \Omega$ . Mida el largo del cable que sale desde la base de la aguja ("colas") y multiplique este valor por la resistividad del cable usado para obtener la resistencia de las mismas. La resistividad del cable de constantán es normalmente  $0,4 \Omega$  por cm de extensión, de todas formas este valor puede ser calculado mediante la medición de la resistencia de un cable de una longitud conocida, siendo la resistividad el valor de la resistencia total medida dividido por la longitud del cable en cm. Así, la resistencia de las colas ( $R_c$ ) es igual a la longitud por la resistividad. La resistencia de la parte enrollada ( $R_b$ ) es entonces igual a  $R_t - R_c$ . Anote el valor de la resistencia en la base de la aguja con un marcador permanente para poder luego determinar la cantidad de corriente que le corresponderá a dicha resistencia para que la potencia sea de  $0,2 \text{ W}$ .

8- Es importante luego del armado, constatar que no existe conectividad entre los cables que



**Figura 5:** cálculo de resistencias

forman la termocupla y los cables de la resistencia. Asimismo, se debe constatar la continuidad de los dos cables de la termocupla entre si para verificar que no se han cortado o desoldado durante la manipulación para su armado.

Sensor de referencia.

El sensor de referencia se construye de la misma manera, sólo que no ha de incorporarse el cable de resistencia.

Armado del Sistema de Granier

Para conectar los pares de termocuplas al colector de datos y al suministro de energía constante se utiliza un cable multiconductor de al menos cuatro conductores y recubrimiento a tierra. Los cables rojos de ambas termocuplas, del sensor calentado y de referencia, se sueldan entre si. Mientras que los azules se conectarán al cable multiconductor que va del árbol al colector de datos y los reguladores de potencia. Por lo tanto nos quedan dos cables azules (uno de cada termocupla) y dos cables rojos (ambos extremos de la resistencia del sensor calentado) que se conectarán al cable multiconductor que llevará corriente al sensor colocado en el árbol y transmitirá los datos hasta el colector de datos. La conexión de los cables del sensor con los cuatro conductores del cable multiconductor se puede realizar mediante soldaduras con estaño en el campo, o mediante algún



Figura 6: detalles de conectores y protecciones

conector que pueda mantener la conectividad de manera estable a la intemperie. Para proteger las soldaduras y/o los conectores se utilizan mangueritas de plástico y termocontraíbles (figuras 6 y 7). Los conductores que se conectaron a los extremos de las termocuplas se conectarán luego al colector de datos o al multiplicador para medición de diferencia de voltaje, mientras que los conductores que se conectaron a los extremos de la resistencia se conectarán a los reguladores de tensión para suministrar la energía de 12V que proporcionará el calor constante al sensor calentado. Para obtener una medición correcta, es importante poder determinar el cable del multiconductor que está conectado con el cable azul de la termocupla con la resistencia y cuál al cable del sensor de referencia (ver figura 10).

Como ejemplo de distintos conectores para realizar las conexiones en el campo se pueden utilizar los de tipo serial-DB 9 (figura 6), o RCA dorados (figura 7)

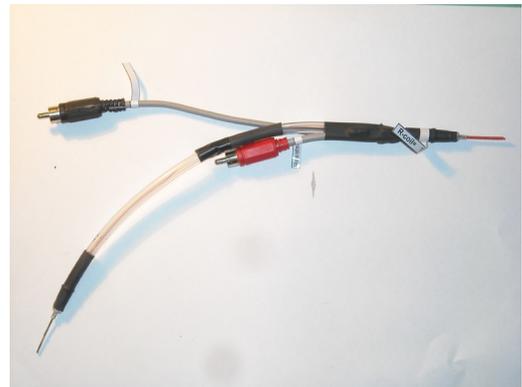


Figura 7: detalle de conector RCA

## 5. Determinación de la cantidad de corriente según la resistencia del sensor.

Siguiendo la Ley de Ohm,

$$\text{Corriente (amperes)} = (0,2W * (R \text{ total} - R \text{ colas } \Omega)^{-1})^{0,5}$$

El valor obtenido será la corriente eléctrica que debe circular por la resistencia del sensor para que el mismo sea alimentado con 0,2W de manera constante. En caso de que se regule más de un sensor por regulador, los sensores deberían tener la misma resistencia.

## 6. Armado de sistema de alimentación eléctrico

El sistema de flujo de savia puede ser armado para que funcione conectado a un tendido eléctrico domiciliario o de manera autónoma dependiendo de paneles solares.

### 6.1. Conexión a un sistema eléctrico domiciliario (110 o 220volts)

Es importante distinguir que la electricidad domiciliaria, tanto 110 como de 220 voltios, varía cíclicamente en su magnitud y dirección, y por ello se denomina corriente alterna (abreviada CA en castellano y AC en inglés). Esto hace que sea más eficiente su transmisión. Por otro lado, los equipos generalmente usados para medir flujo de savia utilizan corriente continua (CC en español y DC en inglés), que se corresponde con la suministrada por las baterías. Por este motivo, deberá colocarse un transformador de CA a CC, y de 110/220V a 12V antes del sistema de flujo de savia. Es importante también considerar que, como en algunos lugares, la tensión eléctrica puede variar, es útil colocar antes del transformador, un regulador de tensión para evitar saltos que podrían dañar los equipos. Asimismo, es de gran utilidad colocar una batería de 12V para proveer energía en caso de pequeños cortes en el suministro de energía de la red. Dependiendo de la calidad de suministro de energía, estas intermitencias pueden generar mucho ruido en los datos y mayor trabajo en la limpieza y análisis de los mismos.

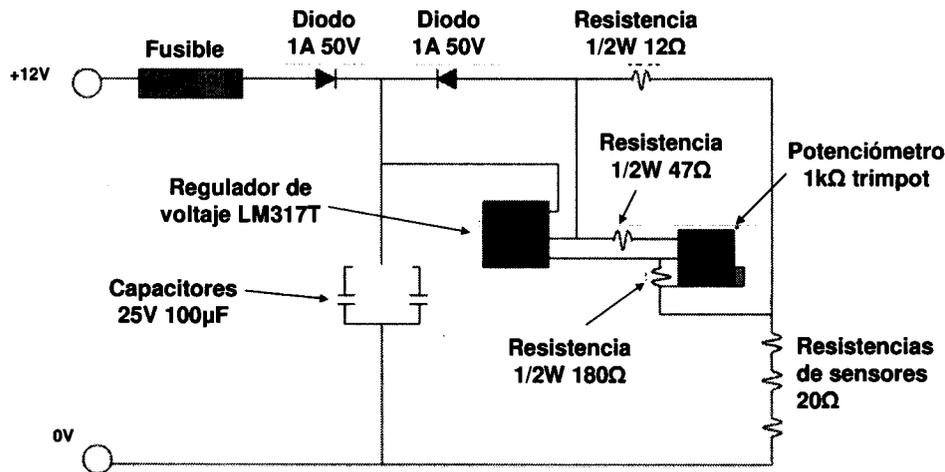
### 6.2. Conexión del equipo a paneles solares

Bajo el nombre general de paneles solares se agrupan los módulos fotovoltaicos o colectores solares fotovoltaicos. Estos se forman al unir un conjunto de celdas o células fotovoltaicas capaces de producir electricidad a partir de la luz que incide sobre ellos. Entre otras formas se clasifican por su potencia o potencial pico, el cual se corresponde con la potencia máxima que el módulo puede entregar bajo unas condiciones estandarizadas de radiación y temperatura (por ejemplo, existen paneles desde 5 hasta 160W dependiendo de las marcas).

Los paneles solares deberán conectarse a los reguladores de carga, cuyo objetivo es el de limitar la corriente generada por los paneles fotovoltaicos hacia la batería para evitar la carga excesiva y a la vez, desconectar el consumo para evitar la descarga profunda de la misma.

Como mencionamos, la resistencia o serpentina de una de las termocuplas deberá conectarse a una fuente de alimentación, conectada a la vez, a la fuente de 12V (regulador de carga de las baterías). Estas fuentes de alimentación son dispositivos que permiten proporcionar al circuito (sensores) una corriente de energía corriente constante, que es lo que permite que la potencia del circuito sea siempre de 0,2W y que por lo tanto, el calentamiento que se genera en los sensores sea constante o uniforme. Su constitución, en cuanto a los elementos o dispositivos electrónicos puede variar, lo importante es que la corriente que entrega al circuito sea constante y que posea un dispositivo de regulación de la misma en función de la resistencia del calefactor (serpentina) y que éste a su vez posea un disipador de la energía remanente en forma de calor. Pueden construirse para alimentar varios sensores a la vez, mediante una conexión en serie de los mismos. En este caso hay que tener en cuenta que, si un calefactor deja de funcionar, también lo hacen los otros conectados a la misma fuente. Además, en caso de conectar un solo sensor a una fuente múltiple, ésta deberá ser capaz de disipar la energía remanente en forma de calor, para lo cual la selección de los dispositivos o elementos electrónicos adecuados es crucial. En la figura 8 se brinda un detalle de la construcción de dicho regulador para tres sensores con resistencia similar al de la figura 11.

Una vez determinada la corriente que deberá circular por el circuito, promedio aproximado de 125mA, se multiplica por la cantidad de sensores y esa será la corriente necesaria por hora de funcionamiento del equipo más lo que consuma el registrador de datos. En función de esto se determina el tamaño y cantidad de baterías que serán necesarios para asegurar, como una regla práctica, un mínimo de 3 días sin sol, lo que limita la recarga de las baterías. Se deberá además tener en cuenta las horas de sol (en invierno con días mas cortos ha-



**Figura 8:** Esquema del circuito eléctrico de un regulador de tensión para tres sensores con resistencia.

cen falta mas baterías que en el verano) ya que los equipos trabajan las 24 hs del día.

Para poder determinar el número de paneles fotovoltaicos es preciso determinar la irradiación de cada sitio. Tanto esta información, como el cálculo de tipo de regulador o capacidad de carga de la batería puede encontrarse en numerosas páginas de Internet.

## 7. Instalación del sistema en el campo

### 7.1. Instalación del sistema de 12V

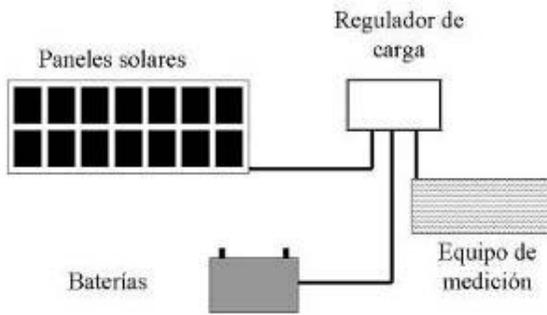
En el caso de alimentar el equipo con electricidad del tendido domiciliario, la salida de 12V se conectará con el colector de datos y el regulador de tensión de las resistencias (ver 7.3). Por otro lado, el sistema autónomo de alimentación con paneles solares descrito en el punto 6.2 es un poco más complicado. En la figura 9 se muestra un esquema de instalación del mismo. Una de las partes centrales del sistema autónomo es el regulador de carga, ya que es el encargado de alimentar el equipo de medición y mantener la carga de las baterías. Los paneles solares serán los encargados de alimentar a todo el sistema con energía eléctrica. Por dicho motivo, han de ubicarse de manera tal de poder recibir radiación solar directa durante la mayor cantidad de horas posibles. Por otro lado, las

baterías son las encargadas de almacenar energía para alimentar a los equipos en los momentos en que los paneles no puedan hacerlo. Por último, el equipo de medición se conectará al regulador de carga el cual determinará la fuente de alimentación del mismo.

Es importante mantener la polaridad de todo el sistema para evitar daños en todos los elementos del equipo de medición de flujo de savia. En general, todos los equipos tienen señalados los polos positivos y negativos. Una conducta que nos ayudará a encontrar rápidamente un problema de conexión es la de señalar los cables que se conectan a cada polo (por ejemplo, separar por colores de fundas o con cintas), manteniendo este código constante en toda la instalación. También es muy útil utilizar borneras en caso de conectar cables entre sí, brindando así una mayor solidez a la instalación.

### 7.2. Instalación de los sensores en los árboles

Como mencionamos, el sistema funciona instalando dos sensores con termocuplas. Un esquema general de instalación de los sensores se detalla en la figura 10. En primera instancia, deberá quitarse la corteza (sin dañar los tejidos vivos o el xilema) en dos pequeñas porciones del

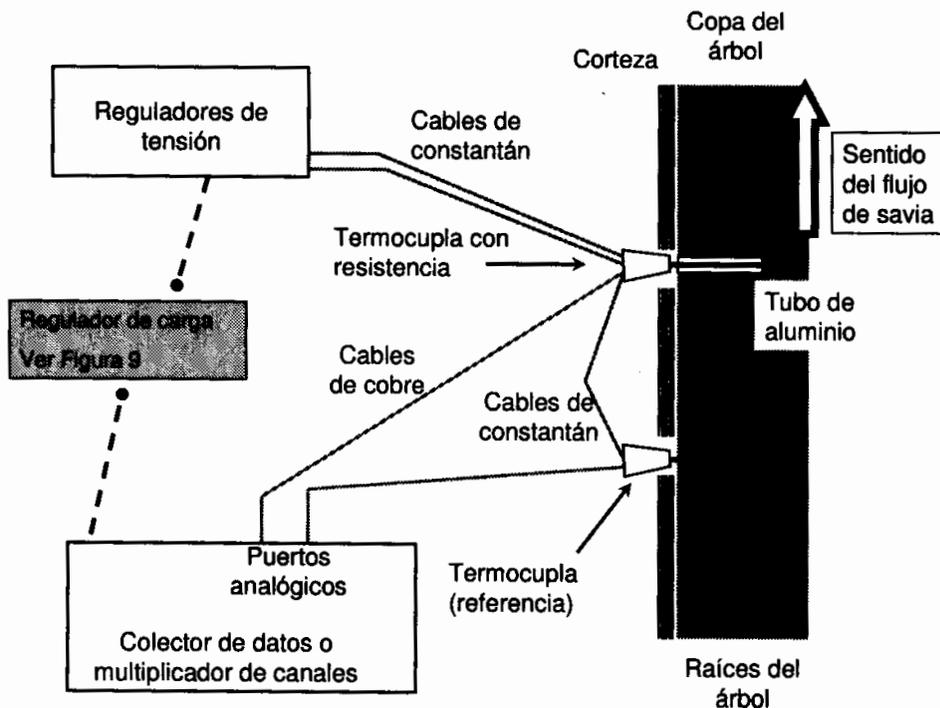


**Figura 9:** Esquema de conexión de un sistema eléctrico alimentado con paneles

tronco separadas entre sí, de manera vertical, unos 10cm una de otra. Con la ayuda de un taladro deberá hacerse una perforación acorde con la longitud de los sensores y de un diámetro de 2,5 mm en la zona más alta a la cual se le ha quitado la corteza. Allí, deberá insertarse un tubo de aluminio que alojará el sensor con resistencia (21mm de largo y con diámetro interno de aproximadamente de 2mm). El sensor con resistencia deberá ser untado con alguna grasa disipadora antes de ser insertado

en el tubo de aluminio. Es importante que el tubo de aluminio no tenga ninguna rebaba ni doblez, ya que esto entorpecerá la colocación del sensor y/o podrá causar daño al mismo. El sensor de referencia deberá ser clavado en la madera en la zona inferior a la cual se le ha quitado la corteza. Para ello, es conveniente utilizar algún elemento forrado con goma para evitar cortar los cables al golpear la base de la aguja del sensor. En este punto, conviene probar con un multímetro que la termocupla funcione correctamente, que no se haya cortado el cable de resistencia, y además, que no exista conexión entre ambos elementos.

Una vez verificado esto, se deberán unir los cables de constantán de ambas termocuplas y aislarlos con cinta aisladora. Luego, se deberán conectar los cables de cobre con los cables que posteriormente se conectarán al colector de datos. Finalmente, los dos extremos del cable de constantán con que se construyó la resistencia deberán unirse con los cables que se conectarán con el regulador de tensión. Un cable de teléfono o portero eléctrico de dos pares será muy útil para conectar los sensores al colector de datos y la resistencia al



**Figura 10:** Esquema de instalación de los sensores en un árbol. En este caso, la alimentación eléctrica proviene de un sistema autónomo descrito en el ítem 7.1 y figura 9.

regulador de tensión. Así, se utilizará un mismo cable para unir los sensores con el equipo de medición.

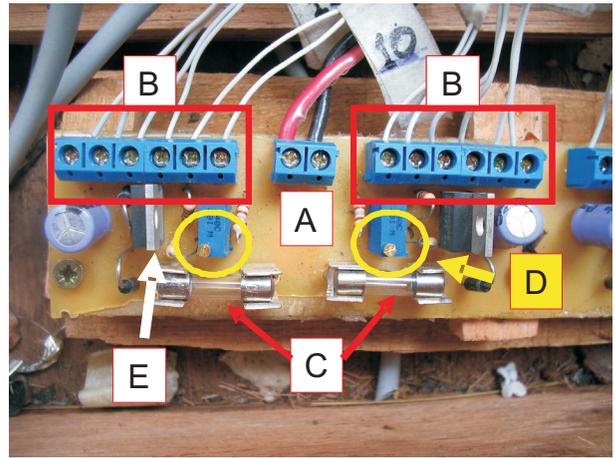
Finalmente, para evitar que el calor del sol interfiera con la medición, es necesario cubrir la zona donde están los sensores con algún aislante que evite el calentamiento por radiación solar. Entre otros puede utilizarse goma espuma cubierta con una lámina de aluminio, aislante para techados, etc.

### 7.3. Instalación de cables de los sensores al regulador de tensión y al colector de datos o al multiplicador de canales.

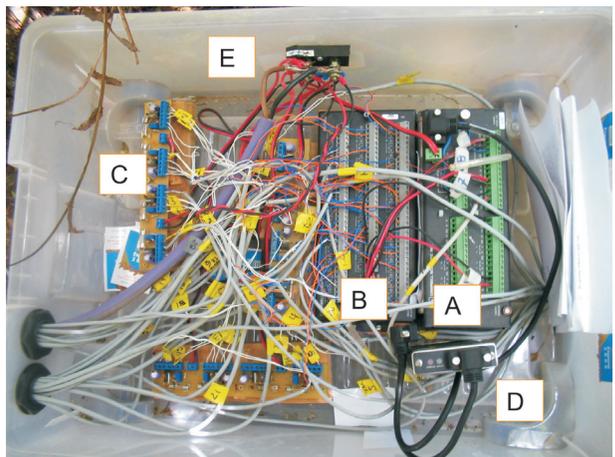
Como mencionamos, un par de cables conectarán la porción terminal del cable de resistencia con el regulador de tensión. Según cómo se haya construido el regulador de tensión, cada uno puede regular más de un sensor. En principio, una vez conectado el regulador a la fuente de 12V (figura 11 A), deberá quitarse el fusible y, mediante un multímetro, verificar dicho voltaje a ambos extremos del portafusible (figura 11 C). Sin colocar el fusible, y una vez conectado el o los sensores a la respectiva bornera, deberá verificarse que el valor de resistencia eléctrica de cada uno sea menor a  $30 \Omega$  (figura 11 B). En caso de superarla, se deberá cambiar el sensor. Todavía sin fusible, se deberá medir y colocar el amperaje necesario según la resistencia de cada sensor (ver punto 5 girando el tornillo presente en el potenciómetro (figura 11 D). Si todo funciona bien, se calentará la zona de refrigeración del regulador una vez que se coloque el fusible (figura 11 E).

En el punto 7.2 se menciona que los cables de cobre de ambas termocuplas deberán unirse al colector de datos. En el caso de los colectores de datos Campbell, deberán unirse con los puertos analógicos, de tal manera que una entrada H de un determinado puerto se una con el cable de cobre del sensor que posee la resistencia, y la entrada L del mismo puerto se una con el cable de cobre de la termocupla del sensor de referencia.

Para estos mismos colectores de datos, la empresa Campbell distribuye el multiplicador de canales AM16/32 que permite conectar 16 o 32 sensores por cada canal analógico (figura 12). En el caso de la medición de flujo de savia, el multiplicador deberá actuar del modo 2x32; así se podrán conectar 32 pares de sensores (con y sin resistencia) como los descritos. En el manual de usuario del multiplicador se describe de manera gráfica la



**Figura 11:** Detalle de un regulador de tensión para 3 sensores en línea. A= entrada de energía (12V); B= bornera en donde se conectarán los cables de resistencia de las termocuplas; C= portafusibles con fusibles; D= potenciómetro con tornillo para variar el amperaje del circuito; E= disipador de temperatura (ver figura 8).



**Figura 12:** Sistema de flujo de savia armado en campo. Se puede observar el colector de datos CR10X (A), multiplicador de canales AM16/32A (B), reguladores de tensión (C), módulo para ampliar la capacidad de memoria SM4M (Campbell Scientific Inc.)(D), y bornera conectada al regulador de carga del sistema fotovoltaico para alimentar con 12V todo el sistema (E).

forma de conectarlo con el colector de datos, así como también, la construcción del programa con las distintas instrucciones.

## 8. Cálculo de flujo de savia

La transformación de los datos de milivoltios (mV) a temperatura (que es la diferencia de temperatura entre ambas termocuplas,  $\Delta T$ ), se realiza mediante la siguiente ecuación polinómica:

$$\Delta T = 0,10086091 + 25727,94 \cdot (\text{mV}/1000) - 767345,83 \cdot (\text{mV}/1000)^2 + 78025595,81 \cdot (\text{mV}/1000)^3 - 9247486589 \cdot (\text{mV}/1000)^4 + 697688000000 \cdot (\text{mV}/1000)^5$$

Una vez transformado el valor, se aplican las siguientes fórmulas para llevar el valor de  $\Delta T$  a densidad de flujo de savia ( $J_s$  según la nomenclatura internacional más utilizada):

$$J_s = 0,714 \left( \left( \frac{\Delta T_{\text{máxima}}}{\Delta T_{\text{real}}} \right) - 1 \right)^{1,231} [\text{ml cm}^{-2} \text{ min}^{-1}]$$

donde  $\Delta T_{\text{máxima}}$  es la diferencia máxima de temperatura entre las termocuplas de cada par (generalmente en la noche) y  $\Delta T_{\text{real}}$  es la diferencia de temperatura real en cada momento de medición. La relación planteada proviene de la regresión empírica entre la densidad de flujo de savia ( $J_s$ ,  $\text{ms}^{-1}$ ) de tres especies forestales y el parámetro adimensional denominado  $K$ , desarrollada durante la calibración del método (Granier 1985, 1987; para una mayor discusión sobre el mismo, se recomienda la lectura de Lu *et al.*, 2004). Así,

$$J_s = \alpha K^\beta$$

donde  $\alpha$  y  $\beta$  representan parámetros cuyo valor numérico dependerá de las unidades con la que se exprese  $J_s$  siempre que se conserve la potencia del calentamiento diseñado en el sistema descrito. En éste caso, por ejemplo, los valores para  $\alpha$  y  $\beta$  serán 0,119 y 1,231 para  $J_s$  en  $\text{mm}^3 \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; 4,284 y 1,231 ó 0,04284 y 1,231 para expresar  $J_s$  en  $\text{kg dm}^{-2} \text{ h}^{-1}$  o  $\text{kg cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . A la vez, el parámetro  $K$  se define como

$$K = \frac{\Delta T_M - \Delta T}{T - T_\infty}$$

donde,  $T_M$  y  $T$  representan la temperatura del sensor calentado obtenida cuando  $J_s=0$  y  $J_s>0$ , respectivamente; mientras que  $T_\infty$  representa la tempe-

ratura de referencia dada por la termocupla sin resistencia. Como ambas termocuplas se conectan en oposición, la lectura representa directamente la diferencia de temperatura entre ambos sensores. Por lo tanto, podemos escribir

$$K = \frac{\Delta T_M - \Delta T}{\Delta T}$$

donde  $\Delta T_M$  y  $\Delta T$  representan las diferencias de temperaturas entre las dos termocuplas para  $J_s=0$  y  $J_s>0$ , respectivamente.

Es importante que todo el sensor quede inmerso dentro de tejido hidráulicamente activo, ya que el error de medición se incrementa con la proporción de xilema no activo en contacto con el sensor (Clearwater *et al.*, 1999). Sin embargo, es posible corregir el dato observado teniendo en cuenta dicha proporción asumiendo que el  $\Delta T$  medido es la media entre el tejido conductivo ( $\Delta T_c$ ) y no conductivo

Así,

$$\Delta T_c = \frac{\Delta T - b\Delta T_M}{d}$$

donde  $a$  y  $b$  son las proporciones en que el sensor se encuentra en el tejido conductivo y no conductivo ( $b=1-a$ ), respectivamente. Además, se asume que  $\Delta T_M$  es igual en ambos tipos de tejido (Lu *et al.*, 2004). Así, se reemplazará  $\Delta T$  por  $\Delta T_c$  en la ecuación que calcula el valor de  $K$ .

Existen distintas maneras de estimar la profundidad del xilema activo (Lu *et al.*, 2004). Una forma práctica consiste en extraer tarugos perpendiculares al eje vertical del árbol con un barreno tipo Pressler. Así, puede determinarse visualmente el cambio de color o presencia de agua. También pueden utilizarse métodos de tinción, tanto en árboles en pie como cortados. Finalmente, pueden utilizarse sensores dispuestos a distintas profundidades del tronco para determinar los cambios en el flujo en el radio del mismo.

Para poder estimar el flujo de savia por todo el xilema activo a partir de la medición en el punto en donde se insertaron las termocuplas, es importante determinar los cambios en la densidad de flujo de savia en el radio del xilema, así como la cantidad

de xilema activo en cada árbol (ver punto 1.2). En general, no se describe con detalles la metodología utilizada por los distintos investigadores para instalar sensores a distintas profundidades del xilema. Para hacer esta medición, es necesario poder acceder a dichos lugares ya sea quitando xilema para insertar los sensores, o construyendo sensores similares a los descritos (punto 12.1). El método de alcanzar mayores profundidades en el xilema quitando madera con un barreno ha sido evaluado en *Pinus ponderosa* (Gyenge *et al.*, 2003; Licata *et al.*, 2008). Para ello, se realiza una perforación con un barreno forestal de 16mm de diámetro y, al final del mismo, se realiza una perforación con una mecha de diámetro correspondiente con el sensor para insertar el mismo. A diferencia de la instalación descrita en el punto 7.2, la aguja del sensor debe ser introducida en el ubo de aluminio previamente, ya que es muy difícil insertar correctamente el sensor en el tubo de aluminio una vez insertado el mismo al final de la perforación. Mediante algún instrumento adecuado debe insertarse el sensor a lo largo del túnel de 16mm hasta quedar colocado correctamente en la inserción realizada de 2,5mm.

El flujo de savia del árbol ( $F$ ) se calcula siguiendo la siguiente ecuación:

$$F = J_s A_x$$

donde  $A_x$  representa el área de xilema activo del árbol a la altura de inserción de los sensores. Si la profundidad del xilema activo supera los 2 cm es necesario estimar la densidad del flujo de savia entre dicha porción del xilema y la parte no conductiva, tal como se mencionó anteriormente. En este sentido, se sobrestima la transpiración de un árbol al desestimar una disminución de  $J_s$  en las partes más profundas del xilema.

## 9. Relleno de series temporales

Las mediciones de flujo de savia son propensas a la generación de fallas en las series de datos que generan y que pueden afectar y complicar los cálculos de transpiración del sitio de estudio. Los huecos en los datos generan problemas de distinta índole dependiendo de su naturaleza y extensión. Fallas en la colección de datos, pro-

blemas estructurales o de diseño del experimento pueden ocasionar huecos en los datos de todos los sensores en un sitio de medición durante distintos periodos. Asimismo, pequeñas fallas en los dispositivos de medición pueden provocar el mal funcionamiento de algunos sensores dentro de un sitio de medición mientras que otros siguen funcionando normalmente (por ej. cables con conectividad intermitente, fuga de corriente de las resistencias, ruptura de cables, movimiento en los sensores, etc...). Este último tipo de errores es el más frecuente y puede originar variaciones indeseadas en el cálculo de la transpiración del sitio si es que no se tratan dichos datos adecuadamente.

El proceso de limpieza y relleno de datos es un proceso peligroso y de gran responsabilidad. Peligroso, porque se están generando datos artificialmente, en el caso del relleno, y borrando datos por considerarlos "malos", en el caso de limpieza de ruido y errores. Es de suma importancia la evaluación y confirmación, por parte del investigador responsable de dichos datos, que los períodos que se han de borrar y/o rellenar con datos artificialmente se correspondan con errores en el proceso de medición y colección de los mismos y no a variaciones naturales propias del sistema en evaluación. Debe evitarse el uso de los períodos de datos con fallas críticas para usos de validación y calibración de modelos que utilicen fórmulas similares a las que se utilicen para el relleno de datos, ya que generaría artificialmente niveles elevados de ajuste entre los modelos y los datos.

Dada la gran extensión de los datos que pueden verse generados al medir flujo de savia para calcular la transpiración de un sitio, puede resultar provechoso generar funciones de exploración de datos donde se evalúan los registros y dependiendo de las pruebas lógicas y matemáticas que se les realizan, colocarán "banderas" indicadoras de datos sospechosos. Luego el investigador podrá verificar si los registros señalizados por las funciones de exploración corresponden a errores o no y decidirá la mejor forma de solucionar dicho problema. Aquí sugeriremos algunas pruebas de errores comunes en los datos y metodologías para solucionar dichos problemas.

Es de gran utilidad para la exploración de los datos y para la discriminación entre variaciones intrín-

secas del método de medición y errores de dicho sistema, el poseer datos meteorológicos del sitio o cercanos al sitio de medición para poder compararlos entre si y servir de complemento en caso de necesidad de llenado de datos. Para que la comparación de los datos sea más fácil es necesario que concuerden los datos temporalmente, no sólo que tengan el mismo intervalo de medición sino que no haya saltos en los intervalos de medición que harían imposible la comparación de una columna de datos directamente con la otra. Por lo tanto es importante comenzar procesamiento y análisis de datos compilando y evaluando la completitud temporal de la serie de datos. Inicialmente, los registros donde se encuentren huecos temporales, se llenaran con indicadores de error, preferiblemente utilizando el mismo indicador que el elegido para indicar errores por el colector de datos. De ser un número, éste tiene que ser fácilmente discriminado de los datos reales (por ej. -9999 ó -6999 para series de datos positivos)

#### *9.1. Identificación de huecos temporales en los datos*

Las fallas que causan problemas en el conjunto total del sistema de medición generalmente provocan saltos de tiempo en la serie de registros (cuando el colector de datos deja de funcionar por un periodo de tiempo, o se sobrescriben los datos inintencionadamente). Para comprobar si los datos temporales están completos o no, se puede crear una columna extra donde se inicia con el tiempo en formato decimal igual a al tiempo de comienzo de la serie de datos, e ir adicionando el intervalo correcto entre registros. Es decir, si los datos comienzan a las 13:30, del día 145, el tiempo en formato decimal sería a 145,5625 y se le irían sumando 0,00694 si el intervalo entre registros es de 10 minutos. Luego se puede comparar la diferencia entre la columna de tiempo decimal de los datos del colector de datos y la columna de datos completos adicionada. Cuando esta diferencia sea mayor que el intervalo entre datos, quiere decir que faltan datos entre un registro y el otro.

#### *9.2. Identificación de periodos de datos con errores*

Es difícil y peligroso generar funciones de corrección automática de datos ya que pueden generar datos suavizados artificialmente y eliminar variaciones naturales del sistema. Como mencionamos

anteriormente, una alternativa válida para la exploración de datos es por medio de indicadores de datos anormales en la serie de datos y la inspección visual de los datos graficados. En el caso particular de los datos de flujo de savia sería importante solucionar o identificar los errores en el conjunto de registros de mV o diferencia de temperatura entre termocuplas, ya que el cálculo de flujo de savia depende del valor mínimo de flujo de cada día, o de máxima diferencia de temperatura entre termocuplas. Si se realiza la transformación de datos utilizando uno de estos valores cuando era erróneo, modificará el cálculo de todo un día. Es necesario algunas veces hacer modificaciones recurrentes al transformar los valores de flujo de savia en transpiración y verificar errores en esa variable, para luego volver a modificarlos en el dato de mV original. A continuación explicaremos algunas de las pruebas que se le pueden efectuar a los datos para poder marcarlos como datos anormales y así poder identificarlos y verificarlos posteriormente:

**Datos fuera del rango naturalmente posible de variación:** Una forma rápida de identificar valores erróneos es determinando un rango de variación aceptable y naturalmente posible de la variable en evaluación. En el caso de los datos de flujo de savia el valor de mV generalmente oscila entre 0 y 1,2 mV. Sin embargo hay conjuntos de sensores que normalmente varían sólo dentro de un rango menor. Es simple realizar una comparación de las columnas de registros y colocar indicadores de error o de dato anómalo en caso de que los valores se encuentren fuera de ese rango. Esto puede hacerse en forma visual, al graficar los datos en escalas fuera del umbral de datos aceptables y si aparece algún punto graficado, entonces se puede ver en que momento ocurrieron e ir a verificarlo. Como para no introducir cambios en la serie original, podemos aconsejar la generación de una serie de datos con las mismas columnas que los datos en evaluación y en los lugares donde los datos no cumplen con el test lógico se coloca un indicador de dato anómalo.

#### **Anomalia con respecto a datos vecinos:**

Muchas veces existen datos que corresponden con errores de medición o malfuncionamiento del equipamiento que genera datos que se encuentran dentro del rango de variación natural posible de la variable y que no generó códigos de error el sistema de medición. Una resistencia con conectividad

intermitente durante un período determinado puede generar que la termocupla superior no haya estado calentada durante todo el período de medición como sería de esperar.

El comienzo de este tipo de fallas puede reconocerse porque las mediciones del sensor defectuoso comienzan a diferir de la respuesta que venía teniendo el sensor en períodos previos al desperfecto. Esto puede identificarse mediante comparaciones con variables estadísticas de las mediciones de los sensores. Una posible prueba de identificación es comparando cada valor contra el promedio de los 7 ó 14 días anteriores más o menos 4 ó 5 desvíos estándares para esa misma hora del día. Otra posibilidad es evaluar como cambia el desvío estándar de los 6 registros aledaños incluyendo o no cada dato y jugar con distintos umbrales de aceptación para marcar los datos como anómalos o no. Es importante destacar que para utilizar este sistema es necesario discriminar entre el día y la noche, ya que el primer dato de la mañana generalmente aumentará el desvío estándar con respecto a los datos anteriores, puesto que durante la noche es común que muchos datos consecutivos sean iguales ya que el flujo de savia es nulo. Es necesario aclarar que dependiendo de la especie, el estado fenológico y los factores climáticos, es posible que  $J_s$  sea mayor a cero, y por lo tanto, varíen los valores de  $\Delta T_M$ . Esta última opción de comparación de los datos aledaños es más fácil de realizar en planillas de cálculo, mientras que la anterior es más efectiva al utilizar algoritmos de programación. Cabe resaltar nuevamente que estos métodos sirven para detectar datos con anomalías que posiblemente se deban a errores en el sistema de medición, pero no necesariamente lo sean. El paso de una nube en un día soleado puede generar una indicación de anomalía en cualquiera de estos dos casos, por lo tanto es importante destacar la importancia de la exploración del investigador y la disponibilidad de mediciones meteorológicas del sitio.

#### **Variación de un sensor en sentido distinto al resto de los sensores:**

Normalmente todos los árboles de un sitio poseen una tendencia similar durante el día, aumentando la velocidad del flujo de savia durante la mañana y disminuyendo durante la tarde, con posibles

variaciones dependiendo de las variables meteorológicas. El hecho que un árbol en particular cambie su forma de actuar con respecto al resto de los sensores puede ser un indicador de anomalía. Esto es fácil de verificar por medio del cálculo de los diferenciales o tasas de cambio en la variable y colocando un 1 o un -1 si la tasa de cambio es positiva o negativa respectivamente. Luego se evalúa individualmente cada sensor comparando su signo con respecto al del promedio del resto de los sensores para identificar anomalías. Una posible causa natural de esta anomalía son los árboles suprimidos o del sotobosque que pueden presentar picos de transpiración cuando el sol les incide directamente y el resto de los sensores ya había comenzado a disminuir su velocidad de flujo de savia. En dicho caso el patrón de anomalía se verá repetido en los días consecutivos con similar nubosidad.

#### **Cambios de signo frecuentes en la tasa de cambio dentro de un mismo día:**

Utilizando la misma matriz de signos de tasas de cambio, se puede evaluar cuantas veces por día ocurrieron cambios de signo en la diferencial de la velocidad de flujo de savia. Es decir, cuantas veces por día la velocidad de flujo de savia aumentó o disminuyó con respecto a la velocidad de flujo del intervalo anterior. Cuando el dato que guarda el colector de datos es un promedio de varios datos medidos durante un intervalo de tiempo, es muy extraño que la diferencial cambie de signo más de un tercio del número de intervalos que haya en un día. Un sensor con algún contacto intermitente o que se haya salido un poco del tronco del árbol puede generar este tipo de falla. Es necesario verificar en el campo los sensores que presenten este comportamiento y descartar los días completos que hayan generado este tipo de señal en los datos.

#### *9.3. Llenado de datos faltantes y errores*

Es muy común que el número de sensores de flujo de savia utilizados para el cálculo de la transpiración de un sitio en particular no sea muy elevado. Por lo tanto, si algunos sensores dejan de funcionar, el valor del flujo de savia promedio puede variar por el sólo hecho de no incluir esos sensores en el cálculo del mismo y no por que la transpiración en ese período haya sido distinta.

En este aspecto cabe destacar la importancia de tener fuentes diferentes de alimentación energética para los distintos colectores de datos que se encuentren funcionando en un mismo sitio (parcelas aledañas o estaciones meteorológicas), si es que se puede disponer de estos. De tal forma, si existen fallas técnicas que imposibilitan la colección de datos de todo un sistema de sensores, es menos probable que ambos sistemas se caigan a la vez. La existencia de datos meteorológicos para el sitio de estudio durante un período de fallas puede ser de gran utilidad cuando se presentan fallas en muchos sensores a la vez. La metodología de llenado de datos faltantes y la posible utilización de dichos datos se verá determinada por las características del período de datos faltantes y de los datos existentes para el mismo sitio durante dicho período. Los períodos de datos rellenados deben ser identificados de acuerdo a la metodología utilizada y a la longitud del período aplicada, para prevenir usos indebidos de los datos.

#### **Huecos cortos durante menos de 3 horas:**

En estos casos la interpolación lineal puede ser una herramienta muy útil para el llenado de los datos dada la velocidad y facilidad de su aplicación. El mayor inconveniente se presenta cuando la respuesta de la variable a interpolar no es lineal. Si el período donde se presenta el hueco en los datos corresponde con el momento donde se suele producir el pico de flujo de savia, la interpolación lineal producirá una subestimación de la transpiración para ese día. En tal caso sería recomendable utilizar otros métodos de llenado de datos. Por el contrario, durante períodos donde se observa que en los otros sensores la respuesta es lineal, se pueden llegar a interpolar más de 3 horas.

**Huecos prolongados en algunos sensores:** Cuando el período con fallas es superior a las 3 horas y existen otros sensores cuyo funcionamiento no se haya visto afectado, estos pueden utilizarse como base para el cálculo de la respuesta de los otros sensores con problemas. Se recomienda realizar matrices de correlación entre sensores y promedios de grupos de sensores para utilizar aquellos con mayor nivel de co-

rrelación como referencia para el cálculo de los datos de relleno para cuando existan fallas. Muchas veces entre sensores de una misma parcela y a veces de distintas parcelas de un mismo sitio, una regresión lineal suele ser un modelo con suficiente ajuste para ser utilizado en el cálculo de datos faltantes. Es importante verificar que el modelo a utilizar represente bien los datos del sensor que ha fallado. Esto se puede verificar mediante el uso de sólo cierto período de tiempo en que los sensores funcionaban correctamente para realizar el ajuste del modelo (la regresión lineal normalmente). Luego, con dicho modelo se generan datos para otro período donde también existen datos correctos para ambos sensores, y que no hayan sido utilizados para el ajuste, y se comparan los datos generados por el modelo ajustado y los datos reales medidos. Es importante que los sensores que hayan sido rellenados sean marcados, o generar columnas donde se colocan indicadores de dato rellenado.

**Huecos prolongados en muchos sensores-** En este caso es más evidente el problema mencionado anteriormente que, de no utilizar estos sensores en el cálculo del promedio, éste se verá modificado artificialmente. Los datos que se generen durante este período no deberían utilizarse para aplicaciones donde la variabilidad horaria o entre sensores sea de importancia. El rellenado de los datos durante este período tiene como objetivo disponer de una estimación de la velocidad de flujo promedio diaria de la parcela en cuestión. A tal efecto, en lugar de modificar o rellenar datos para cada sensor, pasamos a corregir el promedio del sitio. Para lograr este objetivo, calculamos la proporcionalidad del promedio de todos los sensores cuando funcionaban antes y después de la falla con respecto al promedio de los sensores que quedaron funcionando correctamente durante el período de la falla, siempre y cuando el nivel de correlación entre dichos promedios sea alto (es recomendable que no sea menor que 0,7). También es útil como en el caso anterior, realizar una validación de la metodología utilizada para calcular datos faltantes. De no tener buena correlación los sensores que quedaron funcionando con el promedio de los otros sensores o de no ser satisfactoria la validación, es preferible que se trate a todo dicho

período como una falla completa de sensores. Es de suma importancia marcar dicha condición de llenado de datos durante este período para no ser utilizado para otros fines más que para cálculos de transpiración total de un período que incluye al período donde ocurrió la falla. Debe evitarse el uso de estos datos para comparación de datos diarios entre sitios o para comparación entre un sitio y las salidas de un modelo tanto a nivel diario como horario.

**Huecos prolongados en todos los sensores:** Así como en el caso anterior los datos que se generan pierden toda utilidad para comparaciones diarias entre sitios o para ajuste de modelos con salidas diarias. Sin embargo, el llenado de datos en estos períodos puede ser de gran utilidad para calcular integrales anuales de transpiración de parcelas. En estos casos donde no se pueden utilizar otros sensores midiendo la misma variable en otros árboles es de suma importancia la disponibilidad de datos meteorológicos confiables y detallados. Para rellenar los datos se utilizará una metodología similar a la de comparación entre sensores, sólo que en este caso se realizará entre el promedio de flujo de savia calculado para la parcela en cuestión comparado con una estimación de la evapotranspiración potencial diaria para dicho sitio. Es importante destacar que es esperable que la transpiración, y por lo tanto la velocidad de flujo de savia, sean proporcionales a la evapotranspiración potencial siempre que haya agua disponible en el suelo. A medida que los recursos hídricos se hacen menos disponibles ésta proporcionalidad disminuye. Por lo tanto sería de utilidad calcular la proporcionalidad entre la transpiración medida y la potencial antes y después del período de falla de los sensores y asumir una progresión lineal entre una proporcionalidad y la otra, siempre y cuando no haya llovido en el medio de dicho período. En caso de lluvia durante el período de datos a llenar, es recomendable asumir una tasa de disminución en la proporcionalidad hasta el momento donde ocurrió la lluvia. Esta tasa de disminución deberá ser similar a la que se venía registrando hasta que se produjo el desperfecto. Luego, se asume un incremento de la proporcionalidad en el momento de la lluvia (es importante verificar si existieron en los datos medidos períodos de sequía y lluvias similares para usar de referencia) y nuevamente una tasa de disminución similar a la anterior. El aumento de

la proporcionalidad deberá ser acorde al nivel de agua disponible en el suelo posterior a la lluvia.

## **10. Posibles problemas durante la instalación en el campo (cortocircuitos, falta de señal, temperatura en el tronco)**

Una vez instalados los sensores y el sistema eléctrico de alimentación, es posible que ocurran una serie de problemas que dificultarán el correcto funcionamiento del sistema. Asimismo, existen problemas en la medición que no son tan evidentes, tal como la influencia de los flujos de temperatura naturales que inducen a estimaciones erróneas del flujo de savia.

**Problemas con el colector de datos:** Una vez conectado el colector de datos a la fuente de energía, el investigador deberá poder establecer conexión entre la computadora y el mismo. Si no logra conectarse, utilice el multímetro para verificar que llega energía eléctrica al mismo. Puede obtenerse dicha lectura contactando en la ficha de entrada de energía, o en ciertos casos, en los bornes de salida eléctrica de 5 o 12V (ver el manual del colector de datos). En caso de que la alimentación del colector de datos no sea el problema, deberá verificarse la conexión entre equipos o los detalles del protocolo de comunicación provisto por el fabricante.

**Problemas con el multiplicador de canales:** En caso de tener conectado un multiplicador de canales, el mismo deberá funcionar al alimentar con electricidad el colector de datos. Si esto no sucede, verifique el cableado entre los equipos y la llegada de electricidad al multiplicador. Si esto es correcto, deberá analizar el programa introducido en el colector.

**Problemas con los sensores:** Una vez que el equipo esté adquiriendo datos y se haya realizado la conexión con la computadora, se deberá observar la lectura de cada sensor. En este sentido, los valores problemáticos pueden ser de cero, valores muy cercanos a cero o valores fuera de rango (el código varía dependiendo de la marca del colector: ERR, ERROR, -99999, etc.; ver el manual del fabricante). En el primero de los casos, deberá

verificarse que el circuito entre el colector de datos y la termocupla esté cerrado. Para verificar esto, podrá medirse la resistencia entre los extremos del circuito (bornes L y R en el caso de colectores Campbell®). Cualquier valor indicará que el circuito está cerrado. Si el valor de resistencia es cero, verifique que se han colocado bien los cables en la bornera o se ha conectado correctamente la termocupla. Es posible que la termocupla haya sufrido problemas, deberá verificarse su integridad mediante el multímetro. Un valor de lectura bajo podría deberse a fallas en la resistencia del sensor. En dicho caso, puede verificarse que la zona de refrigeración del circuito del regulador de tensión de los sensores esté fría (figura 11 E). En caso contrario, deberá medirse la resistencia en las termocuplas para asegurar su correcto funcionamiento. Por último, en caso de que la medición dé un valor fuera de rango, es posible que exista una circulación de electricidad entre el cable de resistencia y la termocupla. En caso afirmativo, deberá reemplazarse el sensor.

**Influencia de la radiación solar sobre la flujo de savia:** Es importante aislar la zona de medición de la radiación solar para evitar una posible interferencia en la medición dada la dependencia del sistema a variaciones de temperatura. En este sentido, Do y Rocheteau (2002) sugieren que diferencias de hasta 0,2°C no producirían errores considerables en la medición. Los mismos autores sugieren que principalmente, en los momentos de menor flujo de savia, en aquellos lugares en donde las diferencias de temperatura entre el día y la noche son altas o con alta radiación solar, y en rodales de baja densidad, los gradientes naturales de temperatura podrían afectar en mayor medida las mediciones de flujo de savia. Para verificar que las temperaturas de ambos sensores son similares, se deberá dejar sin alimentación la resistencia de la termocupla superior y verificar que la diferencia de temperatura entre ambas termocuplas sea nula o valores muy cercanos a cero.

## 11. Listado de equipamiento y herramientas útiles.

Básicamente, la persona que quiera utilizar este tipo de sistema de medición deberá contar con un conjunto de herramientas básicas, entre otros: multímetro, alicate, trincheta, pinza, destorni-

lladores planos y de cruz de varios tamaños, llave francesa de por lo menos 150 mm, juego de llaves fijas, regla metálica, formón, martillo, grampas sujeta cables, pinza pelacables, cinta aisladora, taladro manual o a baterías, mechas para madera de 2,5 mm, sierra corta hierro.

## 12. Algunas soluciones prácticas (distintos tipos de termocuplas, sistema de promedio de señal)

Es posible encontrar en las revistas científicas artículos que ofrecen diversas soluciones a problemas prácticos, como por ejemplo:

*12.1. Sensores de longitud variable para medir la densidad de flujo de savia a distintas profundidades (James et al., 2002).*

Estos autores desarrollaron sensores similares a los de Granier. Una de las mayores diferencias está dada por el material con el que fabrican la resistencia (aleación de níquel - cromo,  $436 \Omega \text{ m}^{-1}$ ) con una resistencia final de 100 ohms. Otra diferencia importante es que tanto la termocupla como la resistencia se encuentran dentro de un tubo de aluminio relleno con pegamento epoxy. A cada resistencia se la provee con 0,15W.

*12.2. Método de medición de flujo de savia para promediar los valores de distintos sensores (Lu, 1997).*

Este autor sugiere un protocolo que permite “promediar” la señal de varios sensores para utilizar un solo puerto del colector de datos. De esta manera, se optimizaría el número de puertos del colector de datos, ya que es posible estimar el consumo de agua de un bosque a partir de un número mayor de árboles que de puertos. La instalación a campo de cada sensor debería hacerse similar a la descrita en 7.2 y 7.3. Sin embargo, para “promediar” los valores de lectura, se debe utilizar un solo cable que una el puerto H con los cables de cobre de la termocupla superior. Mientras que otro cable debería conectar todos los cables de cobre de las termocuplas de referencia (sensor inferior) con el puerto L del colector de datos.

El autor menciona que el error al utilizar el método es menor al 6% aún cuando la diferencia entre sensores individuales es mayor al 100%. El principal problema del método radica en que, dado que

las termocuplas se conectan en paralelo, la falla de uno de ellos invalidaría el valor promedio.

12.3. *Método de medición con energía no continua para estimar los flujos naturales de temperatura (Do y Rocheteau, 2002)*

Estos autores sugieren ciclos de medición en los cuales los sensores se calientan durante 45 minutos (momentos en los que se utiliza propiamente el método de disipación de calor) y 15 minutos sin alimentar las resistencias (momento que se mide los gradientes naturales de temperatura). Posteriormente, se deberá sustraer de las diferencias de temperatura medidas los gradientes naturales medidos.

### 13. Cambio de escala de árbol a rodal

Un primer cambio de nivel se detalló en el punto 8, en el cual se detalló el cálculo para pasar de la escala de sensor a árbol. Para pasar de escala de árbol a rodal es importante determinar la estructura del rodal, tanto su composición específica como la distribución de tamaños de los individuos. Como mencionan Köstner *et al.*, (1998), usualmente se utiliza como escalar el área basal (total o de xilema activo) de los árboles, la circunferencia o volumen y/o el área foliar. Por otro lado, existen ciertos procesos que determinan un incremento en la variabilidad, como la sequía o competencia interespecifica. Dado que el número de árboles en los cuales ha de medirse flujo de savia depende de dichas fuentes de variabilidad, será mayor en aquellos bosques discretos con numerosas especies que las plantaciones monoespecíficas conformada por individuos coetáneos.

### 14. Grupo de trabajo de flujo de savia

Dentro de la Sociedad Internacional de Horticultura (Internacional Society for Horticultural Science, ISHS; [www.wgsapflow.com](http://www.wgsapflow.com)) se encuentra una comisión en irrigación y relaciones hídricas de plantas cuyos miembros generaron una página web en donde se concentra información sobre los distintos métodos, las empresas que venden equipamiento, principales equipos, etc. Es importante destacar que también posee un forum en donde

los usuarios, una vez registrado, podrá consultar o realizar comentarios. Tanto el forum como la página se encuentran en idioma inglés.

### 15. Bibliografía

- Becker P (2001) Limitations of a compensation heat pulse velocity system at low sap flow: implications for measurements at night and in shaded trees. *Tree Physiol.* 18: 177-184.
- Burgess S S O, M A Adams, N C Turner, C R Beverly, C K Ong, A A H Khan y T M Bleby (2001) An improved heat pulse method to measure low and reverse rates of sap flow in woody plants. *Tree Physiol.* 21: 589-598.
- Čermák J, M Delm y M Penka (1973) A new method of sap flow rate determination in trees. *Biologia Plantarum.* 15: 171-178.
- Čermák J y N Nadezhdina (1998) Sapwood as the scaling parameter - defining according to xylem water content or radial pattern of sap flow? *Ann Sci For.* 55: 509-521.
- Clearwater M J, F C Meinzer, J L Andrade, G Goldstein y N M Holbrook (1999) Potential errors in measurement of nonuniform sapflow using heat dissipation probes. *Tree Physiol.* 19: 681-687.
- Cruziat P, H Cochard y T Améglio (2002) Hydraulic architecture of trees: main concepts and results. *Ann For Sci.* 59: 723-752.
- Do F y A Rocheteau (2002) Influence of natural temperature gradients on measurements of xylem sap flow with thermal dissipation probes. 1. Field observations and possible remedies. *Tree Physiol.* 22: 641-648.
- Granier A (1985) Une nouvelle méthode pour la mesure du flux de sève brute dans le tronc des arbres. *Ann Sci For.* 42 : 193-200.
- Granier A (1987) Mesure du flux de sève brute dans le tronc du Douglas par une nouvelle méthode thermique. *Ann Sci For.* 44 : 1-14.
- Gyenge J E, M E Fernández y T M Schlichter (2003) Water relations of ponderosa pines in Patagonia Argentina: implications for local water resources and individual growth. *Trees Struc. and Func.* 17: 417-423.
- James S A, M J Clearwater, F C Meinzer y G Goldstein (2002) Heat dissipation sensors of variable length for the measurements of sap flow in trees with deep sapwood. *Tree Physiol.* 22: 277-283.
- Köstner B, A Granier y J Cermák (1998) Sapflow measurements in forest stands: methods and uncertainties. *Annals of Forest Sci.* 55: 13-27.
- Kučera J, J Cermák y M Penka (1977) Improved thermal method of continental recording the

- transpiration flow rate dynamics. *Biologia Plantarum*. 19: 413-420.
- Licata J, J E Gyenge, M E Fernandez, T M Schlichter y B J Bond (2008) Increased water use by Ponderosa pine plantations in northwestern Patagonia, Argentina compared with native vegetation. *Forest Ecology and Management* 255: 753-764.
- Lu P (1997) A direct method for estimating the averaged sap flux density using a modified Granier measuring system. *Australian Journal of Plant Physiol.* 24: 701-705.
- Lu P, L Urban y P Zhao (2004) Granier's thermal dissipation probe (TDP) method for measuring sap flow in trees: theory and practice. *Acta Bot. Sinica*. 46: 631-646
- Lundblad M, F Lagergren y A Lindroth (2001) Evaluation of heat balance and heat dissipation methods for sapflow measurements in pine and spruce. *Ann. For. Sci.* 58: 625-638.
- Swanson R H (1994) Significant historical developments in thermal methods for measuring sap flow in trees. *Agricultural and Forest Meteorology* 72: 113-132.
- Tyree M T (1999) Cap. 6: Water relations and hydraulic architecture. *En: Handbook of functional plant ecology*. Pugnaire FI y F Valladares. Marcel Dekker Inc., New York, Estados Unidos. pp. 221-268.

## CAPÍTULO 4

### CONDUCTANCIA y CONDUCTIVIDAD HIDRÁULICA

**Autores:** María Elena Fernández<sup>(1)</sup>,  
Javier Gyenge<sup>(1)</sup>, Corina Graciano<sup>(2)</sup>,  
Santiago Varela<sup>(3)</sup> y Guillermina Dalla Salda<sup>(3)</sup>.

<sup>(1)</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Bariloche

<sup>(2)</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - INFIVE, Universidad Nacional de La Plata

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

#### 1. Introducción

La *conductividad hidráulica* de una porción de tejido (madera de tallo, raíces, hojas, etc.) es una medida de su capacidad de conducir agua. Esta propiedad está intrínsecamente ligada a la capacidad de la planta de abastecer de agua a los tejidos fotosintéticos, por lo que tiene relación directa con la posibilidad de mantener los estomas abiertos y fijar C (ej. Hubbard *et al.*, 2001). En especies leñosas, en las que el agua se conduce por una vasta red de elementos de conducción, la resistencia (inversa de la conductancia) de los tejidos al transporte de agua constituye un elemento clave para comprender su comportamiento productivo y ecológico frente a distintas condiciones ambientales. Es por ello que la medición de gran número de variables relacionadas con la conductividad hidráulica (ver más abajo de una planta o de distintos órganos de la misma, se ha difundido ampliamente en los estudios de especies leñosas (y consecuentemente, en las publicaciones derivadas de ellos), lo que se ve facilitado por la sencillez y bajo costo de las mediciones.

En este capítulo definiremos y profundizaremos en la medición de las siguientes variables: conductancia y conductividad hidráulica, conductividad hidráulica específica, conductividad hidráulica específica localizada, y conductividad hidráulica foliar específica. Metodológicamente se enfatizará en la medición de las mencionadas variables en tallos,

ramas y secciones de madera (conductividades), así como a nivel de planta (conductancias). Finalmente, se describirán brevemente técnicas que permiten la medición de la conductividad hidráulica en hojas y raíces.

#### 2. Definiciones

##### 2.1. Ecuación de Darcy

Esta ecuación refleja la permeabilidad de un medio poroso. La expresión matemática es la siguiente:

$$K = \frac{q\eta}{A\Delta\Psi}$$

donde  $K$  es la permeabilidad en relación al área transversal ( $A$ ) y largo ( $l$ ),  $q$  es el flujo del líquido que pasa por el tejido y que posee una viscosidad conocida ( $\eta$ ) bajo un gradiente de presión ( $\Delta\Psi$ ). Este es el modelo que se aplica para la medición de la permeabilidad del xilema, utilizando diversos factores para estandarizar la medición. Un mayor detalle se puede leer en el trabajo de Edwards y Jarvis (1982).

##### 2.2. Conductancia hidráulica ( $K$ )

Es una variable que cuantifica la capacidad de conducción de agua de un segmento o más normalmente, una planta entera, sin considerar las dimensiones de la misma. En este término influyen las conductividades hidráulicas (ver más abajo) de todos los componentes de la planta, desde las raíces hasta las hojas, las que determinan una conductancia total. En el caso de considerar una planta entera, se define como:

donde  $E$  es la tasa de transpiración (volumen de agua por unidad de tiempo) y  $\Delta P$  es la diferencia de potencial entre los extremos (suelo-hojas). Para estimar  $K$  en general se utiliza la  $E$  medida al

$$K = \frac{E}{\Delta P} [\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1} (*)] \text{ o } [\text{kg m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}]$$

mediodía, el potencial hídrico promedio de las hojas al mediodía, y el del suelo. La tasa de transpiración de una planta puede medirse por distintos métodos, que se detallan en el Capítulo 3 de este libro. El potencial hídrico del suelo puede medirse o estimarse a partir del contenido de agua del mismo (aunque habría que conocer esta variable para todo el suelo explorado por el sistema

radical), o bien se estima a partir del potencial hídrico en pre-alba de la planta. Es importante considerar que, para poder estimar el potencial hídrico del suelo a partir del de la planta, hay que asegurarse que exista un equilibrio termodinámico entre ambos. En ambientes donde la transpiración nocturna es cero, este equilibrio se produce normalmente durante la noche, y por ello, se mide antes de que amanezca y el agua comience a circular nuevamente por la planta. En lugares donde la transpiración nocturna es esperable, puede ocurrir que nunca se alcance el mencionado equilibrio (la planta siempre posee potenciales hídricos más negativos que el suelo, Donovan *et al.*, (1999)). En ese caso, una manera de minimizar ese gradiente de potenciales es tapar la planta entera con un nylon el día previo a la medición, o al menos, la rama que vaya a medirse.

### 2.3. Conductancia hidráulica total entre el suelo y las hojas ( $K_{\text{planta}}$ )

Es igual a  $K$  estandarizada por el área foliar (AF) de la planta:

Es importante destacar que esta variable y la anterior ( $K$ ) son dinámicas para un mismo individuo, tomando distintos valores de acuerdo a las tasas transpiratorias de la planta en cada momento, las que están sujetas a limitantes ambientales y fisiológicas.

$$K_{\text{planta}} = \frac{E}{\Delta \text{PAF}} \quad [\text{mol s}^{-1} \text{MPa}^{-1}] \text{ o } [\text{kg s}^{-1} \text{MPa}^{-1}]$$

### 2.4. Conductividad hidráulica ( $k$ o $kh$ )

Es la cantidad (volumen) de agua que atraviesa un segmento de longitud  $l$  por unidad de tiempo y de diferencia de potencial entre los extremos del mismo ( $\Delta P$ ). El volumen por unidad de tiempo es igual al flujo  $Q$ , por lo tanto,  $k$  se calcula en base a la siguiente ecuación:

### 2.5. Conductividad hidráulica específica ( $k_s$ )

Es igual a  $k$  estandarizada por la sección transversal del segmento conductivo  $A_s$  (área transversal de

$$k = \frac{Ql}{\Delta P} \quad [\text{kg s}^{-1} \text{m MPa}^{-1}]$$

xilema activo). En el caso particular de la conductividad hidráulica específica localizada  $A_s$  corresponde al área interna de la aguja que se inserta en la madera.

$k_s$  es una variable que permite comparar la capacidad conductiva de distintas partes de una planta o bien de distintos individuos, brindando información acerca de una propiedad de la madera (tejido de conducción) de los mismos independientemente del tamaño considerado. Se calcula como:

$$k_s = \frac{Ql}{A_s \Delta P} \quad [\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{MPa}^{-1}]$$

### 2.6. Conductividad hidráulica foliar específica ( $k_f$ )

Es igual a la  $k$  estandarizada por el área foliar (AF) abastecida por el segmento utilizado:

$$k_f = \frac{Ql}{AF \Delta P} \quad [\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{MPa}^{-1}]$$

Para mayores detalles de las mencionadas definiciones se recomienda la consulta de las siguientes referencias: Cruiziat *et al.* (2002); Hunt *et al.* (1991); Beikircher y Mayr (2008).

## 3. Estimación teórica de la conductividad hidráulica

Es posible calcular la conductividad hidráulica ( $kh$ ) de un segmento de madera conductivo mediante la medición de los lúmenes de los vasos / traqueidas utilizando la fórmula de la Ley de Hagen-Poiseuille:

$$k_h = \sum_i \left( \frac{d_i^4 \pi \rho}{128 \eta_w} \right)$$

donde  $d_i$  es el diámetro del lumen del vaso/traqueidas,  $\rho$  es la densidad del agua a 25°C (998 kg m<sup>-3</sup>) y  $\eta_w$  es la viscosidad del agua (8,9 10<sup>-10</sup> MPa). Estimando el área foliar, es posible determinar así la  $k_l$  teórica (por ejemplo, de una hoja (Eguchi *et al.*, 2008)).

#### 4. Mediciones en tallos finos o ramas (segmentos de madera con corteza)

Un sistema básico de medición de conductividad hidráulica puede encontrarse en el trabajo de Sperry *et al.* (1988). Este sistema consta de dos pequeños circuitos de agua que difieren en la presión en la que la misma es conducida a la muestra (figura 1). En el sistema de alta presión, el agua contenida en un depósito es dirigida hacia la muestra por una presión ejercida por una cámara. Esta cámara se inyecta con aire comprimido (o algún otro tipo de gas) de manera de elevar la presión del agua en torno a la misma, pudiendo medirse ésta con un manómetro conectado al depósito. Este sistema permite introducir agua a la muestra (perfusión del tejido) quitando los embolismos y así, llegar a la conductividad máxima. En general, para quitar los embolismos, se debe aplicar una  $\Delta P$  de entre 150-200 kPa (=0,15-0,20 MPa), aunque estos valores pueden variar de acuerdo a la especie.

En el sistema de baja presión, la misma se logra dando altura al depósito de agua. Esta impone una presión conocida de 10 kPa por cada metro de altura entre la fuente de agua y la muestra por la cual ésta se conduce (rama o tallo). Este tipo de sistema se utiliza para medir la conductividad hidráulica real (o "nativa") en cada momento,

incluyendo los embolismos presentes. Generalmente, se utiliza un gradiente de 2-3 kPa en maderas con porosidad en anillos y 4-6 kPa en coníferas y maderas de porosidad difusa (Beikircher y Mayr, 2008; Li *et al.*, 2008) aunque otros trabajos han aplicado presiones mayores, hasta de 10 kPa (Tyree *et al.*, 1999a; Vogt, 2001). Es muy importante, en éste o cualquier otro conductímetro, que no existan burbujas de aire ya que éstas podrían obstruir el paso de agua y disminuir la conductividad hidráulica a medir. Por ello, siempre debe prestarse atención a la presencia de burbujas o espacios con aire, y el segmento a medir, siempre debe ser cortado (o recortado) bajo el agua. Asimismo, el agua debe contener la mínima cantidad de partículas y burbujas posibles. Para ello, se aconseja utilizar en la construcción del sistema de medición, manguera transparente (tipo cristal) y agua coloreada (con una solución de Safranina al 0,5%) de manera de poder fácilmente visualizar la presencia de

burbujas. El uso del agua coloreada ayuda también a detectar pérdidas de agua a lo largo del sistema, a ver cuándo el agua llega al otro lado de la muestra y también para medir el área de xilema activo. El agua a utilizar debe ser agua destilada y desgasificada. Para desgasificar, se puede colocar el recipiente con agua en un desecador que se conecte a una bomba de vacío. Se debe aplicar vacío en forma intermitente hasta que dejen de salir burbujas de aire. Lo ideal es colocar en el desecador el mismo recipiente que se utilizará como cabeza hidráulica, para evitar el trasvasado que incorpora burbujas de aire nuevamente. Otra opción para eliminar el aire es hervir el agua durante 20 minutos. Una vez que se enfrió el agua, debe trasvasarse con cuidado, para incorporar la menor cantidad de aire posible.

Algunos autores han utilizado soluciones levemente ácidas para prevenir la formación de microorganismos (Harvey y Van den Driessche, 1997; Pammenter y Van der Willigen, 1998; Sperry *et al.*, 1994) o soluciones de KCl (10- 50mM) (Canham *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008; Lovisolo *et al.*, 2008; Taneda y Sperry, 2008; Tyree *et al.*, 1999a), aunque otros autores utilizaron agua pura (Meinzer *et al.*, 2008; Vogt, 2001). De todas maneras, hay que considerar que la conductividad hidráulica del tallo varía reversiblemente con la concentración salina de la solución que perfunde, siendo el doble con 20 mM KCl que con agua pura en *Laurus nobilis* (Zwieniecki *et al.*, 2001). Una alternativa para decidir si utilizar agua pura o determinada concentración de KCl es realizar una prueba haciendo perfundir en el mismo material vegetal agua pura y soluciones con concentraciones crecientes de KCl, dentro de rangos posibles para la savia del xilema (0- 50 mM). Si la conductividad varía, debería elegirse la que produce máxima conductividad.

Para determinar la cantidad de agua que pasa a través de la muestra se requiere el uso de una balanza analítica (de alta precisión) ya que la cantidad de agua recolectada generalmente es muy pequeña. Para recolectar el agua conviene hacerlo en tubos con tapa (del tipo Eppendorf) que contengan un pequeño trozo de papel tisú. Un tubito de este tipo se coloca en el extremo del tallo por donde sale el agua, poniendo en contacto el tallo con el papel absorbente.

Un aspecto muy importante a tener en cuenta es el sellado entre las distintas partes del sistema de manera de que toda el agua que circula por el mismo salga por el extremo del tallo y no por otro lado. Para ello, es importante disponer de varios tamaños de manguera, de distintos materiales (más rígidas para el tramo más largo y de látex flexible para la conexión con la muestra). Asimismo, se pueden minimizar fugas de agua envolviendo las uniones con algún tipo de *film* o cinta de teflón, o presionando las superficies de contacto con algún tipo de abrazadera o alambre blando. Estas precauciones minimizan los posibles errores que se pueden cometer durante la estimación de la conductividad hidráulica y deben tenerse en cuenta en el uso de cualquier tipo de conductímetro.

Otra forma de construir un conductímetro de un solo canal, es decir, para medir una muestra por vez, consiste en colocar una pipeta graduada a cierta altura por encima del tallo a medir, y conectar a ambos con una manguera (figura 2). Se introduce

agua en el sistema con una jeringa, se cierra la válvula desde ésta, y se deja que el agua circule por diferencia de presión desde la pipeta hacia afuera, atravesando el tallo. Se fija un tiempo determinado o bien se fija un volumen de agua, y respectivamente, se mide cuanto agua pasó por la pipeta en ese tiempo, o cuanto tiempo transcurrió para el pasaje por la pipeta del volumen de agua determinado. Esta metodología fue utilizada por Spicer y Gartner (2002) para medir la conductividad hidráulica del tallo en plantines.

#### 4.1. Conductímetro para medir varias muestras a la vez (multicanal)

Al igual que en el último caso, la construcción de este tipo de sistema de perfusión o conductímetro requiere de un recipiente con agua colocado a una altura que permita generar un gradiente de presión (cabeza hidráulica), mangueras que conduzcan el agua y un sistema de acople a los tallos que

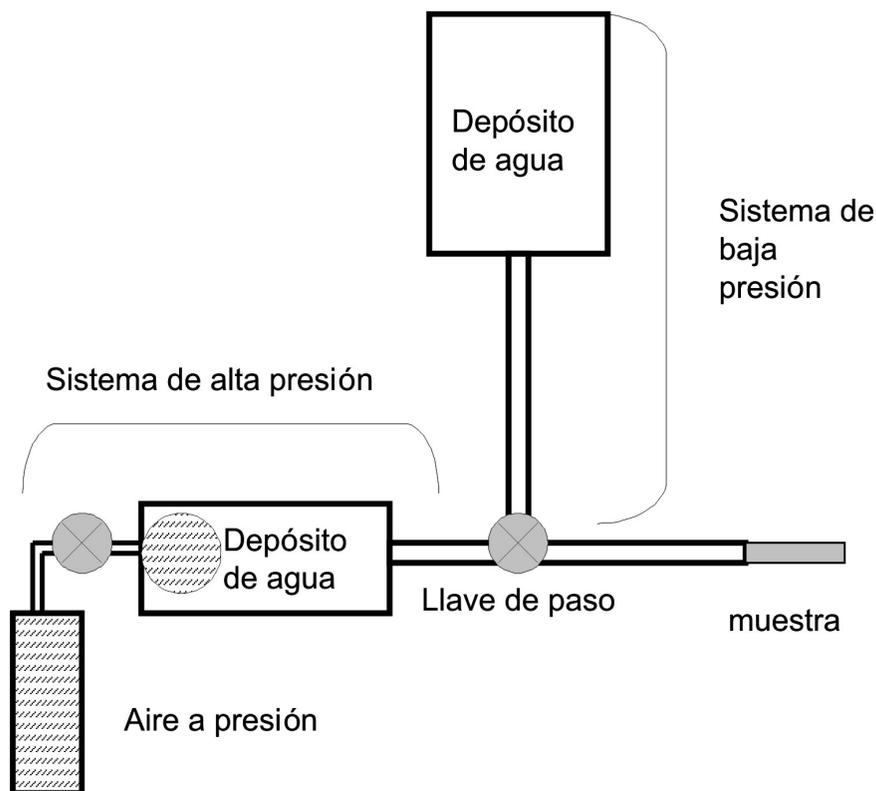


Figura 1: Sistema básico de medición de conductividad hidráulica.



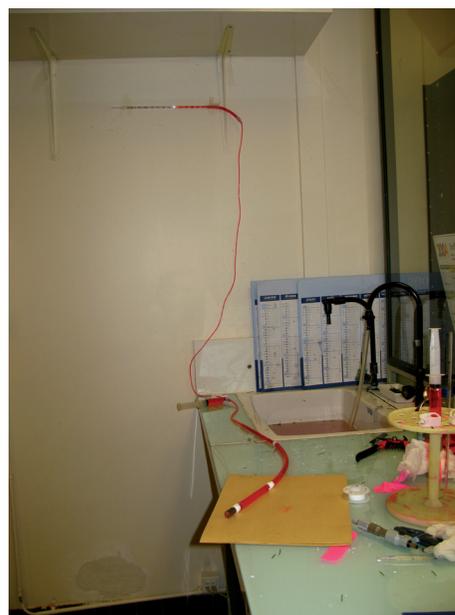
**Figura 2:** Conductímetro de un solo canal, basado en el método de la pipeta

se quieren medir. Además, debe haber recipientes que permitan coleccionar el agua que profundió por cada tallo.

Como se mencionó anteriormente, hay que considerar que 1 m de columna de agua genera una presión de 10 kPa. Estos valores de referencia se toman cuando se quiere medir la conductividad hidráulica del tallo, con el nivel de embolismos que éste posea. Sin embargo, si se quiere remover los embolismos para medir la conductividad máxima se debe aplicar una  $\Delta P$  de hasta 200 kPa, para lo cual se puede armar un perfusionador de alta presión, como se indica más abajo.

Una manera sencilla de armar un conductímetro multicanal es utilizando caños de agua que se acoplan por termofusión (figura 3 y detalles en Anexo 1).

Se utilizan tantas T como salidas se quiera tener. Las T se unen por termofusión con pequeñas porciones de caño. En la rosca de salida de la T se coloca un pico de bronce que tiene igual rosca que la del caño de agua. La entrada de agua al sistema se realiza a través de un caño (codo de 90°) también unido por termofusión. En el extremo opuesto del sistema se debe colocar un caño perpendicular a la superficie de la mesada, con una llave de paso



**Figura 2 (cont.):** Conductímetro de un solo canal, basado en el método de la pipeta. En este sistema se trabaja con agua coloreada.

esférica. Este caño permite purgar el aire que queda dentro del sistema apenas se abre el recipiente que contiene el agua. Esta llave debe cerrarse una vez que ya no salen burbujas de aire.

Para hacer las mediciones, en los picos de bronce se coloca una porción de manguera de látex, que permita acoplar la ramita al sistema. Es opcional colocar, entre el pico de bronce y el tallo, una llave de tres vías, que sirve para poder habilitar y cerrar el paso de agua a cada una de las salidas, en caso que se quiera trabajar con menos tallos. Al igual que en los primeros conductímetros descritos, conviene tener mangueras de acople a los tallos de diferente diámetro para que ajusten bien a diferentes tamaños de tallos.

Una vez colocados los tallos y purgado el sistema, el agua empieza a ser conducida a través de los mismos. La recolección de agua debe comenzarse cuando el flujo es constante. El tiempo de medición dependerá de la presión ejercida, de la especie utilizada y de la precisión requerida para la medición. El agua debe ser coleccionada para conocer el volumen de líquido que pasa por unidad de tiempo ( $Q$ ). El agua puede coleccionarse en tubos Eppendorf o Falcon de 12 ml, previamente pesados. Luego de concluída la recolección, se

pesan los tubos con el agua, para evitar el trasvasamiento y la pérdida de líquido.



**Figura 3:** Conductímetro multicanal. Fotografías superiores: conductímetro completo (exceptuando la cabeza hidráulica), visto desde uno y otro extremo. Fotografía inferior: detalle de acoples individuales.

#### 4.2. Perfusionador de alta presión

El perfusionador en este tipo de sistemas (figura 4) cumple la función de quitar los embolismos preexistentes en una determinada porción de rama o madera si se desea estimar su conductividad hidráulica máxima ( $kh_{max}$ ).

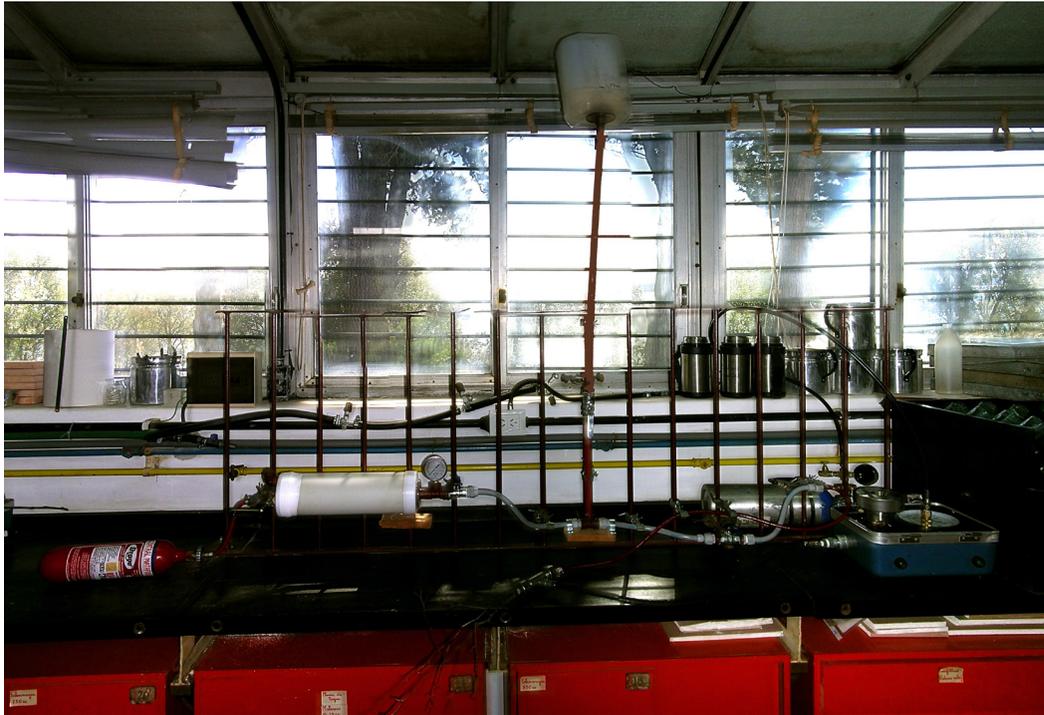
La construcción de dicho sistema es simple y puede realizarse en su totalidad con material de PVC. En el anexo 2 se presenta el detalle de cómo armar este tipo de perfusionador. De acuerdo a nuestra experiencia, tubos de entre 11 a 13 cm de diámetro pueden soportar las presiones necesarias para la eliminación de embolismos.

#### 4.3. Medición del área de xilema activo

Para estimar la conductividad hidráulica específica es necesario conocer el área de xilema activo. En el caso de tallos pequeños, la sección transversal de los mismos es un buen estimador del área de xilema activo. En tallos de mayor diámetro, debe medirse el área de xilema activo. El xilema activo puede diferenciarse del no funcional haciendo la perfusión con un colorante hidrosoluble (por ejemplo, con una solución 0,5% de safranina) (Taneda y Sperry, 2008). La perfusión puede realizarse colocando la solución con colorante en la cabeza hidráulica una vez finalizada la medición. Otra alternativa es colocar, en un desecador, la sección de tallo con el extremo basal sumergido en la solución de safranina y posteriormente aplicar vacío hasta que el colorante se visualice en el extremo distal del segmento. En ambos casos tomará color sólo el xilema funcional, generalmente, en forma de anillo. Midiendo los diámetros de ambas circunferencias (la interior sin colorear y la total), se podrá calcular el área de xilema activo. Si el tallo es cónico y el diámetro varía entre los dos extremos del tallo, puede medirse en ambos extremos y promediarse ambas superficies. Para mayor precisión aún, puede tomarse una fotografía de las secciones teñidas y estimarse su superficie.

#### 5. Mediciones en trozos de madera sin corteza (trozo de un tallo)

Los conductímetros anteriores sirven para segmentos que poseen un recubrimiento exte-



**Figura 4:** Perfusor de alta presión para eliminación de embolismos iniciales y posterior medición de conductividad hidráulica máxima. Ver anexo 2 al final de este capítulo para un detalle de cómo armarlo.

rior (corteza) que obliga a que el agua que ingresa por un extremo del tallo, sea la misma que sale por el otro extremo (que uno recoge y pesa). Sin embargo, a veces es deseable conocer la  $k$  de un segmento de madera perteneciente a una porción de un tronco (ej. una sección de distintos anillos de crecimiento), pero que no posee corteza. En este caso, una manera ingeniosa de medir la  $k$  es la ideada por Spicer y Gartner (1998), y que puede realizarse fácil y económicamente con los materiales que se muestran en la figura 5. El principio es exactamente el mismo que en los otros conductímetros (puede aplicarse cualquiera de los métodos generales para medición de una única muestra), y la diferencia reside en que se envuelve con látex a presión las paredes del segmento (simulando una "corteza") de manera de que toda el agua se vea obligada a salir por el extremo del segmento en el que ésta se recoge. En el mencionado artículo se brinda una descripción detallada del método. Brevemente, se utiliza un tubo (ej. un niple plástico que ya viene con roscas en ambos extre-

mos) con dos tapas con rosca (una en cada punta). Una de las paredes del tubo se perfora (por ej. con un taladro) y se coloca una válvula de cámara de bicicleta. Por esta válvula, y mediante un inflador de bicicleta, se introducirá aire a presión para apretar el látex contra el segmento. Para ello, en el interior del tubo se coloca un tubo de látex (un preservativo no lubricado al que se le corta el extremo cerrado), que se fija a los extremos del tubo exterior. Para ello, pueden utilizarse bujes plásticos (ver figura 5). Ambas tapas roscadas deben perforarse y rellenarse en su interior (por ej. con telgopor o Mexpol®), de manera de que por una entre la manguera desde la cabeza hidráulica, y por la otra salga el trozo de manguera conectado al extremo distal del segmento, por donde sale el agua que uno recoge y pesa. El trozo de madera se conecta mediante mangueritas de látex a la cabeza hidráulica, y se coloca en el interior del doble sistema de tubos (dentro del tubo de látex). El aire que se ingresa con el inflador queda retenido entre la pared del tubo plástico exterior y el tubo de látex interior.

## 6. Medición de conductividad hidráulica específica localizada (en anillos de crecimiento)



**Figura 5:** Detalles de armado de un conductímetro para segmentos de madera sin corteza (basado en idea original de Spicer y Gartner (1998), aunque modificado para ser confeccionado con elementos económicos y de fácil disponibilidad).

Este sistema de medición ha sido desarrollado (Dalla Salda *et al.*, 2009) con el fin de medir la conductividad hidráulica dentro de un anillo de crecimiento. Para esto debemos tomar muestras de tronco (ver más adelante “consideraciones de muestreo”) que en el caso de una conífera puede ser de unos 40 cm, para después volver a cortar en laboratorio. En el caso de una especie latifoliada antes de tomar la muestra debemos saber cuánto miden sus vasos y actuar en consecuencia.

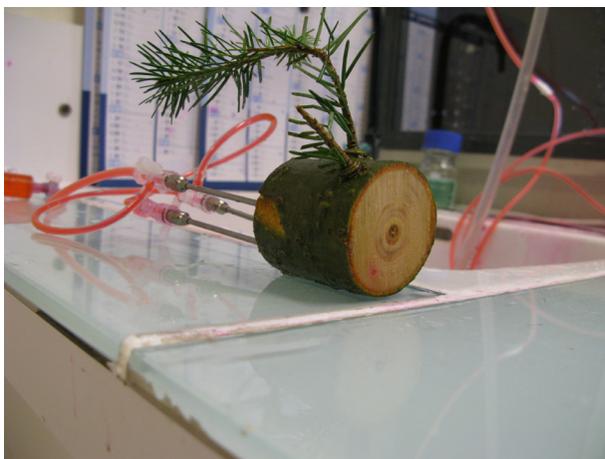
Para construir el sistema de medición se comienza por armar un conductímetro de un solo canal con pipeta graduada en su extremo inicial (figura 2). La diferencia con el sistema anterior es que colocamos en su extremo final una pequeña llave de dos vías.

Por otro lado tomamos la muestra de tronco que se trajo del campo y la volvemos a cortar de manera

de obtener un disco de aproximadamente 7 cm de largo en el caso de una conífera. Esta manipulación se realiza siempre mojando la muestra con un vaporizador o con una piseta mientras se asierra, y se coloca inmediatamente la muestra definitiva en agua, siempre manteniendo conocida la dirección normal del flujo de agua para que el flujo que se vaya a generar artificialmente sea en la misma dirección. Se eligen los anillos y las regiones en donde se quiere medir la conductividad (figura 6) y se inserta en cada sitio seleccionado (en la parte de “abajo” de la muestra) siempre agua y con la ayuda de un martillo, una aguja veterinaria metálica de



**Figura 6:** Muestra debajo del agua con las agujas veterinarias insertadas y llenas de agua.



**Figura 7:** Sistema de medición de conductividad hidráulica específica localizada en donde puede verse de qué manera llega el agua coloreada al otro lado de la muestra.

aproximadamente 2 mm de diámetro interno, la cual se rellena con agua con la ayuda de una jeringa con una aguja descartable de diámetro externo menor a 2 mm, y cuidando que no queden burbujas de aire en su interior. Las agujas deben mantenerse siempre con agua en su interior. Una vez que todas las agujas fueron insertadas y llenadas con agua, la muestra puede sacarse del agua. Se conecta una aguja a la llave de dos vías y se pone la muestra en forma horizontal para hacer la medición cuidando que las restantes agujas no se vacíen (figura 7). Una vez concluida la medición en una aguja se pasa la llave a otra aguja y se hace la medición. Es importante tener siempre las agujas que no fueron medidas aún llenas de agua con la ayuda de la jeringa y la aguja más fina. Para el cálculo de la altura de la columna de agua medir desde el centro de la pipeta hasta el centro de la aguja.

Otra opción es dotar al sistema de tantas llaves de dos y tres vías como agujas tengamos. Si son muchas las mediciones a realizar por cada muestra, esto resulta un poco complicado de instalar.

## **7. Consideraciones al coleccionar el material en el campo. Medición del largo de vasos**

Los elementos de conducción de las coníferas -las traqueidas- son de dimensiones pequeñas, por lo que no significan una dificultad a la hora de seleccionar el largo de la porción de madera a medir. Por el contrario, en el caso de las especies latifoliadas, los vasos pueden poseer múltiples dimensiones, desde muy pequeñas hasta varios metros de longitud. Esto debe tomarse en cuenta al cortar una rama, ya que en esta operación se produce un ingreso de aire al sistema conductivo. Para evitar embolismos en el segmento a medir, que alteren la medición de conductividad, es necesario cortar la rama nuevamente bajo agua descartando un trozo de rama similar a la longitud del vaso más largo. Una forma sencilla de medir el largo de los vasos se detalla en el trabajo de Brodribb y Field (2000). Estos autores describen que se debe inyectar aire a presión por la base de la rama y proceder a cortar progresivamente segmentos de pequeña longitud bajo el agua desde el extremo distal (punta de la rama). La longitud máxima del vaso se detectará cuando se observe

un burbujeo desde el extremo distal cortado. Para inyectar aire puede utilizarse una jeringa descartable o un inflador de bicicleta, ya que no es necesario generar una presión alta.

El muestreo a campo para la medición de la conductividad hidráulica requiere de algunos cuidados y consideraciones. Si se desea conocer la mínima conductividad que alcanza determinado órgano de un individuo, entonces debe muestrearse en el momento del día donde se espera la máxima tensión y por lo tanto, mayor proporción de embolismos (generalmente, al mediodía o poco después del mismo). Si en cambio, se desea conocer valores más cercanos a la máxima capacidad de conducción de agua, se aconseja tomar las muestras por la mañana temprano, un día de lluvia o nublado o cuando el suelo esté saturado de agua. Las ramas deben ser cortadas con un largo superior a la máxima longitud de los elementos de conducción, y mantenerlas humedecidas hasta el momento de la medición. En el laboratorio se recortan bajo agua a la medida requerida para la medición. Para el muestreo de troncos, es necesario llevar agua hasta el árbol que se va a cortar. El árbol se voltea lo más abajo posible y se le echa agua una vez cortado. Rápidamente se corta el tramo de tronco necesario siempre mojando en el lugar donde se haga el corte, e inmediatamente se pone la muestra en un recipiente lleno de agua. Recordar de marcar la dirección del flujo de agua en cada muestra para después medir en esa dirección. Las muestras pueden mantenerse húmedas por algunos días en cámara de frío.

## **8. Conductancia hidráulica en sistemas radicales**

La conductancia hidráulica de las raíces (generalmente denominado  $Lp$ ) se obtiene al dividir el flujo de agua ( $m^3 s^{-1}$ ) por unidad de potencial aplicado (MPa) mediante una cámara de presión. Para lograr esto, se lava el sistema radical de una planta y se coloca en una vasija de vidrio con agua dentro de la cámara de presión dejando salir por la perforación de la tapa el tallo de la planta (ej. Wan y Zwiazek, 1999). Otros trabajos introducen directamente la maceta conteniendo el sustrato y las raíces, ro-

deadas de una bolsa de nylon para prevenir pérdidas de agua (por ejemplo, Nardini *et al.*, 1998). De esta manera, al aplicarse una determinada presión en la cámara se observará salir el agua por el extremo seccionado del tallo. Es importante determinar los valores de potencial en los cuales se mantiene una relación lineal con el flujo. Así, es posible determinar  $L_r$  como la pendiente de dicha relación. Luego, el valor de  $L_r$  es llevado a conductancia hidráulica específica de raíces (generalmente  $L_{pr}$ ) dividiendo dicho valor por la superficie de raíces determinada mediante el uso de imágenes. También es posible de normalizar el valor de  $L_r$  por el total del área foliar.

Otro método para la estimación de conductividad hidráulica en raíces empleando una bomba de vacío es el se describe en North *et al.* (1992), y North y Nobel (1994).

## 9. Conductancia hidráulica en hojas

### 9.1. Conductancia a nivel de hoja ( $K_{hoja}$ )

Dado que la resistencia (o inversa de la conductancia) del sistema de tallo + hoja son aditivos, es posible calcular la conductancia de una hoja como la diferencia de resistencia de un tallo con y sin hojas. Tyree *et al.* (1999b) utilizaron esta aproximación midiendo el flujo de savia en dichos sistemas mediante el medidor de flujo de alta presión (ver más adelante) detallado en Tyree *et al.* (1993). Una aproximación similar puede observarse en el trabajo de Sack *et al.* (2002), en donde separan las resistencias parciales del pecíolo y la lámina de la hoja.

Otra manera de calcular  $K_{hoja}$  es la descrita en Brodribb y Holbrook (2003). Para ello, se debe cortar una rama, dejar que se equilibre el potencial hídrico de todas las hojas manteniéndolas en bolsas y oscuridad y luego medir el potencial hídrico de las hojas antes y después de su hidratación. El tiempo de hidratación en general es de sólo algunos segundos, pero es fuertemente dependiente de la especie. El potencial de la hoja se determina con una cámara de presión. Se procede de la siguiente manera: se mide el potencial hídrico de una hoja de la rama, luego se toma otra hoja de la misma rama ubicada lo más próxima posible a la primera (se supone que ambas poseen el mismo potencial hídrico), y se la rehidrata en un recipiente con agua destilada, cuidando de que el agua solo moje el pecíolo y no la lámina. Luego de un tiempo de rehidra-

tación determinado, se debe envolver la hoja nuevamente en plástico y medir su potencial hídrico. De esta manera:

$$K_{hoja} = \frac{C \ln\left(\frac{\Psi_0}{\Psi_d}\right)}{t} \text{ [mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}]$$

en donde  $C$  es la capacitancia de la hoja (calculada a partir de las curvas presión-volumen, Capítulo 6),  $\Psi_0$  y  $\Psi_d$  representan el potencial hídrico de la hoja antes y después de la rehidratación, y  $t$  es el tiempo de hidratación. Un mayor detalle de esta técnica se encuentra en el Capítulo 5 sobre vulnerabilidad a la cavitación (apartado 5.3).

### 9.2. Conductancia de la lámina

En el caso de la lámina, Sack *et al.* (2002) mencionan que, al no poder determinar la longitud del sistema conductivo al tratarse de una red, se calcula un valor de conductancia (y no de conductividad). La estimación de la conductancia se puede realizar mediante tres técnicas: método de alta presión, de flujo evaporativo y de bomba de vacío. Estos métodos se detallan en el próximo apartado de este mismo capítulo. Estos autores detallan que en promedio, los resultados arrojados por los tres métodos varían entre sí en un 10%.

### 9.3. Conductividad del pecíolo

En aquellas especies que poseen un pecíolo evidente es posible medir su conductividad utilizando el sistema descrito en el punto de conductímetros de una muestra por vez (Sperry *et al.*, 1988). Así, Tsuda y Tyree (1997) determinaron la conductividad hidráulica de pecíolos de *Acer saccharinum*, cortando bajo agua los pecíolos y conectándolos al medidor de flujo descrito.

## 10. Otros métodos para medir conductividad hidráulica

### 10.1. Medidor de flujo de alta presión (HPFM)

El método de medición de alta presión (high-pressure flowmeter o HPFM, Tyree *et al.*, 1993) es ampliamente utilizado y permite medir el flujo de agua

mientras la misma perfunde dentro del tallo o tejido. El flujo es proporcional al cambio de presión dentro de un capilar, el cual es registrado mediante dos manómetros. Esta proporcionalidad deberá ser establecida midiendo el flujo por algún método tradicional. La diferencia de potencial necesaria para calcular la conductividad se genera mediante inyección de aire a presión al sistema. En el caso del trabajo mencionado, los autores midieron la resistencia hidráulica parcial de los distintos segmentos de la rama: lámina y pecíolo de la hoja, tallo de 1 año, de 2 años, etc. Para ello, conectaron una rama por su extremo basal al sistema de HPFM y profundieron agua a una presión de 0,2 MPa. Posteriormente, calcularon la resistencia parcial de cada segmento midiendo inicialmente una resistencia total de la rama, y posteriormente, midiendo la conductividad al quitar cada segmento de manera paulatina. Diversos autores mencionan dos tipos de medición: el método de estado de equilibrio (steady) y transitorio (transient) (Tyree *et al.*, 1999b; Sack *et al.*, 2002). En el primero, la conductancia se calcula a partir del flujo medido a una determinada presión. En el segundo, la conductancia se calcula como la pendiente entre los pares apareados de flujo y presión.

### 10.2. Método de flujo evaporativo

Este método consiste en colocar una hoja en un ambiente con una atmósfera demandante conectada a un reservorio de agua colocado en una balanza de precisión (Sack *et al.*, 2002). Así, la conductancia de la lámina se calcula como el flujo de agua dividido el potencial agua de la hoja. En este método, debe utilizarse un sistema de iluminación ya que la conductancia estomática de la hoja puede variar en respuesta a la radiación recibida. El potencial de la hoja se mide una vez alcanzado un flujo constante, mediante una cámara de presión.

### 10.3. Medidor de conductividad mediante la utilización de cámaras de vacío

Este método utiliza el vacío como fuente de diferencial de potencial entre los extremos del tallo o raíces a medir (vacuum pump method o VPM, Kolb *et al.*, 1996), de esta manera, es posible

mejorar las mediciones de muestras con muy baja conductividad o de ramas con muchas ramificaciones. En éste último caso, es posible alojar la rama completa en una cámara a la cual se aplica vacío. Se realizan lecturas de flujo por determinados intervalos de tiempo y a diferentes niveles de presiones, en general desde la presión atmosférica (=100kPa) hasta 20 kPa por encima del vacío. Por último, como ya mencionamos, la conductividad del tejido se determina como la pendiente entre el flujo de agua y los potenciales generados.

## 11. Bibliografía

- Beikircher B y S Mayr (2008) The hydraulic architecture of *Juniperus communis* L. ssp. *communis*: shrubs and trees compared. *Plant Cell Environ.* 31: 1545-1556.
- Brodribb T J y T S Field (2000) Stem hydraulic supply is linked to leaf photosynthetic capacity: evidence from New Caledonian and Tasmanian rainforests. *Plant Cell Environ.* 23: 1381-1388.
- Brodribb T J y N M Holbrook (2003) Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. *Plant Physiol.* 132: 2166-2173.
- Canham C A, R H Froend y W D Stock (2009) Water stress vulnerability of four *Banksia* species in contrasting ecohydrological habitats on the Gnarangara Mound, Western Australia. *Plant Cell Environ.* 32: 64-72.
- Cruziat P, H Cochard y T Améglio (2002) Hydraulic architecture of trees: main concepts and results. *Ann. For. Sci.* 59: 723-752.
- Dalla Salda G, A Martinez Meier, H Cochard y P Rozenberg (2009) Variation of wood density and hydraulic properties of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) clones related to a heat and drought wave in France. *For. Ecol. Manage.* 257: 182-189.
- Donovan L A, D J Grise , J B West , R A Pappert, N N Alder y J H Richards (1999) Predawn disequilibrium between plant and soil water potentials in two cold-desert shrubs. *Oecologia.* 120: 209-217.
- Edwards W R N y P G Jarvis (1982) Relations between water content, potential and permeability in stems of conifers. *Plant Cell Environ.* 5: 271-277.
- Eguchi N, N Morii, T Ueda, R Funada, K Takagi, T Hiura, K Sasa y T Koike (2008) Changes in petiole hydraulic properties and leaf water flow in birch and oak saplings in a CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere. *Tree Physiol.* 28: 287-295.
- Harvey H P y R Van den Driessche (1997) Nutrition,

- xylem cavitation and drought resistance in hybrid poplar. *Tree Physiol.* 17: 647-654.
- Hubbard R M, M G Ryan, V Stiller y J S Sperry (2001) Stomatal conductance and photosynthesis vary linearly with plant hydraulic conductance in ponderosa pine. *Plant Cell Environ.* 24: 113-121.
- Hunt E R Jr, S W Running y C A Federer (1991) Extrapolating plant water flow resistances and capacitances to regional scales. *Agric. For. Meteorol.* 54: 169-195.
- Kolb K J, J S Sperry y B B Lamont (1996) A method for measuring xylem hydraulic conductance and embolism in entire root and shoot systems. *J Exp. Bot.* 47: 1805-1810.
- Li Y, J S Sperry, H Taneda, S E Bush y U G Hacke (2008). Evaluation of centrifugal methods for measuring xylem cavitation in conifers, diffuse- and ring-porous angiosperms. *New Phytol.* 177: 558-568.
- Lovisol C, I Perrone, W Hartung y A Schubert (2008) An abscisic acid-related reduced transpiration promotes gradual embolism repair when grapevines are rehydrated after drought. *New Phytol.* 180: 642-651.
- Meinzer F C, P I Campanello, J C Domec, M G Gatti, G Goldstein, R Villalobos-Vega y D R Woodruff (2008) Constraints on physiological function associated with branch architecture and wood density in tropical forest trees. *Tree Physiol.* 28: 1609-1617.
- Nardini A, M A Lo Gullo y S Salleo (1998) Seasonal changes of root hydraulic conductance (*K<sub>RL</sub>*) in four forest trees: an ecological interpretation. *Plant Ecol.* 139: 81-90.
- North G B, F W Ewers y P S Nobel (1992) Main root-lateral root junction of two desert succulents: changes in axial and radial components of hydraulic conductivity during drying. *Am. J. Bot.* 79: 1039-1050.
- North G B y P S Nobel (1994) Changes in root hydraulic conductivity for two tropical epiphytic cacti as soil moisture varies. *Am. J. Bot.* 81: 46-53.
- Pammenter N W y C Van der Willigen (1998) A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiol.* 18: 589-593.
- Sack L, P J Melcher, M A Zwieniecki y N M Holbrook (2002) The hydraulic conductance of the angiosperm leaf lamina: a comparison of three measurement methods. *J. Exp. Bot.* 53: 2177-2184.
- Sperry J S, J Rdonnelly y M T Tyree (1988). A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant Cell Environ.* 11: 35-40.
- Sperry J S, K L Nichols, J E M Sullivan y S E Eastlack (1994). Xylem embolism in ring-porous, diffuse-porous, and coniferous trees of Northern Utah and Interior Alaska. *Ecology.* 75: 1736-1752.
- Spicer R y B L Gartner (1998) How does a gymnosperm branch (*Pseudotsuga menziesii*) assume the hydraulic status of a main stem when it takes over as leader? *Plant Cell Environ.* 21: 1063-1070.
- Spicer R y B L Gartner (2002) Compression wood has little impact on the water relations of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedlings despite a large effect on shoot hydraulic properties. *New Phytol.* 154: 633-640.
- Taneda H y J S Sperry (2008) A case-study of water transport in co-occurring ring- versus diffuse-porous trees: contrasts in water-status, conducting capacity, cavitation and vessel refilling. *Tree Physiol.* 28: 1641-1651.
- Tsuda M y M T Tyree (1997) Whole plan hydraulic resistance and vulnerability segmentation in *Acer saccharinum*. *Tree Physiol.* 17: 351-357.
- Tyree M T, B Sinclair, P Lu y A Granier (1993) Whole shoot hydraulic resistance in *Quercus* species measured with a new high-pressure flowmeter. *Ann. For. Sci.* 50: 417-423.
- Tyree M T, S Salleo, A Nardini, M A Lo Gullo y R Mosca (1999a) Refilling of embolized vessels in young stems of laurel. Do we need a new paradigm? *Plant Physiol.* 120: 1-22.
- Tyree M T, M A Sobrado, L J Stratton y P Becker (1999b) Diversity of hydraulic conductance in leaves of temperate and tropical species: possible causes and consequences. *Trop. For. Sci.* 11: 47-60.
- Vogt U K (2001) Hydraulic vulnerability, vessel refilling, and seasonal courses of stem water potential of *Sorbus aucuparia L.* and *Sambucus nigra L.* *J. Exp. Bot.* 52: 1527-1536.
- Wan X y J J Zwiazek (1999) Mercuric chloride effects on root water transport in Aspen seedlings. *Plant Physiol.* 121: 939-946.
- Zwieniecki M A, P J Melcher y M N Holbrook (2001) Hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants. *Science* 291: 1059-1062.

**Anexo 1. Lista de los componentes necesarios para armar un conductímetro multicanal.**

<b>Cantidad</b>	<b>Descripción</b>	<b>Imagen</b>
1	CURVA 90° RMH ½"	
12	TE ROSCA CENTRAL H ½" ó TE ROSCA CENTRAL METALICA ½" (más cara pero mejor)	
1 metro	CAÑO FUSIÓN ½"	
12	RACORDS ½"	
1	CODO 90° FUSIÓN ½"	
1	INSERTO ROSCA ½" ó INSERTO ROSCA METÁLICA ½" (más cara pero mejor)	
1	ENCHUFE O ESPIGA RM DE ½"	
1	LLAVE DE PASO ESFÉRICA ½"	

## Anexo 2. Construcción del perfusionador de alta presión para eliminación de embolismos iniciales

Para la construcción los materiales a emplear son los siguientes:

- tubo de PVC de unos 11-13 cm de  $\varnothing$  y aproximadamente unos 60 cm de longitud.
- dos tapas de PVC correspondientes al diámetro del tubo a utilizar.
- dos llaves de paso, una para conexión de gas y una para conexión de agua, preferentemente de 1/2 pulgada. Dichas llaves de paso servirán para independizar los sistemas de conducción de CO<sub>2</sub> o N<sub>2</sub> (sistema generador de presión) del de conducción de agua.
- una manguera de conexión que irá entre la llave de paso de gas y el tubo de gas (CO<sub>2</sub> o N<sub>2</sub>, como por ejemplo un extinguidor o carga de auxilio para neumáticos). Se aconseja que la manguera posea algún tipo de entramado.
- dos roscas plásticas para tanque de agua iguales o menores al diámetro del tubo de PVC a utilizar.
- un manómetro de presión de agua, preferiblemente de aceite (ver figura A).
- 2 T de 1/2 pulgada hembra.
- un codo de 1/2 pulgada hembra-macho con tapón.
- una cámara de pelota de fútbol N°5 a la cual debe desmontársele el tapón de goma de conexión
- para inflarla (entrada para el pico del inflador).
- dos picos de gas que permitan la conexión de la cámara de pelota a niples.
- niples para la unión a través de las tapas de PVC de las siguientes partes: llave de paso de gas a cámara de pelota, codo de 1/2 al interior del tubo de PVC, interior del tubo a llave de paso de 1/2 para líquidos.
- pegamento para PVC.
- entre roscas de 1/2".
- sellador adhesivo de siliconas (por ejemplo, Fastix®).

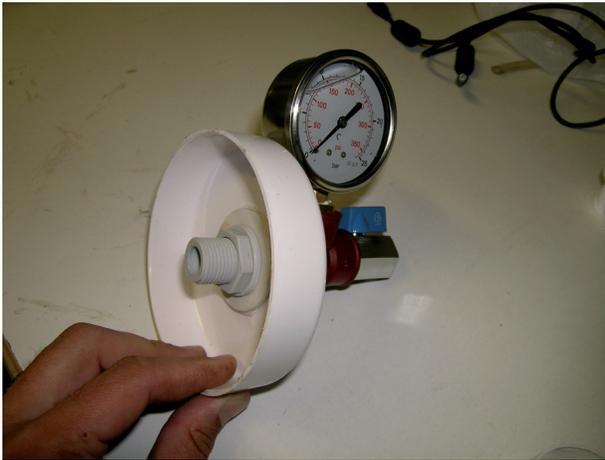
Para el armado del perfusionador los pasos a seguir son los siguientes:

1) Lijar los extremos del tubo de PVC de forma tal que luego, al adosarle las tapas, el pegamento de PVC pegue adecuadamente las tapas al tubo. La misma acción debe realizársele a la porción interior de las tapas de PVC que harán contacto con el tubo. El pegado de las tapas es el último paso a realizar en la confección del perfusionador.

2) Sobre una de las tapas de PVC realizar (mediante la utilización de una mecha copa y taladro) un orificio tal que permita la inserción del niple roscado de 1/2" de la conexión de la rosca para tanque de agua. Mediante esta acción una de las tapas poseerá ahora una conexión desde el interior al exterior del tubo de PVC. Sobre la cara externa de la rosca de tanque adosar, mediante el uso de las entre-roscas, la llave de paso de gas. La llave de paso deberá poseer en el extremo opuesto al de la tapa de PVC un acople tal que permita la colocación de una manguera que la una al tanque de gas a utilizar. El mismo tipo de reducción o acople deberá ser utilizado para conectar el lado interior (cara interna de la tapa de PVC) a la cámara de pelota. A esta última, como se mencionó anteriormente, debe extraérsele el tapón de goma donde se conecta habitualmente el pico del inflador. Esta acción permite que la cámara de pelota pueda inflarse mediante la apertura de la llave de paso de gas y la llave de apertura del tanque de gas, que al cerrarse las llaves de paso la cámara mantenga presión y que al abrirse las llaves de paso, la cámara pierda el gas que contenía (ver figuras A y B). Sobre la misma tapa se realiza una nueva perforación y se adosa el codo de 1/2" mediante el uso de niples y entre-roscas. Este codo más su correspondiente tapón servirán de purgue al sistema.

De esta forma queda armado el circuito de gas (sistema perfusionador propiamente dicho).

3) Realizar la misma acción sobre la restante tapa de PVC, adosando la rosca de tanque de agua y, mediante el uso de niples y entre-roscas, la T de 1/2". Sobre la rosca de la T ubicada perpendicularmente a la tapa de PVC, colocar el manómetro de aceite (ver figura B). Sobre la restante rosca hembra de la T, unir la llave de paso de 1/2" (para líquidos) mediante la utilización de un niple de 1/2". De esta forma queda armado el sistema de conducción de agua hacia la porción de madera o tallo utilizado.



**Figura A:** Manómetro de aceite que permite la lectura de la presión ejercida desde el tubo de gas. Detalle de la conexión a la tapa y al tubo de PVC.



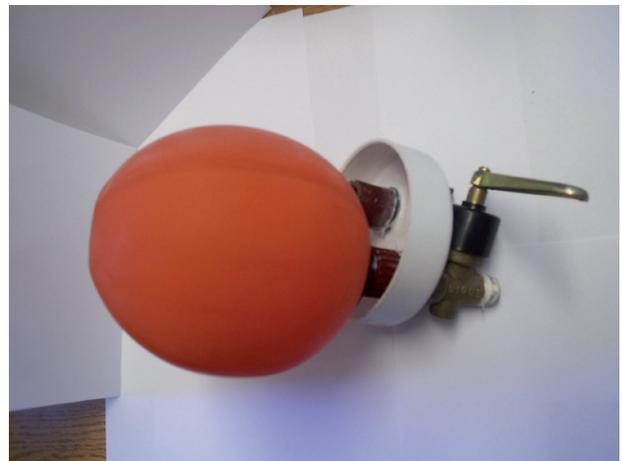
**Figura B:** Fotografía mostrando la conexión de la llave de paso a la tapa de PVC y la conexión de dicha llave de paso a la cámara de pelota, permitiéndose el inflado y desinflado de esta última.

#### 4) Posteriormente, pegar las tapas al tubo de PVC y deje secar al menos 24 horas.

Al día siguiente, repasar mediante el uso de pegamento del tipo *Fastix* todo el borde de la unión entre el tubo de PVC y sus tapas. Esta acción evita la posterior pérdida de agua del sistema.

5) La acción restante consiste en conectar el tanque de gas a utilizar, mediante la utilización

de la manguera, a la llave de paso de gas (figura C), así como conectar la salida de la T de  $\frac{1}{2}$ "', mediante la utilización de otra manguera de  $\frac{1}{2}$ "', a la porción de madera o tallo utilizado o bien a la conexión correspondiente en caso de realizarse la unión entre este sistema y el de confección de curvas de vulnerabilidad a la cavitación (ver figura D). De esta forma el sistema quedará completo para su utilización.



**Figura C:** Fotografía mostrando la conexión entre el tubo de gas de CO<sub>2</sub> y la llave de paso de gas del perfusionador.



**Figura D:** Fotografía mostrando la conexión completa del perfusionador al tanque de gas y (particularmente en este caso) al sistema de confección de curvas de vulnerabilidad a la cavitación.

## CAPÍTULO 5

# CURVAS DE VULNERABILIDAD A LA CAVITACIÓN

**Autores:** Javier Gyenge <sup>(1,2)</sup>,  
Guillermina Dalla Salda <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

<sup>(2)</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Bariloche.

### 1. Introducción

El xilema de las especies leñosas posee características particulares, tal como ser un sistema integrado, compartimentado y redundante (Cruziat *et al.*, 2002). Es decir, el xilema es una red compuesta por compartimentos que cumplen la misma función conectados entre sí a través de poros. Así, ante la pérdida de funcionalidad de algunos de los conductos (traqueidas o vasos) el sistema puede seguir alimentando a las hojas con agua extraída del suelo. Esta pérdida de conductividad se da generalmente por la presencia de un embolismo, el cual consiste en el bloqueo del flujo de agua por aire. Uno de los fenómenos más frecuentes por los que se producen embolismos es la cavitación, que se define como la formación de cavidades (burbujas) de vapor de agua o aire en el seno de un líquido sujeto a tensión (presión negativa). Esto ocurre generalmente bajo condiciones de estrés hídrico. Sin embargo, también se pueden producir embolismos por procesos de congelamiento-descongelamiento, que llevan a la formación de burbujas por la no redisolución del aire en el agua (sin que esté bajo tensión), o por algún daño mecánico. A veces los embolismos pueden ser reparados por la misma planta (por ej. Salleo *et al.*, 1996 y más recientemente Zwieniecki y Holbrook, 2009).

Sin adentrarnos profundamente en la física de la formación y estabilidad de una burbuja de aire y vapor (mayor detalle en Cruziat *et al.*, 2002; Tyree y Zimmerman, 2002), para que la misma sea estable, debe cumplirse la siguiente igualdad:

$$\bar{P}_v - \bar{P}_w = \frac{2t}{r}$$

donde  $\bar{P}$  es la presión del interior de la burbuja ( $v$ ) y del agua ( $w$ ),  $r$  el radio de la burbuja y  $t$  la tensión superficial del agua. En general, la burbuja posee vapor de agua u aire, por lo que su presión es positiva. En el caso del vacío, siguiendo la ecuación de la ley de gases ideales, la presión y el volumen de la burbuja son inversamente proporcionales. Por lo tanto, la estabilidad de las burbujas en el xilema dependerá del grado de tensión del agua en la misma. Como mencionamos, el xilema es un conjunto de unidades, por lo tanto, para que el embolismo avance de un conducto a otro, la burbuja debe migrar a través de los poros. Así, el diámetro del poro determinará el potencial mínimo del xilema que permitirá la migración de un conducto a otro del embolismo. Según Tyree y Zimmerman (2002), el potencial mínimo de estabilidad de la burbuja será de -1,44 ó -2,88 MPa para poros de 0,1 a 0,05  $\mu\text{m}$ , por ejemplo. Así, existiría un compromiso entre el diámetro del poro que incrementaría la conductividad versus el que impediría la embolización masiva del tejido. Esta interacción, así como los procesos de resistencia a la cavitación, están sujetas aún a una fuerte discusión (por ejemplo, Wheeler *et al.*, 2005; Domec *et al.*, 2006; Sperry *et al.* 2006, 2008; Cochard *et al.*, 2009, 2010).

### 2. Definición de curva de vulnerabilidad a la cavitación

Una curva de vulnerabilidad a la cavitación es un gráfico en donde se muestra la relación entre la pérdida porcentual de conductividad hidráulica (*PCH* o percent loss of conductivity *PLC*) de un segmento y el estrés hídrico medido como presión o potencial hídrico. En general, dicha relación puede representarse mediante distintos modelos matemáticos: polinomiales, tipo Weibull, Gompertz o exponencial sigmoidea. En algunos de dichos casos, los parámetros de la curva no poseen un significado biológico. En este sentido, Pammenter y Vander Willigen (1998), analizaron el siguiente modelo exponencial:

$$PLC = \frac{100}{(1 + \exp(a(\psi - b)))}$$

donde  $\Psi$  es el potencial hídrico del agua,  $a$  y  $b$  son constantes y representan el grado de curvatura de la curva y la posición de la curva en la abscisa, respectivamente (figura 1). Así, mientras más alto es el valor de  $a$ , más rápido será el pasaje del 0 al 100% de PCH. Por otro lado, a medida que el valor de  $b$  es menor (más negativo), menor será la PCH a igual valor de potencial hídrico.

Además de los parámetros de forma de la curva, es posible calcular el punto de entrada de aire ( $\Psi_e$ ). Este se define como el potencial por debajo del cual la conductividad decrece rápidamente por el incremento de la cavitación de su sistema conductivo (Sparks y Black, 1999; Domec y Gartner, 2001). Si se utilizó el modelo de Pammenter y Vander Willigen (1998),  $\Psi_e$  se calcula como:

$$\Psi_e = -\frac{2}{a} + b$$

En caso contrario, se deberá re-arreglar y resolver la ecuación utilizada para describir la curva de cavitación para un valor de PCH

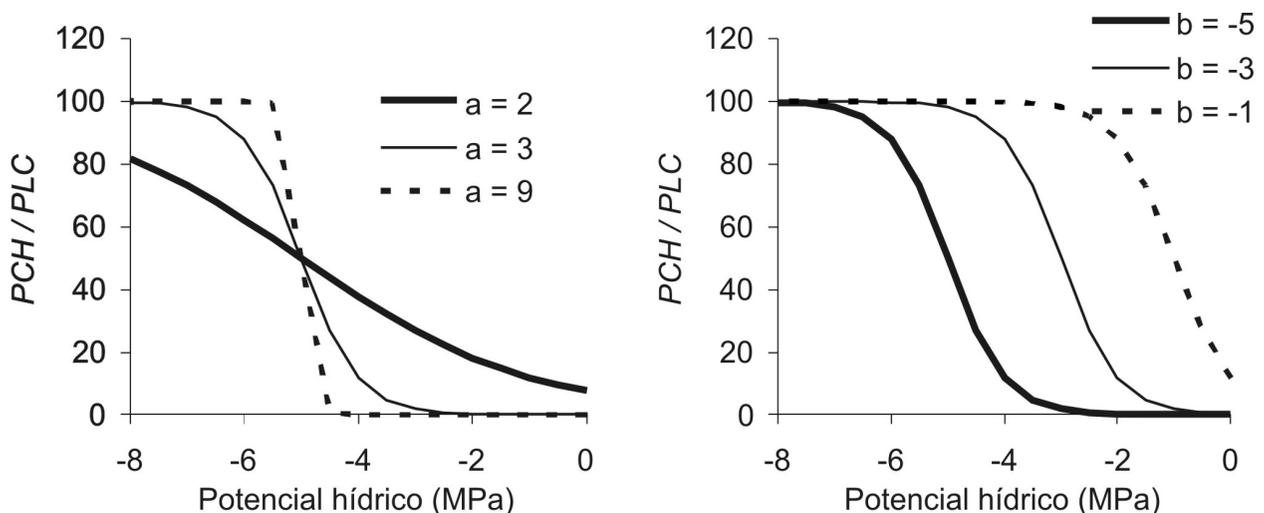
mínimo (o de máxima conductividad). De manera similar, el punto de máxima cavitación ( $\Psi_{max}$ ) se calcula como: el % de pérdida de conductividad en relación al cambio tencial, es estimada como:

$$\Psi_{max} = -\frac{2}{a} + b$$

Por otra parte, la pendiente de la parte lineal de la curva ( $s$ ) que representa el % de pérdida de conductividad en relación al cambio del potencial, es estimada como:

$$S = a \frac{100}{4}$$

Finalmente, en términos generales, cuando el objetivo es determinar la susceptibilidad a la cavitación entre distintas especies y órganos de un individuo, se compara el parámetro  $b$ . En el caso particular del modelo analizado, dicho parámetro se corresponde con el 50% de cavitación. Sin embargo, también es posible comparar otros puntos, como por ejemplo  $\Psi_{max}$  y  $\Psi_e$ , los que se corresponden con el 88 y 12% de PCH (por ej. Domec y Garner, 2001)



**Figura 1:** Distintas relaciones entre la pérdida porcentual de conductividad hidráulica (PCH, o en inglés PLC) en relación al potencial hídrico utilizando la ecuación exponencial sigmoidea descrita por Pammenter y Vander Willigen (1998). En las primeras tres curvas se mantiene constante el grado de curvatura de la curva ( $b$ ) y varía la posición de la curva en la abscisa ( $a$ ), y en las otras tres curvas se mantiene constante  $a$  y varía  $b$ .

### 3. Construcción de una curva de vulnerabilidad a la cavitación

#### 3.1. Cálculo de la pérdida porcentual de conductividad hidráulica (PCH)

Como se mencionó, es necesario poder medir la conductividad hidráulica de la madera, aspecto desarrollado en amplitud en el capítulo 4 de este libro. Como la técnica necesita comenzar con la medición de una conductividad máxima, en un primer momento deberemos quitar los embolismos mediante la perfusión de agua a alta presión (también explicado en el capítulo 4). De esta manera, podremos calcular la PCH para cada valor de potencial hídrico aplicando la siguiente ecuación:

$$PCH = 100 \frac{(k_{\max} - k)}{k_{\max}}$$

siendo  $k_{\max}$  la conductividad hidráulica máxima. En este sentido, si la técnica nos permite medir la conductividad del mismo trozo de madera, usaremos la conductividad hidráulica ( $k$  o  $kh$ ), mientras que deberemos calcular la conductividad hidráulica específica ( $k_s$ ) en el caso de utilizar distintos segmentos:

$$k = \frac{Ql}{\Delta P} \quad k_s = \frac{Ql}{A_s \Delta P}$$

donde  $Q$  es el flujo (volumen de agua por unidad de tiempo),  $l$  es la longitud del segmento,  $\Delta P$  es la diferencia de potencial entre los extremos del segmento medido y  $A_s$  la sección transversal del segmento conductivo (superficie de xilema activo).

#### 3.2. Cálculo de conductividad máxima ( $k_{\max}$ )

La determinación de  $k_{\max}$  puede lograrse utilizando material que sospechamos, dado nuestro conocimiento, que no posee cavitaciones al momento de cosechar el material o mediante perfusión. Por ejemplo, Cochard *et al.* (1992) utilizó ramas de sauce a las cuales, luego de la cosecha inicial a campo, elimina su porción proximal cortándolo nuevamente bajo el agua. Luego, dejó la rama en agua durante más de 1 hora para que se hidrate. Como un consejo práctico, es bueno asegurarse que la porción de rama que va a ser

medida no flote antes de comenzar a realizar la curva de vulnerabilidad. En el caso de la perfusión, no existe un protocolo que indique una determinada presión (generalmente se utilizan valores de entre 0,1 a 1MPa dependiendo el tejido y la especie). Algunos autores utilizan una solución con ácido oxálico ( $10 \text{ mol m}^{-3}$ ) para realizar la perfusión. Así, el investigador deberá evaluar los tiempos y presiones necesarias para poder arribar a una  $k_{\max}$  para su especie. Hay reportes de disminución de  $k_{\max}$  por fatiga del tejido, pues la perfusión puede dejar pequeñas micro burbujas que pueden nuclear la cavitación durante episodios de estrés subsecuentes (Hacke *et al.*, 2001).

#### 3.3. Medición en segmentos simples o apareados

Segmentos simples: la medición de conductividad se realiza en un mismo segmento de rama en el cual se ha determinado el potencial hídrico (ver métodos de generación de embolismos). Posteriormente a la medición de  $k$ , se quitan los embolismos mediante perfusión, obteniéndose así los valores de  $k_{\max}$ . De esta manera, se obtiene el total de embolismos en un mismo segmento de tallo (Sperry y Tyree, 1990; Sperry y Sullivan, 1992)

Segmentos apareados: la determinación de  $k_{\max}$  y las  $k$  sucesivas se realizan en distintos segmentos de un mismo tallo o rama. La  $k_{\max}$  se mide en primera instancia en un trozo de tallo y luego se somete a tensión/presión progresiva al resto del órgano medido (Sperry y Tyree, 1990; Sperry y Sullivan, 1992). Debido a que la  $kh$  varía con el diámetro del segmento, es importante que todos los segmentos/ramas que se utilizan para la construcción de una misma curva posean diámetros similares.

#### 3.4. Métodos de generación de embolismos

##### 3.4.1 Método de deshidratación natural

Luego de hidratar la rama, tal como mencionamos anteriormente, se la deberá dejar deshidratar al aire libre para que disminuya su potencial hídrico por transpiración del agua. Dicho tiempo de deshidratación deberá evaluarse dependiendo de la tasa de pérdida de agua y la vulnerabilidad de la especie. Una vez determinado el tiempo, la rama

deberá envolverse en una bolsa negra sellada para evitar que continúe la deshidratación y se equilibre el potencial del agua del xilema con el de la hoja o extremo del tallo. El tiempo en que la rama deberá dejarse en dicha situación también deberá de ser evaluado. Posteriormente, se medirá el potencial hídrico de una hoja para establecer dicho parámetro mediante una cámara de presión del tipo Scholander.

El trozo de rama en el que se medirá la conductividad hidráulica se deberá cortar bajo agua descartando una porción del extremo basal, pues se considera que podría tener cierto embolismo preexistente.

Los resultados arrojados por este método fueron similares a aquellos obtenidos por los métodos de inyección de aire, siendo estos últimos, más rápidos de realizar (Cochard *et al.*, 1992). Si bien este método es sencillo y necesita poco equipamiento, tiene la desventaja de ser muy costoso en términos de tiempo. Asimismo, es adecuado para especies coníferas (con traqueidas) o latifoliadas de vasos cortos, pero su uso se imposibilita, tal como se ha descrito, para sistemas con vasos largos. Esto es debido a que cada segmento de rama puede ser menor al largo mayor de vasos generando un conducto con una resistencia aparente mucho menor a la real, por lo que la medida de  $k$  se sobre estima. En estos casos, y si no se dispone de otro tipo de equipamientos como los que se describen en próximos apartados, se deberá trabajar con una rama completa por punto de la curva de cavitación. Este método en general arroja resultados con bastante dispersión.

#### 3.4.2. Método de inyección de aire

Este método es uno de los más utilizados, con numerosas variantes. Básicamente el método implica desplazar el agua xilemática por aire inyectado a presión. Sin llegar a mostrar la lista completa de métodos, comenzaremos por los métodos más antiguos hasta arribar a los más modernos.

##### 3.4.2.1. Deshidratación por presión positiva

Para llevar adelante el método de deshidratación, se utiliza una bomba de presión que estimula la pérdida de agua desde los conductos del xilema mediante la misma presión positiva. El método se basa en alcanzar un equilibrio entre la presión de la cámara, impuesta y conocida por el investigador, y la tensión dentro de la rama. Así, por

ejemplo, se somete una rama que está originalmente a  $-0,3$  MPa a una presión de  $-0,8$  MPa. La rama irá perdiendo savia por su extremo hasta el punto en el que alcanza los  $-0,8$  MPa. Este es el valor del eje de abscisas al que se le hace corresponder un determinado valor de  $k_h$  medido posteriormente en el segmento involucrado. Para construir la curva, se somete a distintas presiones de equilibrio a distintos segmentos de rama. En el trabajo de Sperry y Tyree (1990), los autores insertaron unos 8 cm de un tallo de 30 cm de longitud total dentro de una cámara de presión. Luego, la medición de  $k$  se realizó en los últimos 6 cm de tallo que estaban dentro de la cámara, descartando el primer cm, logrando un segmento final de 5 cm de largo. El extremo que estaba fuera de la cámara fue cubierto con un pequeño depósito con agua y papel, mientras que todo el segmento fue envuelto con papel húmedo y plástico para minimizar la evaporación. El segmento en el que se midió  $k$  fue cortado bajo agua y dejado en agua toda la noche para equilibrar las presiones dentro de los vasos. En Cochard *et al.* (1992) se utilizó una técnica similar, pero introduciendo una rama completa y dejando salir de la cámara el extremo basal de la misma. La rama fue deshidratada mediante el incremento de presión en la cámara a una tasa menor a  $5 \text{ kPa s}^{-1}$ , descomprimiendo la misma a  $<2 \text{ kPa s}^{-1}$ . Una vez que dejó de fluir savia por el extremo de la rama, debido a que la presión del agua interna igualó a la de la cámara, se quitó la presión y se dejó la rama toda la noche en una bolsa negra para equilibrar el potencial. En el trabajo de Sperry y Tyree (1990) se compara el método de inducir embolismos por deshidratación e inyección de aire (ver a continuación), arrojando similares resultados.

##### 3.4.2.2. Presión

Otra técnica descrita en Cochard *et al.* (1992) consistió en aprovechar la flexibilidad de las ramas del último año de *Salix alba* y *Populus deltoides* para introducir una rama completa pero dejando fuera de la cámara ambos extremos (figura 2A). En un principio, las ramas fueron puestas a hidratar durante toda la noche previa a las mediciones (ver cálculo de  $k_{max}$ ). El extremo basal de la rama fue conectado a un columna de agua de 1,65 m de altura con un diámetro suficiente como para no obstruir el pasaje de las burbujas de aire que salen del tallo. El flujo de agua se calcula gravimétricamente a partir de la pesada, antes y después, de un algodón seco colocado en un envase puesto en

el extremo distal de la rama. Al momento de quitar la presión, los autores colocaron un pequeño depósito de agua en el extremo distal para que la rama se hidrate sin generar tensiones internas. La descompresión también se realizó a una tasa baja (<2 kPa s<sup>-1</sup>). La primera medición de flujo se realiza a presión atmosférica, midiendo a posteriori de cada paso de administración de presión.

### 3.4.2.3. Presión de collar o cámara de doble entrada (figura 2B).

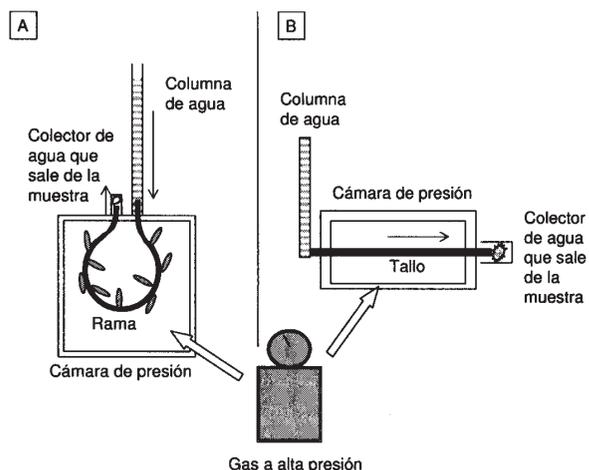
Esta técnica es una de las más utilizadas, una descripción básica de la misma se encuentra en los trabajos de Salleo *et al.* (1992); Sperry y Saliendra (1994). Estos autores diseñaron una cámara de doble salida por donde poder sacar los extremos de un tallo, rama o raíz. Esta cámara se conecta a un dispositivo de control de presión de gas para poder medir la presión del mismo. Así, el extremo basal se conecta a un depósito de agua (como los descritos en el capítulo 4) mientras que en el distal se mide la cantidad de agua que fluye a través del segmento de madera. Este método puede utilizarse para generar embolismos tanto en el campo como en laboratorio, dependiendo del tipo de cierre de la cámara.

Si bien no existe un protocolo de trabajo universal, tanto Kavanagh *et al.* (1999) como Domec y Gartner (2001) encontraron que no hubo diferencias en la pérdida de conductividad de tallos de *Pseudotsuga menziesii* al aplicar una determinada presión durante 1 ó 10 minutos.

En la figura 3 se puede observar una cámara de doble entrada y dos tapas cierre, las cuales difieren en el diámetro por donde pasará el tallo de la planta. En este tipo de cámara, es importante que las roscas o el giro de las tapas tengan sentido contrario para evitar torsionar la muestra al momento de cerrar la cámara.

### 3.4.2.4. Uso de la fuerza centrífuga para generar embolismos.

El método original fue descrito por Pockman *et al.* (1995), siendo levemente modificado por Alder *et al.* (1997), quienes comprobaron que los resultados obtenidos por dicha técnica son similares a los obtenidos con las técnicas de deshidratación e inyección de aire. La técnica se basa en generar una determinada tensión en la columna de agua de un tallo mediante un instrumento que permita hacer girar la muestra a altas revoluciones. De esta manera, se genera un gradiente de presión entre los



**Figura 2:** Métodos de inyección de aire por presión positiva en ramas de salicáceas (Cochard *et al.*, 1992; A) y método de presión de collar o cámara de doble entrada (Salleo *et al.*, 1992; Sperry y Saliendra, 1994; B).



**Figura 3:** Conductímetro multicanal. Fotografías superiores: conductímetro completo (exceptuando la cabeza hidráulica), visto desde uno y otro extremo. Fotografía inferior: detalle de acoples individuales.

extremos y el centro de la muestra, que puede ser calculado según la ecuación (ver el desarrollo en Alder *et al.*, 1997):

$$\frac{dP}{dr} = \rho w^2 r$$

donde  $P$  es la presión,  $r$  es la distancia axial de rotación,  $w$  es la velocidad angular y  $\rho$  es la densidad del agua. Por lo tanto, si  $r_{max}$  es la distancia axial al extremo, la presión negativa para cada valor de  $r$  ( $P_r$ ) será:

$$Pr \cong 0,5 \rho w^2 (r^2 - r^2 \max)$$

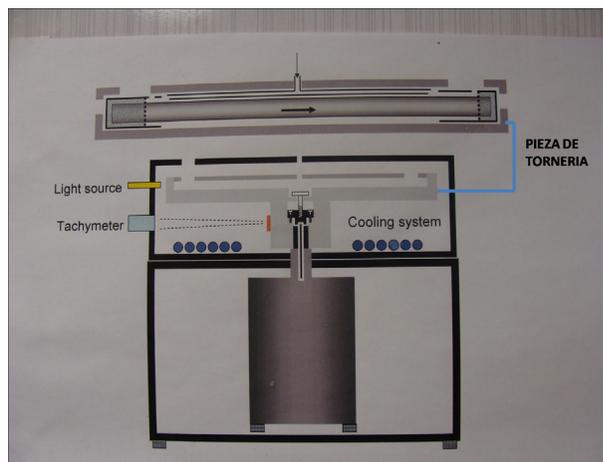
Estos mismos autores introdujeron reservorios de agua en los extremos del tallo, lo que mejoró la metodología ya que así, es posible remedir la misma muestra luego de someterla a los distintos valores de revoluciones.

Este método, que ha sido modificado en Cochard (2002) y Cochard *et al.* (2005), es ampliamente utilizado ya que tiene la gran ventaja de ser un método rápido (escasos minutos) a diferencia de otros métodos en donde son necesarias varias horas, o inclusive días, por curva. En la unidad PIAF (Física y Fisiología Integradas de los Arboles Frutales y Forestales) del INRA Clermont Ferrand en Francia, se han construido varias unidades de “cavitrones” (grupo del Dr. Hervé Cochard), dispositivos específicamente diseñados para la aplicación de esta técnica. Estos “cavitrones” (figura 4) son centrífugas adaptadas con piezas de tornería con el fin de albergar muestras de madera e imprimirles una fuerza centrífuga conocida que a su vez generará el embolismo deseado.

Como se mencionó, la construcción de un “cavitron” puede realizarse caseramente (figura 5). Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que el uso del mismo puede convertirse en una tarea muy riesgosa y debe ponerse especial atención en la seguridad del sistema, ya que el rotor llega a girar hasta a 10000 rpm y el plato que gira pesa aproximadamente 3 kilogramos.



**Figura 4:** Cavitron en el INRA Clermont Ferrand, con lupa binocular.



**Figura 5:** Esquema de construcción del Cavitron. Para la obtención de planos detallados contactar a Hervé Cochard (mail: [cochard@clermont.inra.fr](mailto:cochard@clermont.inra.fr)).

Básicamente, el cavitron se construye haciendo una pieza en tornería de un diámetro aproximado de 30 cm en la que se alojará la muestra (el tamaño dependerá de la centrífuga y del tipo de muestra a medir). En este sentido, recientemente se han realizado estudios que muestran que, inclusive en coníferas, es conveniente utilizar muestras lo más largas posibles (H. Cochard, trabajos en prensa). La muestra se coloca en una cavidad de la pieza y se cubre con una tapa que deja ver los extremos de la muestra. Además posee un pequeño caño en el medio, el cual conducirá agua a los extremos de la muestra y que atraviesa la tapa de la centrífuga (Figura 6).



**Figura 6:** muestra de madera colocada en posición de medición y tapa con los pequeños conductos que transportan agua.

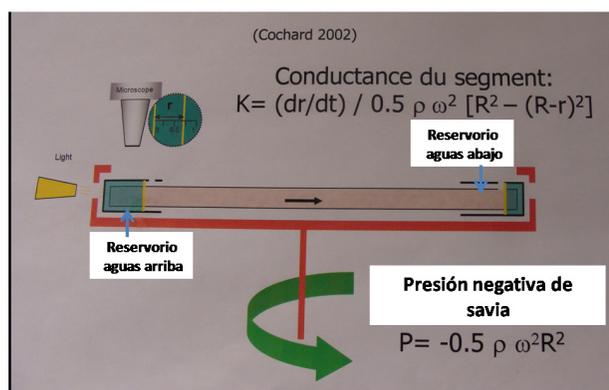
A su vez los extremos de la muestra se colocan en tubos plásticos previamente perforados a distintas alturas, con la finalidad de que contengan distinto volumen de agua y con esto que el flujo sea siempre en el mismo sentido (figura 7).



**Figura 7:** Los dos tubos con las perforaciones a distintas alturas y el « molde » para realizarlos pues se rompen con facilidad.

Con la ayuda de una lupa se observa entonces el tiempo que tarda en pasar ( $dt$ ) un determinado volumen de agua (función de  $dr$ ), viéndose esto por el movimiento del menisco ( $r$ ) de líquido generado al girar la centrífuga (figura 8).

#### Uso de la fuerza centrífuga para inducir embolismo



**Figura 8:** Esquema de medición de la conductancia de una muestra.

## 4. Ejemplos de medición de curvas de vulnerabilidad en otros órganos de las plantas

A continuación enumeraremos algunos ejemplos de construcción de curvas de vulnerabilidad a la cavitación de distintos órganos de las plantas.

### 4.1. Medición en raíces

En el trabajo de Kavanagh *et al.*, (1999) se detalla la metodología utilizada para realizar curvas de vulnerabilidad a la cavitación tanto de tallos como de raíces. Estos autores siguieron el método de inyección de aire utilizando una cámara de doble entrada. Otros autores, por ejemplo Tsuda y Tyree (1997), utilizan una bomba de presión para generar los embolismos en raíces. Estos autores utilizaron dos metodologías las cuales arrojaron resultados similares. En una de ellas, colocaron la maceta con el suelo y raíces dentro de la cámara dejando salir la base del tallo de la planta, mientras que en la otra técnica, se lavaron las raíces y se introdujo la planta dentro de la cámara de la misma manera que en la primera metodología. Luego de generar los embolismos (aplicar aire a presión), se midió la conductividad hidráulica en segmentos de raíces cortados bajo agua siguiendo el método de Sperry *et al.* (1988) detallado en el capítulo 4.

### 4.2. Medición en leño

Uno de los primeros problemas a superar es la posibilidad de medir la conductividad hidráulica de un trozo de leño sin corteza (por ej., parte del tronco, incluyendo uno o varios anillos de crecimiento). Spicer y Gartner (1998) desarrollaron un instrumento para medir la conductividad hidráulica de un trozo de madera, el cual se detalla en el capítulo 4. Los embolismos se generan mediante inyección de aire a presión. En el trabajo de Domec y Gartner (2001) utilizaron una cámara de doble entrada para inyectar aire a una presión conocida. Luego de generar los embolismos, la muestra se sumergió en agua durante 15-35 minutos para permitir la difusión de los gases dentro de las traqueidas, y se midió la  $k$  mediante el dispositivo

descrito en el capítulo 4. Las muestras fueron recortadas bajo agua luego de cada paso de generación de embolismos. Alternativamente, y aunque no es un método probado (al menos, hasta nuestro conocimiento), se podría inyectar aire al trozo de madera introduciéndolo en el interior de una cámara de presión tipo Scholander, tapándole el orificio de salida de la cámara con un tapón ciego. Así, es posible incrementar la presión dentro de la cámara hasta un valor conocido. Posteriormente, se deberá poner el trozo de madera en agua para equilibrar el aire dentro del segmento, y posteriormente, se procedería a la medición de  $k$  en el dispositivo correspondiente. Así, alternativamente se iría imponiendo presiones crecientes al trozo de madera para, posteriormente, medir su conductividad.

Otro método para construir curvas de vulnerabilidad a la cavitación en trozos de madera es el de la centrífuga, utilizado por H. Cochard (Cochard 2002, Cochard *et al.*, 2005). Para poder utilizar este método en trozos de madera es importante seguir el método de preparación de las muestras que se detalla a continuación, pues de esto depende el éxito de la medición, especialmente si no se realiza perfusión.

Para preparar muestras de madera para realizar curvas de vulnerabilidad a la cavitación a partir de troncos se debe tener en cuenta que el objetivo final es el de obtener una pequeña vara de madera de aproximadamente 26 cm de largo y de 0,5 cm de sección lateral de un largo que dependerá del diá-



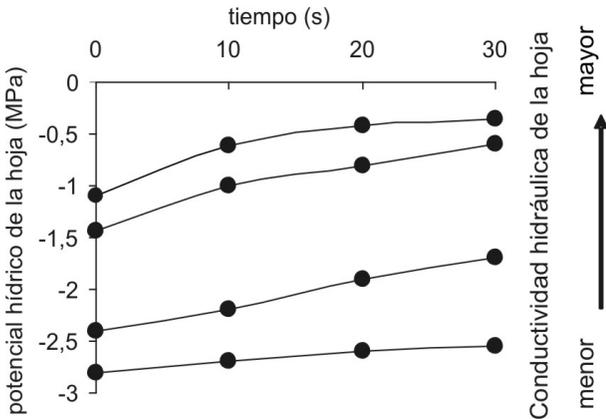
**Figura 9:** Secuencia de corte de las muestras de tronco. Evitar los lugares de inserción de las ramas pues dificulta el corte.

metro del rotor, tendiendo sumo cuidado de que no haya sufrido embolia durante su preparación (figura 9). Para esto tomamos un tronco previamente cortado a campo (ver capítulo 4: preparación de muestras) y lo cortamos con un golpe al medio siguiendo el grano de la madera, con el uso de un hacha, todo esto mojando continuamente el tronco. Inmediatamente después la muestra se sumerge en agua. De esta manera continuamos cortando cada vez trozos más pequeños de madera. Cuando ya no se puede cortar más con el hacha, se deberá continuar con un cuchillo bien filoso o herramienta para tallado de madera y, debajo del agua, se continúa "tallando" la pieza hasta obtener el tamaño deseado, siempre en el sentido de las fibras para no romper la columna de circulación del agua.

#### 4.3. Medición en pecíolos

En el trabajo de Tsuda y Tyree (1997), donde se realizan curvas de vulnerabilidad a la cavitación en pecíolos, los autores mencionan que midieron la conductividad hidráulica siguiendo el método de Sperry *et al.* (1988). Si bien estos autores mencionan que los embolismos fueron generados siguiendo la técnica de deshidratación, ésta no fue al aire sino utilizando una bomba de presión, como se describe en el apartado 3.4.b.1. Luego de someter el tallo con las hojas a presión, fueron cortados los segmentos a medir bajo agua. Finalmente, es posible realizar una curva de vulnerabilidad a la cavitación de un pecíolo midiendo la conductividad hidráulica del mismo luego de las sucesivas etapas de deshidratación (Brodrigg y Holbrook, 2003), como se describe en el capítulo 4 (conductancia hidráulica en hojas). De manera sintética, deberá realizarse etapas de deshidratación, seguida de períodos en donde se permite a la rama equilibrar su potencial con las hojas. A *posteriori* de cada período de equilibrio se mide el potencial de un hoja y se coloca otra (que se supone posee el mismo potencial que la hoja medida) a rehidratar en agua filtrada. Para ello, se corta la hoja bajo el agua de manera tal de evitar la entrada de aire. Es importante cuidar que sólo el pecíolo se encuentre en contacto con el agua para que no exista hidratación a través de poros, estomas o epidermis. Luego de un tiempo determinado, ha de medirse

el potencial de la hoja la deshidratación de una rama dejando en cada etapa, un período de equilibrio. Como se observa en la figura 10, las hojas que mostraron una mayor deshidratación (menor potencial hídrico al tiempo cero) poseen una menor tasa de rehidratación y por lo tanto, la tasa de rehidratación es menor que aquellas hojas que sufrieron una menor deshidratación.



**Figura 10:** Cambio en el potencial hídrico de la hoja en el tiempo y su relación con la conductividad hidráulica del pecíolo (adaptado a partir del trabajo de Brodribb y Holbrook 2003).

De esta manera, la conductancia de la hoja ( $K_{hoja}$ ) Se calcula como (Brodribb y Holbrook 2003):

$$K_{hoja} = \frac{C \ln \left( \frac{\psi_0}{\psi_d} \right)}{t} \text{ [mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}]$$

en donde C es la capacitancia de la hoja (calculada construyendo una curva de presión - volumen normalizada para estimar la capacitancia absoluta, capítulo 6),  $\psi_0$  y  $\psi_d$  representan el potencial hídrico de la hoja antes y después de la rehidratación, y t es el tiempo. Por otro lado, (Brodribb y Holbrook, 2003) definen C ( $\text{MPa}^{-1}$ ) como:

$$C = \frac{\delta CRA PS \left( \frac{MAI}{PS} \right)}{\delta \phi Af M}$$

M en donde  $\delta CRA$  es el cambio del contenido relativo de agua,  $\delta \phi$  es el cambio de potencial hídrico, PS es el peso seco (g), Af es el área foliar ( $\text{m}^2$ ), MAI es la masa de agua de la hoja al 100% de CRA (g), y M es la masa molar de agua ( $\text{g mol}^{-1}$ ).

## 5. Bibliografía

- Alder N N, W T Pockman, J S Sperry y S Nuismer (1997) Use of centrifugal force in the study of xylem cavitation. *J Exp Bot.* 48: 665-674.
- Brodribb T J y N M Holbrook (2003) Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. *Plant Physiol.* 132: 2166-2173.
- Cochard H, P Cruziat y M T Tyree (1992) Use of positive pressures to establish vulnerability curves. *Plant Physiol.* 100: 205-209.
- Cochard H (2002) A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant, Cell Environ.* 25: 815-819.
- Cochard H, G Damour, C Bodet, I Tharwat, M Poirier y T Améglio (2005) Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Phys Plant.* 124: 410-418.
- Cochard H, T Hölttä, S Herbette, S Delzon y M Mencuccini (2009) New Insights into the Mechanisms of Water-Stress-Induced Cavitation in Conifers. *Plant Physiol.* 151: 949-954.
- Cochard H, S Herbette, E Hernández, T Hölttä y M Mencuccini (2010) The effects of sap onic composition on xylem vulnerability to cavitation. *J Exp Bot.* 61: 275-285
- Cruziat P, H Cochard y T Améglio (2002) Hydraulic architecture of trees : main concepts and results. *Ann For Sci.* 59: 723-752.
- Domec J C y B L Gartner (2001) Cavitation and water storage capacity in bole xylem segments of mature and young Douglas-fir trees. *Trees.* 15: 204-214.
- Domec J C, B Lachenbruch y F C Meinzer (2006) Bordered pit structure function determine spatial patterns of air-seeding thresholds in xylem of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*; Pinaceae) trees. *Am J Bot.* 93: 1588-1600.
- Hacke U, V Stiller, J Sperry, J Pittermann y K Cullough (2001) Cavitation fatigue, embolism and refilling cycles can weaken the cavitation resistance of xylem. *Plant Physiol.* 125: 779-786.
- Kavanagh KI, B J Bond, S N Aitken, B L Gartner y S Knowe (1999) Shoot and root vulnerability to xylem cavitation in four populations of Douglas-fir seedlings. *Tree Physiol.* 19: 31-37
- Pammenter N W y C Vander Willigen (1998) A mathematical and statistical analysis of the curves

- illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiol.* 18: 589-593.
- Pockman W T, J S Sperry y W O O'Leary (1995) Sustained and significant negative water pressure in xylem. *Nature* 378: 315-316.
- Salleo S, T M Hinckley, S B, Kikuta M A Lo Gullo, P Weilgony, T M Yoon y H Richter (1992) A method for inducing xylem emboli *in situ*: experiments with a field-grown tree. *Plant Cell Environ.* 15: 491-497.
- Salleo S, M S LoGullo, D De Paoli y M Zippo (1996) Xylem recovery from cavitation-induced embolism in young plants of *Laurus nobilis*: a possible mechanism. *New Phytol.* 132: 47-56.
- Sparks J P y R A Black (1999) Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation. *Tree Physiol.* 19: 453-459.
- Sperry J S, J R Donnelly y M T Tyree (1988) A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant Cell Environ* 11: 35-40.
- Sperry J S, U G Hacke y J Pittermann (2006) Size and function in conifer tracheids and angiosperm vessel. *Am J Bot.* 93: 1490-1500.
- Sperry J S, F C Meinzer y K A Mcculloh (2008) **Safety and efficiency conflicts in hydraulic architecture: scaling from tissues to trees.** *Plant Cell Biol.* 31: 632-645.
- Sperry J S y N Z Saliendra (1994) Intra- and inter-plant variation in xylem cavitation in *Betula pendula*. *Plant Cell Environ.* 17: 1233-1241.
- Sperry J S y J E Sullivan (1992) Xylem embolism in response to freeze-thaw cycles and water stress in ring-porous, diffuse-porous and conifer species. *Plant Cell Environ.* 100: 605-613.
- Sperry J S y M T Tyree (1990) Water-stress-induced embolism in three species of conifers. *Plant Cell Environ.* 13: 427-436.
- Spicer R y BL Gartner (1998) How does a gymnosperm branch (*Pseudotsuga menziesii*) assume the hydraulic status of a main stem when it takes over as leader? *Plant Cell Environ.* 21: 1063-1070.
- Tsuda M y M T Tyree (1997) Whole-plant hydraulic resistance and vulnerability segmentation in *Acer saccharinum*. *Tree Physiol.* 17: 351-357.
- Tyree M T y M H Zimmerman (2002) Xylem Structure and the ascent of sap. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg, Alemania. Pp. 281.
- Wheeler J K, J S Sperry, U Hacke y N Hoang (2005) Inter-vessel pitting and cavitation in woody Roseaceae and other vessel plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant Cell Environ.* 28: 800-812.
- Zwieniecki M A y N M Holbrook (2009) Confronting Maxwell's demon: biophysics of xylem embolism repair. *Trends Plant Sci.* 14: 530-534.

# CAPÍTULO 6

## CURVAS PRESIÓN-VOLUMEN PARA ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS HÍDRICOS

**Autores:** Corina Graciano <sup>(1)</sup>  
y María Elena Fernández <sup>(2)</sup>.

<sup>(1)</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, INFIVE, Universidad Nacional de La Plata

<sup>(2)</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Bariloche

*Nota de las autoras: a diferencia de otros temas metodológicos desarrollados en este libro, la construcción de curvas PV ha sido minuciosamente descrita y analizada en numerosas publicaciones (por ej. Koide et al, 1991, Corcuera 2003, y citas en ellos). Por ello, este capítulo no pretende ser exhaustivo en relación con los múltiples métodos de medición de los parámetros hídricos celulares, sino brindar conceptos generales y una breve descripción de cómo pueden construirse estas curvas por las metodologías más usuales.*

### 1. Introducción

El potencial químico del agua está relacionado con su energía libre, y por lo tanto con la capacidad que esta sustancia tiene para realizar trabajo con respecto a una situación de referencia. El potencial hídrico se define como el potencial químico del agua dividido por el volumen molar del agua, y se expresa en unidades de presión (Pascal, Bar, Atmósferas, etc.). La referencia es el agua pura a temperatura y presión ambientales. El concepto de potencial hídrico permite predecir el movimiento de agua en el continuo suelo-planta-atmósfera.

El potencial hídrico de un tejido vegetal está principalmente determinado por la concentración de solutos, la presión y la gravedad. La disminución en el potencial debida a la presencia de solutos se denomina potencial de soluto o potencial osmótico ( $\Psi_s$ ), y siempre es negativa ya que reduce la capa-

cidad del agua de realizar trabajo. La presión hidrostática o potencial de presión o de turgencia ( $\Psi_p$ ) se genera por la resistencia que opone la pared celular al incremento de volumen celular, y siempre es mayor a cero. El único tejido vegetal que puede tener presión hidrostática negativa es el xilema, y en ese caso recibe el nombre de potencial de tensión ( $\Psi_t$ ). Finalmente, el agua tiende a moverse hacia abajo debido a la gravedad, a menos que se ejerza una fuerza de igual magnitud pero de signo contrario. El potencial gravitatorio ( $\Psi_g$ ) está definido por la altura sobre un punto de referencia, la densidad del agua y la aceleración de la gravedad. Así, un incremento de 10 m de altura aumenta el potencial 0,1 MPa (Taiz y Zeiger, 2003). El balance entre los componentes de potencial antes enunciados resulta en el potencial hídrico del tejido o célula.

El agua en el continuo suelo-planta-atmósfera se mueve a favor de un gradiente de potencial hídrico, de mayor a menor potencial. En ausencia de transpiración, el potencial hídrico de una planta tiende a equilibrarse con el potencial hídrico del suelo. Si el suelo tiene buena disponibilidad de agua, la planta se estabilizará en un potencial hídrico cercano a cero. Mientras que si el suelo tiene bajo contenido de agua, su potencial será más negativo, y en consecuencia la planta se equilibrará en potenciales menores.

Cuando existe transpiración, la pérdida de agua ocasiona la disminución del potencial hídrico de los tejidos, principalmente por la disminución del  $\Psi_p$ . La capacidad de abastecer de agua a la parte aérea será crucial para que la disminución del potencial no sea muy grande. Mantener  $\Psi_p$  positivos es indispensable para que ocurra la expansión celular en tejidos en crecimiento y para el soporte mecánico en tejidos ya maduros. Cuando la demanda atmosférica es mayor a la capacidad de abastecer agua, las células pierden agua y el  $\Psi_p$  desciende. Al llegar a cero, la célula consecuentemente se encuentra en el punto de pérdida de turgencia o plasmólisis. Si la pérdida de agua continúa, el tejido se marchita, por lo que la expansión celular en tejidos en crecimiento se afecta de manera significativa. El potencial hídrico aumentará nuevamente si la transpiración disminuye (por ejemplo, por cierre estomático). El lapso en que la planta se encuentre por debajo del punto de pérdida

de turgencia es muy importante para definir la magnitud de la disminución del crecimiento (Castro-Diez y Navarro, 2007).

Las plantas tienen la capacidad de realizar ajustes en las variables hídricas para evitar la deshidratación y la pérdida de turgencia. Las principales estrategias son el ajuste osmótico y cambios en la elasticidad de la pared celular (Castro-Diez y Navarro, 2007). El ajuste osmótico consiste en la acumulación de solutos osmóticamente activos, que disminuye el  $\Psi_s$ , tanto a turgencia máxima como en el punto de pérdida de turgencia (TLP por su sigla en inglés ("turgor loss point")). Esta disminución del potencial osmótico permite el ingreso de agua a la célula desde tejidos circundantes a favor del gradiente de potencial, con el consecuente aumento del  $\Psi_p$ .

La elasticidad de la pared celular está dada por el grado de hidratación, la estructura, y modificaciones de la misma mediadas por enzimas. Como se recordará, la pared celular está formada por un esqueleto cristalino de celulosa y una matriz amorfa altamente hidratada de hemicelulosas, sustancias pécticas, glucoproteínas y lignina, entre otros, dependiendo la proporción de la cada sustancia, del tipo de pared (por ej. primaria o secundaria) y de la función celular. La elasticidad de la pared puede cuantificarse mediante el "módulo de elasticidad" ( $\epsilon$ ), que puede aumentar, disminuir o permanecer constante en respuesta al estrés hídrico (Goldstein *et al.*, 1989). El módulo de elasticidad es una medida de la magnitud de la pérdida de turgencia con respecto a la pérdida de un determinado volumen de agua. Una pared elástica (con bajo  $\epsilon$ ) disminuye poco el  $\Psi_p$  por cada unidad de pérdida de contenido de agua. Contrariamente, un tejido poco elástico, pierde mucha turgencia con una pequeña disminución del contenido de agua.

Es interesante, entonces, conocer no sólo el potencial hídrico de un tejido en un momento dado, sino conocer sus componentes:  $\Psi_s$  y  $\Psi_p$ , tanto antes como después de eventos de sequía a fin de determinar los valores "normales" con los que la planta opera (que intrínsecamente pueden ser más o menos favorables para el mantenimiento de la turgencia celular) así como la capacidad de la planta de modificar activamente ("ajustar") dichos valores. Desde el punto de vista metodológico, una herramienta para conocer la

relación entre el contenido de agua de un tejido, su potencial hídrico y los componentes de éste último, consiste en construir las denominadas "curvas de presión-volumen" o "curvas PV".

La curva de presión-volumen representa la relación entre el contenido de agua y el potencial hídrico de un tejido. Mediante esta curva, puede analizarse si determinados factores (por ej. la sequía, la salinidad, las bajas temperaturas) afectan las relaciones hídricas de los tejidos (Harayama *et al.*, 2006). Cuando se comparan especies relacionadas, las relaciones hídricas reflejan las condiciones climáticas y edáficas de las que proviene cada especie, existiendo numerosos estudios que demuestran el valor adaptativo de estas variables (Castro-Diez y Navarro, 2007; Harayama *et al.*, 2006; Merchant *et al.*, 2007; Pardos *et al.*, 2009). Además, las relaciones hídricas de las hojas en el mismo individuo cambian con la fenología de las mismas (Saito *et al.*, 2007) y con las estaciones del año (Parker *et al.*, 1982). Por ejemplo, en invierno, cuando las temperaturas son menores, el potencial osmótico disminuye. La disminución del potencial osmótico disminuye el punto de congelamiento del agua simplástica (es decir, del agua asociada al citoplasma, en oposición con el agua apoplástica (que es la asociada a los espacios intercelulares y las paredes celulares) por lo que el daño mecánico que produce el congelamiento de agua se producirá a temperaturas menores. Además, la disminución del potencial osmótico tiene el efecto de disminuir la salida de agua de la célula, lo que permite mantener la turgencia.

## 2. Metodología para la construcción de las curvas PV

### 2.1. Obtención de los datos

Para construir las curvas PV se necesita una balanza con precisión adecuada y una cámara de presión (también llamada cámara o bomba de Scholander). La metodología consiste en pesar repetidamente la hoja o rama y medir la presión de equilibrio de la misma hoja, tallo o rama (e incluso raíz, aunque es menos usual) a medida que la misma se deshidrata, por ej. disminuye su

contenido relativo de agua o CRA. Este se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{CRA}_i = \frac{(P_i - P_{\text{seco}})}{(P_{\text{sat}} - P_{\text{seco}})}$$

donde  $\text{CRA}_i$  es el contenido relativo de agua para un momento  $i$  en el que el peso de la muestra (hoja/ramita) es  $P_i$ ;  $P_{\text{sat}}$  es el peso de la misma muestra en hidratación máxima y  $P_{\text{seco}}$  es el peso de la misma muestra luego de haber sido secada en estufa a  $60^\circ\text{C}$  hasta peso constante. En el caso particular de la construcción de curvas PV, se comienza midiendo a  $P_{\text{sat}}$ , luego se registran los  $P_i$  consecutivos, y una vez finalizadas todas las mediciones, se seca el material para conocer  $P_{\text{seco}}$ .

La cámara de presión o bomba de Scholander es uno de los aparatos más usados en el estudio de las relaciones hídricas de las plantas ya que permite medir, de manera sencilla e ingeniosa, el potencial hídrico de un tejido. Consiste en una cámara cilíndrica de metal, construida de manera tal que soporta altas presiones, dentro de la cual se coloca una rama u hoja, con el peciolo o base de la rama saliendo hacia el exterior a través de un pequeño orificio en su tapa. Se inyecta aire comprimido o nitrógeno gaseoso en la cámara hasta que se visualiza la salida de agua en los vasos de xilema expuestos. La presión dentro de la cámara a la que el menisco de agua llega a la superficie de corte se denomina presión de equilibrio. La presión de equilibrio tiene la misma magnitud pero signo contrario al  $\Psi$  del tejido colocado dentro de la cámara (Nobel, 2004; Salisbury y Ross, 1994; Taiz y Zeiger, 2003). Por lo tanto, si el menisco de agua en el xilema emergió a la superficie del corte cuando se aplicó 1 MPa de presión, la ramita tiene un  $\Psi = -1$  MPa. La inyección del gas en la cámara debe realizarse lentamente (0,01 Mpa), para evitar daños en los tejidos. La misma precaución hay que tomar para liberar el gas de la cámara. Este punto es muy importante, ya que permitirá que el material llegue en buenas condiciones a los últimos puntos de medición, sin que se produzcan embolismos. Cuanto más tierno sea el material, más importante será tener esta precaución.

Existen varios métodos de construcción de curvas PV, entre los que destacamos dos (comparados en Corcuera 2003): el método de transpira-

ción libre (TL) (Tyree y Hammel, 1972) y el método de expresión de la savia (ES) (Talbot *et al.*, 1975; Richter, 1978; Parker y Colombo, 1995). Estos sólo difieren en la forma en que se determina el cambio en el contenido relativo de agua entre dos mediciones sucesivas. En método (TL), el órgano se deshidrata libremente fuera de la cámara entre dos determinaciones de potencial hídrico, mientras que en el segundo (ES), el agua simplástica se pierde por sobrepresurización dentro de la cámara. Con el método TL, antes de determinar el  $\Psi$  de la muestra, se pesa a la misma para conocer la pérdida de peso (por ej. pérdida de agua), mientras que en el método ES, en lugar de pesar la muestras (rama u hoja), se recojiéndolos en recipientes adecuados (por ej., en tubos de tipo Eppendorf). En ambos casos, se requiere del uso de una balanza analítica con 1 mg de precisión.

Para iniciar la construcción de una curva, por cualquiera de los dos métodos mencionados anteriormente, debe hidratarse completamente el material a utilizar (hoja o ramita). Esta hidratación máxima puede obtenerse por diferentes modos, dependiendo del tamaño de las plantas y la capacidad operativa. Si las plantas están creciendo en contenedores, una forma de obtener la hidratación máxima es regar la planta en abundancia como para que el suelo esté a capacidad de campo, embolsar la rama a medir, dejar pasar la noche y comenzar las mediciones a la mañana siguiente. Debe cortarse la rama u hoja a utilizar, pesarla inmediatamente, y medir su  $\Psi$ , obteniéndose el  $P_{\text{sat}}$  y el  $\Psi$  a  $\text{CRA}=1$ . De esta manera el  $P_{\text{sat}}$  se obtiene mediante una hidratación del tejido unido a la planta, evitándose modificaciones que pueden producirse cuando la rama es separada de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación de la rama u hoja unida a la planta no es posible (por ejemplo porque son plantas creciendo a campo) debe cortarse la rama a utilizar, colocar el tallo en un recipiente con agua destilada y cubrir todo con bolsa de polietileno oscura, de manera de evitar la transpiración. El material a utilizar debe tener un tamaño adecuado para entrar en la cámara de presión, y puede ser necesario recortar la rama bajo el agua antes de poner a rehidratar, especialmente si el corte del material se hizo cuando la planta estaba transpirando activamente. El tiempo que debe

transcurrir para que la rama llegue a la hidratación máxima depende del tipo de material, pero 2 horas suele ser suficiente. La manera de corroborarlo es hacer pesadas sucesivas cada 30 minutos y verificar en qué momento las pesadas consecutivas se mantienen constantes. No es recomendable rehidratar ramas cortadas de un día para el otro, ya que puede producirse el desdoblamiento de sustancias de reserva, disminuyendo el  $\Psi$ s de manera artificial (Dejardin *et al.*, 1999). Si no se logra la hidratación completa ( $\Psi=0$ ) se puede extrapolar para calcular el valor de peso a turgencia máxima. Para esto, se debe graficar la parte lineal  $\Psi$  (sector con  $\Psi$  p positivo) versus el peso fresco. Se calcula el peso a turgencia máxima cuando  $\Psi=0$  (White *et al.*, 2000). Este valor estimado de peso a turgencia máxima se lo utiliza en reemplazo de  $P_{sat}$  para el cálculo de CRA (fórmula especificada al inicio de esta sección).

Una vez que la rama llegó a  $P_{sat}$ , debe pesarse y medirse su  $\Psi$ . A partir de este momento, se realizarán mediciones repetidas de peso ( $P_i$ ) y, a medida que la muestra pierde agua por alguno de los métodos expuestos. Es muy importante que los cuatro primeros puntos que se midan correspondan a pequeñas caídas de CRA (con el tejido aún con  $\Psi$  p positivo). En el caso de especies que se deshidratan muy rápidamente, puede evitarse la desecación rápida entre mediciones colocando las ramitas en bolsas abiertas en vez de colocarlas directamente expuestas al ambiente. Asimismo, si se utiliza el método ES, debe imponerse muy poca presión por sobre el  $\Psi$  medido, así como debe dejarse muy poco tiempo saliendo agua, entre estas primeras mediciones. La primera consideración (poca presión de sobrepresurización) es válida para la construcción de toda la curva, la diferencia en la salida de agua estará dada por los tiempos en que se deja salir agua. Si bien no hay protocolos establecidos, una presión de aprox. 0,2 MPa es un valor razonable. Una vez obtenidos los cuatro primeros puntos, la pérdida de peso entre cada medición puede ser mayor. Se debe tener en cuenta que la curva debe tener un mínimo de ocho puntos. Mayor cantidad de puntos es mejor, siempre y cuando el material no se deteriore con las mediciones repetidas, lo que impediría llegar a mediciones confiables a bajos CRA. Definir cuántos puntos pueden realizarse depende del tipo de material a

utilizar, pero construir las curvas PV de 15 muestras de *Eucalyptus sp* puede llevar ocho horas, mientras que si se trabaja con *Pinus sp*, que se deshidrata más lentamente, puede consumir dos días de trabajo. Una manera de evitar que la muestra (o material) se dañe cuando es introducida en la cámara de Scholander, es colocarla dentro de una bolsa de polietileno, para que no quede expuesta directamente a la corriente seca de nitrógeno.

Una vez medidos los ocho o más puntos que conforman una curva, se deberá a secar la muestra en estufa a 60°C hasta peso constante, para obtener el valor de peso seco ( $P_{seco}$ ) indispensable para calcular el CRA.

## 2.2 Construcción de la curva PV

El análisis de la curva PV se realiza graficando la relación entre  $-1/\Psi$  y  $1-CRA$ . La obtención de los parámetros de la curva puede realizarse "a mano" en una planilla de cálculo, aunque existen programas que ajustan la curva por iteración, como por ejemplo el Pressure-Volume Curve Analysis Program (P-V Program), que puede bajarse gratuitamente de la página: <http://sols.unlv.edu/Schulte/Software/Software.html>. Cabe mencionarse que este programa no ajusta a todas las curvas, por lo que a veces no queda otra alternativa que estimar los parámetros eligiendo de manera más o menos arbitraria el punto de inflexión de la curva, que es aquel en el cual pasa desde la porción curvilínea a una más recta debido a la pérdida total de turgencia del tejido.

Una curva PV tiene la forma general presentada en la figura 1. En la figura 2 se presentan a modo de ejemplo curvas reales obtenidas en ramas de *Pinus taeda* fertilizadas con nitrógeno (N), fósforo (P) o sin fertilizar (C) (Faustino y Graciano, datos inéditos). A partir de gráficos de este tipo se pueden calcular algunos puntos que resultan interesantes para analizar las relaciones hídricas. Recordemos previamente que el potencial hídrico a cada momento es la suma (respetando los signos correspondientes) del potencial osmótico (signo negativo) y el potencial de turgencia (signo positivo). En forma más precisa, también existe el potencial mátrico (de signo negativo) que está dado por la disminución en el potencial hídrico debida a

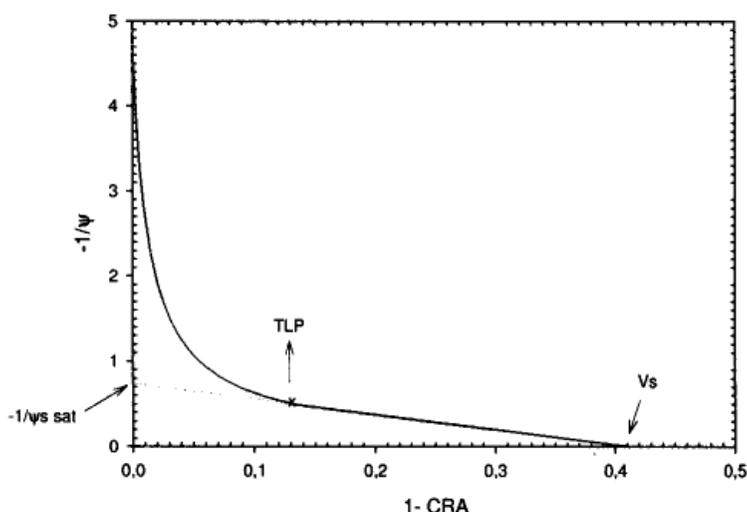
los coloides presentes, y que como en hojas posee bajo valor, en general se asume despreciable en los análisis de este tipo. De esta manera, la curva representa la inversa de los potenciales hídricos correspondientes a cada valor de CRA, los que a partir de la pérdida total de turgencia (punto TLP en la figura 1), es equivalente a los potenciales osmóticos.

Los puntos que resultan relevantes son el  $\Psi_s$  a saturación o turgencia máxima (por ej. cuando el CRA= 1), el  $\Psi_s$  en el punto de pérdida de turgencia TLP, el CRA en el punto de pérdida de turgencia y el volumen de agua simplástica ( $V_s$ ). Estos parámetros son los que pueden modificarse con las condiciones de crecimiento o fenología de las plantas. Por ejemplo, el  $\Psi_s$  a saturación y en el punto de pérdida de turgencia es menor (más negativo) en plantas de diversas especies de *Eucalyptus* estresadas que con buena disponibilidad de agua (Merchant *et al.*, 2007). Asimismo, las especies provenientes de climas más secos tienen menor  $\Psi_s$  cuando se las compara con especies provenientes de climas más húmedos (Merchant *et al.*, 2007).

Una vez ajustada la curva PV puede calcularse otro parámetro interesante para el análisis de las relaciones hídricas de los tejidos: el módulo de elasticidad ( $\epsilon$ ). Este se calcula mediante la fórmula:

$$\epsilon = \frac{\Delta \psi_p}{\text{CRA}} \quad (\text{Ike y Thurtell, 1981})$$

Para estimar el módulo de elasticidad es necesario contar con la curva que relaciona el potencial de turgencia con el CRA. Para ello, se puede deducir el  $\Psi_p$  para cada valor de  $\Psi$  restándole a éste el  $\Psi_s$ . A su vez, este último puede conocerse para cada valor de CRA mediante el ajuste de una regresión lineal a los puntos que caen a la derecha del TLP de la curva PV, por extrapolación a valores de CRA anteriores al TLP. Así, por ejemplo, para un valor de  $\Psi$  de -2 MPa, correspondiente a un CRA de 0,99, con la ecuación de la recta obtengo un valor de  $\Psi_s$  para ese mismo CRA (variable x) de -2,8 MPa. De este par de valores se deduce que el valor de turgencia para un CRA de 0,99 es igual a  $(-2 - (-2,8))$ , es decir, 0,8 MPa. La forma de la relación entre  $\Psi_p$  y CRA también es curvilínea (a modo de ejemplo, ver figura 2), lo que significa que el módulo de elasticidad (proporcional a la pendiente de esta relación en cada punto) es variable. Por convención y a fines comparativos, se calcula el  $\epsilon$  para CRA cercanos a 1, considerando que en la zona cercana a este valor, la pendiente es constante. Si  $\epsilon$  es mayor, la pendiente es más pronunciada, lo que significa que frente a una disminución de CRA



**Figura 1:** Curva de P-V y los parámetros más importantes en ramas de *Pinus taeda*.

la disminución en la turgencia es mayor, lo que está indicando que las paredes son menos elásticas o, lo que es lo mismo, más rígidas.

Si por alguna razón desea conocerse el módulo de elasticidad para valores de

CRA menores a la saturación, puede obtenerse la pendiente en cada punto derivando el diferencial de  $\Psi_p$  para cada diferencial de CRA (Cheung *et al.*, 1975).

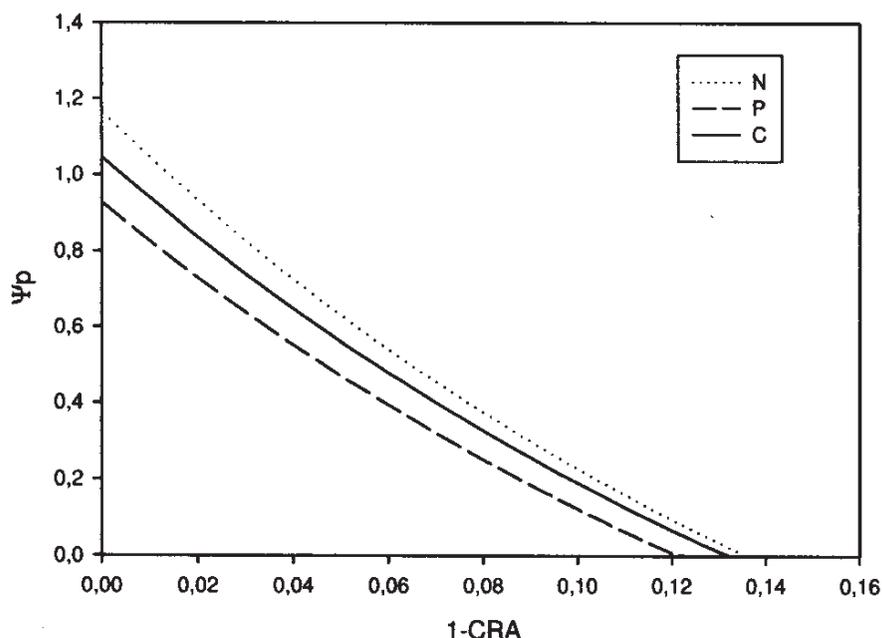
$$\epsilon = \frac{\delta P_t}{\delta F}, \text{ con } F = (V_s - V_e - V_p) / V_p$$

En esta ecuación,  $P_t$  es  $\Psi_p$  en un contenido de agua determinado,  $V_s$  es el volumen de agua simplástica a turgencia máxima,  $V_e$  es el volumen de agua perdido hasta ese contenido de agua determinado,  $V_p$  es el contenido de agua en plasmólisis incipiente (cuando  $\Psi_p = 0$ ). Como se mencionó, la pendiente varía punto a punto, pero la pendiente máxima se da a turgencia máxima. Por lo tanto, el módulo de elasticidad cuando el tejido se encuentra en turgencia máxima (CRA = 1), se conoce como  $\epsilon_{max}$ . El programa P-V Program calcula el módulo de elasticidad para cada punto, por lo que puede obtenerse

el módulo de elasticidad máximo ( $\epsilon_{max}$ ) como el módulo de elasticidad a turgencia máxima (a saturación). De manera simplificada, algunos estiman el módulo de elasticidad considerando que la pendiente es constante en todo el rango de turgencia (Kikuta y Richter, 1986), lo que subestima el módulo para la zona cercana a saturación.

En este ejemplo, las curvas se aproximan mucho a relaciones lineales, aunque es común verificar relaciones

La interpretación, desde el punto de vista adaptativo, de los ajustes elásticos es compleja ya que en la naturaleza se observan tanto aumentos como disminuciones del módulo de elasticidad como respuesta a la sequía. Así, en algunas plantas puede observarse que la elasticidad aumenta (disminuye  $\epsilon$ ) durante los meses de sequía. Esto permitiría a la planta mantener la turgencia celular a bajos contenidos de agua de los tejidos, lo que es indispensable para mantener el crecimiento y la apertura estomática (Goldstein *et al.*, 1989). Sin embargo, una disminución en la elasticidad (aumento de  $\epsilon$ ) también podría observarse en plantas sometidas a estrés por sequía, ya que la abrupta disminución del  $\Psi_p$  disminuye el  $\Psi$  del tejido, lo



**Figura 2:** Ejemplos de relación entre el  $\Psi_p$  y el CRA en ramas de *Pinus taeda* fertilizadas con nitrógeno (N), fósforo (P) o sin fertilizar (C). En este ejemplo, las curvas se aproximan mucho a relaciones lineales, aunque es común verificar relaciones mucho más curvilíneas.

que permite mantener el gradiente de potenciales necesario para el ingreso de agua desde un suelo muy seco (Goldstein *et al.*, 1989; Whitehead y Beadle, 2004).

C		P		N	
Psat	4,749	Psat	2,502	Psat	2,949
Pseco	1,356	Pseco	0,685	Pseco	0,878
Nº puntos	12	Nº puntos	12	Nº puntos	12
Peso	$\Psi$	Peso	$\Psi$	Peso	$\Psi$
4,749	-0,25	2,502	-0,35	2,949	-0,15
4,716	-0,25	2,485	-0,65	2,937	-0,35
4,679	-0,40	2,478	-0,80	2,923	-0,45
4,655	-0,45	2,461	-0,80	2,909	-0,50
4,614	-0,55	2,440	-0,95	2,887	-0,65
4,592	-0,65	2,408	-1,20	2,866	-0,80
4,493	-1,20	2,346	-1,50	2,804	-1,25
4,424	-1,30	2,303	-1,65	2,756	-1,40
4,348	-1,60	2,266	-1,90	2,709	-1,75
4,090	-2,15	2,112	-2,35	2,684	-2,05
3,981	-2,65	2,053	-2,70	2,577	-2,45
3,909	-2,85	2 005	-2,90	2 514	-2,80

**Tabla 1:** Datos recolectados para la construcción de curvas PV de ramas de *Pinus taeda*, sin fertilizar (C), fertilizadas con nitrógeno (N) y fertilizadas con fósforo (P). Los datos están presentados en la forma en que deben ser cargados para utilizar el programa PV Curves Analysis Program.

#### Ejemplo de curvas PV

A modo de ejemplo, a continuación se presentan los datos recolectados en la construcción de tres curvas. Se tomaron 12 pares de puntos de cada muestra.

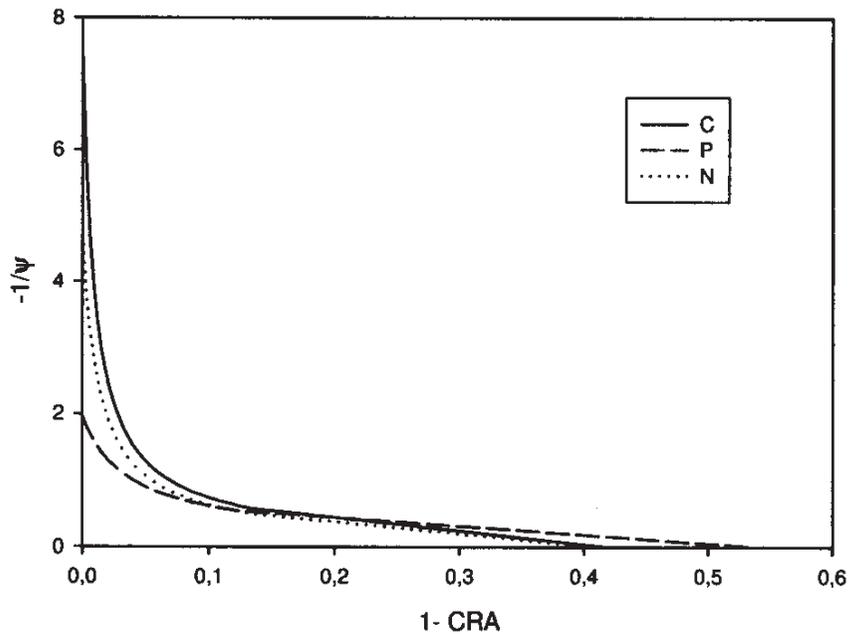
Con estos valores de entrada, se ajustaron las curvas que se grafican y muestran en la Figura 3. Como puede verse, la planta P tiene mayor  $\psi$  a saturación que la planta C, mientras que el individuo N tiene un valor intermedio (recordar que en el eje de las ordenadas está graficado  $-1/\Psi$ ). Asimismo, se puede observar que las tres plantas tienen el punto de inflexión aproximadamente al mismo CRA. También se observa que la planta P tiene mayor volumen simplástico que las plantas N y C (la curva P corta el eje de las abscisas a menor CRA que las curvas N y C).

En general, en las publicaciones no se reportan las curvas completas, sino que se toman algunos puntos que describen correctamente la forma de la curva. El programa "PV curves" muestra estos valores en su pantalla de salida de datos. Los va-

lores de salida del programa están presentados en la tabla 2. Los puntos más importantes que se pueden reportar son el contenido relativo de agua en el punto de pérdida de turgencia (esto significa que con valores menores de CRA el tejido no va a estar turgente), el  $\Psi_s$  en el mismo punto, el  $\Psi_s$  a saturación o turgencia máxima, y la proporción de agua del tejido contenida en el simplasto (el resto está en el apoplasto). Adicionalmente, puede reportarse el módulo de elasticidad, tal como se explicó en el apartado anterior. En plantas creciendo en condiciones de sequía, puede observarse modificación de cualquiera de estos parámetros.

**Tabla 2:** Puntos más importantes de las curvas mostradas en la Figura 3.

	C	P	N
TLP (1-CRA)	0.1322	0.1214	0.1360
$\Psi_s$ enTLP	-1.723	-1.853	-2.057
$\Psi_{sa}$ SAT	-1.178	-1.436	-1.378
Fracción simplástica	0.4177	0.5394	0.4122



**Figura 3:** Ejemplos de curvas de P-V en ramas de *Pinus taeda* fertilizadas con nitrógeno (N), fósforo (P) o sin fertilizar (C).

El ejemplo que hemos mostrado implica una sola repetición de cada tratamiento. En general, se requieren al menos 5 repeticiones por tratamiento. El modo de analizar estadísticamente los valores es mediante un análisis de la varianza para cada parámetro. Alternativamente, en el caso en que se ajuste una sola curva para cada tratamiento (con los datos que derivan de varias plantas) se pueden comparar las pendientes y ordenadas al origen de cada una de las partes lineales de las curvas (por encima del punto de pérdida de turgencia hasta saturación y por debajo del punto de pérdida de turgencia hasta CRA=volumen simplástico).

### 3. Precauciones y normas de seguridad

Antes de comenzar a trabajar:

- Verificar que la prueba hidráulica del cilindro que contiene el gas con que se va a presurizar la cámara no esté vencida.
- Verificar que la carga de gas disponible sea suficiente para realizar todas las mediciones planeadas.

- Al armar el equipo, verificar que los conectores de las mangueras estén correctamente acoplados.

- Verificar que el manómetro de salida tenga una presión de salida suficiente, pero no en exceso, de acuerdo a la máxima capacidad de la cámara de presión.

Durante el trabajo:

- Colocar el material dentro de la cámara cubierto con una bolsa de polietileno para evitar que se desecue por la corriente de aire seco.
- Inyectar gas lentamente, para preservar el material y para realizar correctamente las mediciones.
- Liberar el gas lentamente, para que el material no se deteriore y poder llegar a puntos de bajos potenciales correctamente.

### 4-Bibliografía

Castro-Diez P y J Navarro (2007) Water relations of seedlings of three Quercus species: variations across and within species grown in contrasting light and water regimes. *Tree Physiol* 27:1011-1018.

- Cheung Y N S, M T Tyree y J Dainty (1975) Some possible sources of error in determining bulk elastic moduli and other parameters from pressure-volume curves of shoots and leaves. *Can J Bot* 54:758-765.
- Dejardin A, L N Sokolov y L A Kleczkowski (1999) Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochem J* 344:503-509.
- Goldstein G, F Rada, A Orozco, M Montilla, O Zabala, J Cavelier y A Azócar (1989) Mantenimiento del turgor en especies leñosas tropicales: un modelo basado en cambios estacionales de osmolaridad y elasticidad. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 27:37-49.
- Harayama H, T Ikeda, A Ishida y S I Yamamoto (2006) Seasonal variations in water relations in current-year leaves of evergreen trees with delayed greening. *Tree Physiol* 26:1025-1033.
- Ike IF y G W Thurtell (1981) Osmotic adjustment in indoor grown cassava in response to water stress. *Physiologia Plantarum* 52:257-262.
- Kikuta S B y H Richter (1986) Graphical evaluation and partitioning of turgor responses to drought in leaves of durum wheat. *Planta* 168:36-42.
- Merchant A, A Callister, S Arndt, M Tausz y M Adams (2007) Contrasting Physio Responses of Six *Eucalyptus* Species to Water Deficit. *Ann Bot* 100:1507-1515.
- Nobel P S (2004) *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. London:Academic Press.
- Pardos M, R Calama y J Climent (2009) Difference in cuticular transpiration and sclerophylly in juvenile and adult pine needles relates to the species-specific rates of development. *Trees - Structure and Function* 23:501-508.
- Parker WC, S G Pallardy, T M Hinckley y R O Teskey (1982) Seasonal Changes in Tissue Water Relations of Three Woody Species of the *Quercus-Carya* Forest Type. *Ecology* 63:1259-1267.
- Parker W C y J S Colombo (1995) A critical re-examination of pressure-volume analysis of conifer shoots: comparison of three procedures for generating PV curves on shoots of *Pinus resinosa* Ait. seedlings. *J Exp Bot* 46:1701-1709.
- Richter H (1978) A Diagram for the Description of Water Relations in Plant Cells and Organs. *J. Exp. Bot.* 29: 1197-1203.
- Saito T, Naiola B P y Terashima I (2007) Conservative Decrease in Water Potential in Existing Leaves during New Leaf Expansion in Temperate and Tropical Evergreen *Quercus* Species. *Ann Bot* 100:1229-1238.
- Salisbury F B y C W Ross (1994) *Fisiología Vegetal*. México: Grupo Editorial Iberoamérica.
- Taiz L y Zeiger E (2003) *Plant physiology*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- White D A, N C Turner y J H Galbraith (2000) Leaf water relations and stomatal behavior of four allopatric *Eucalyptus* species planted in Mediterranean southwestern Australia. *Tree Physiology* 20:1157-1165.
- Whitehead D y C L Beadle (2004) Physiological regulation of productivity and water use in *Eucalyptus*: a review. *Forest Ecology and Management* 193:113-140.



# 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:

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 mante-

ner una tasa metabólica alta. En las plantas, la fotosíntesis se lleva a cabo en una organela especializada denominada cloroplasto. Esta organela está delimitada por dos membranas (doble membrana) que lo 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 necesarios 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 proce-

Los 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 tilacooidal 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 C3 y C4. En las plantas con metabolismo C4 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 (Brodribb y Holbrook, 2004; Zlatev *et al.*, 2003; Medrano *et al.*, 2002; Tardieu y Simonneau, 1998). 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 toda 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 HO 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  $\text{CO}_2$  en la cámara se reducirá, mientras que el contenido de vapor de  $\text{H}_2\text{O}$  en el aire se incrementará. La tasa de agotamiento del  $\text{CO}_2$  se corresponde a la actividad fotosintética y la adición de vapor de  $\text{H}_2\text{O}$  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  $\text{CO}_2$  al inicio y al final de un determinado intervalo de tiempo. Dado que el agotamiento del  $\text{CO}_2$  es el producto de la concentración y del volumen del sistema, la ecuación básica para el cálculo de la fotosíntesis neta ( $A_n$ ) es:

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

donde  $c_b$  es la concentración inicial de  $\text{CO}_2$ ,  $c_f$  es la concentración final,  $V$  es el volumen del sistema y  $\Delta t$  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  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  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:

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

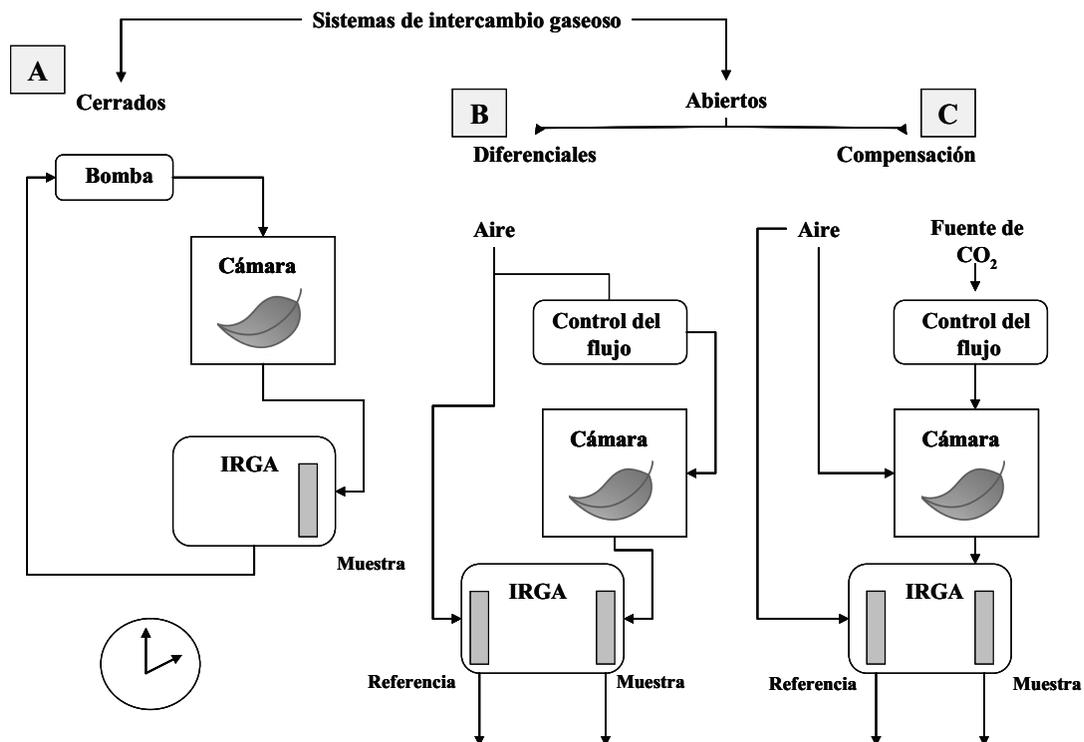
donde  $u_e$  es el flujo de aire entrante a la cámara,  $c_e$  es la concentración de  $\text{CO}_2$  en el flujo de aire entrante a la cámara,  $u_o$  es el flujo de aire que sale de la cámara,  $c_o$  es la concentración de  $\text{CO}_2$  en el flujo de aire que sale de la cámara y  $L$  es el área dentro de la cámara. Bajo condiciones donde el agotamiento de  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  están particularmente adaptados a instrumentos en los cuales los pequeños flujos de aire a través de la cámara causan grandes reducciones en el  $\text{CO}_2$  bajo sistemas de tipo diferencial. En los sistemas de compensación, el  $\text{CO}_2$  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.

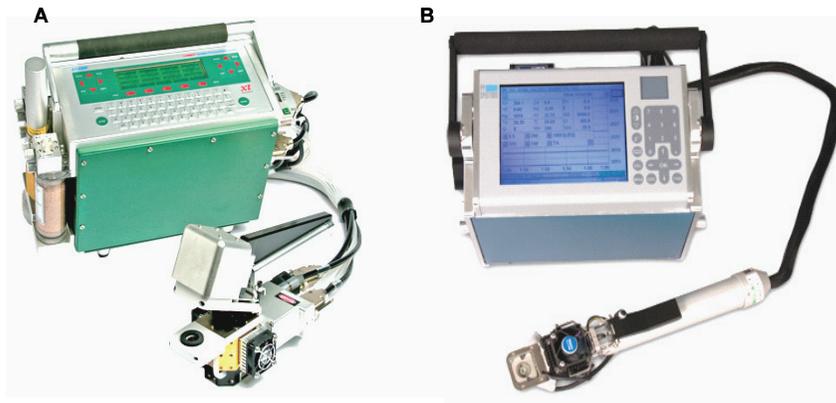
Como se mencionó anteriormente, los analizadores de gases infrarrojos IRGA son actualmente los sistemas más ampliamente utilizados para la medición de la actividad fotosintética a través de la cuantificación de las concentraciones de  $\text{CO}_2$  y vapor de  $\text{H}_2\text{O}$  atmosférico. Es importante 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),

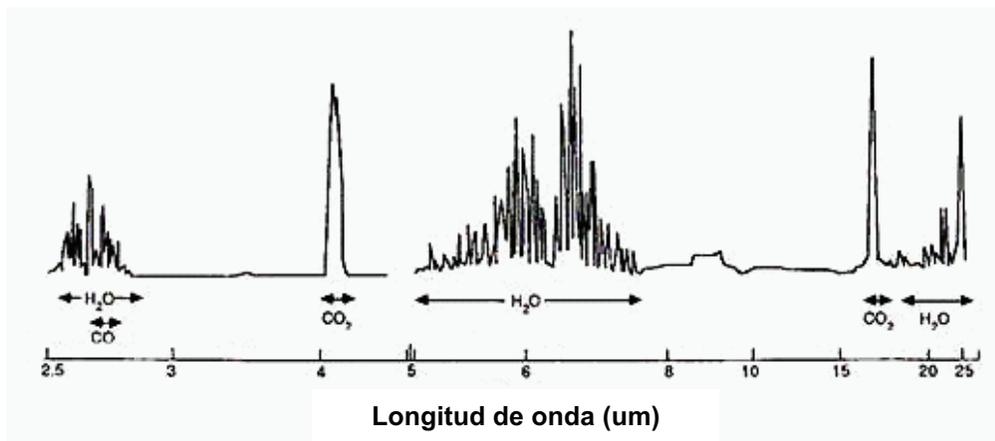
de manera que una determinada cantidad de estos gases absorberá una magnitud de radiación de manera proporcional a su concentración en la corriente de aire. Debido a que ambos gases presentan picos de absorción en zonas próximas o solapadas del espectro infrarrojo, es necesario el uso de filtros específicos 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.



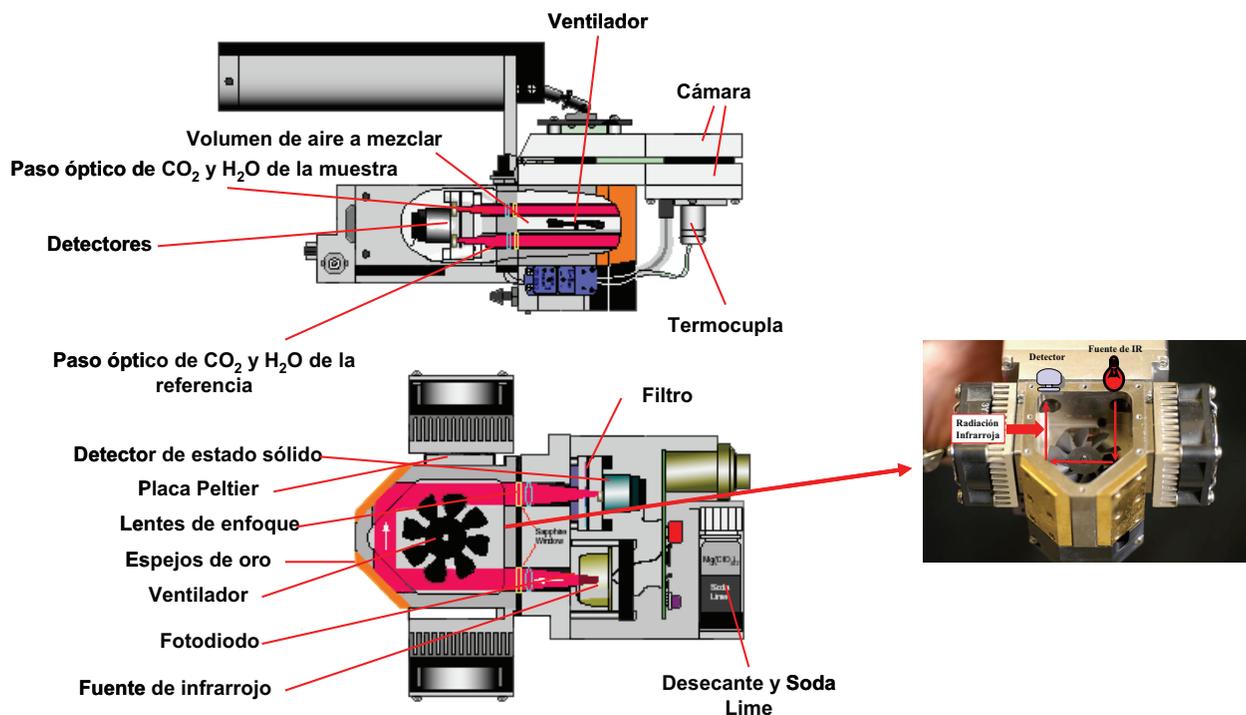
**Figura 2:** Sistemas IRGA del tipo abierto para la medición de intercambio gaseoso. A) LI-6400 (Li-Cor, Nebraska, EE. UU.); B) Ciras-2 (PP Systems, Amesbury, EE. UU.)



**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

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

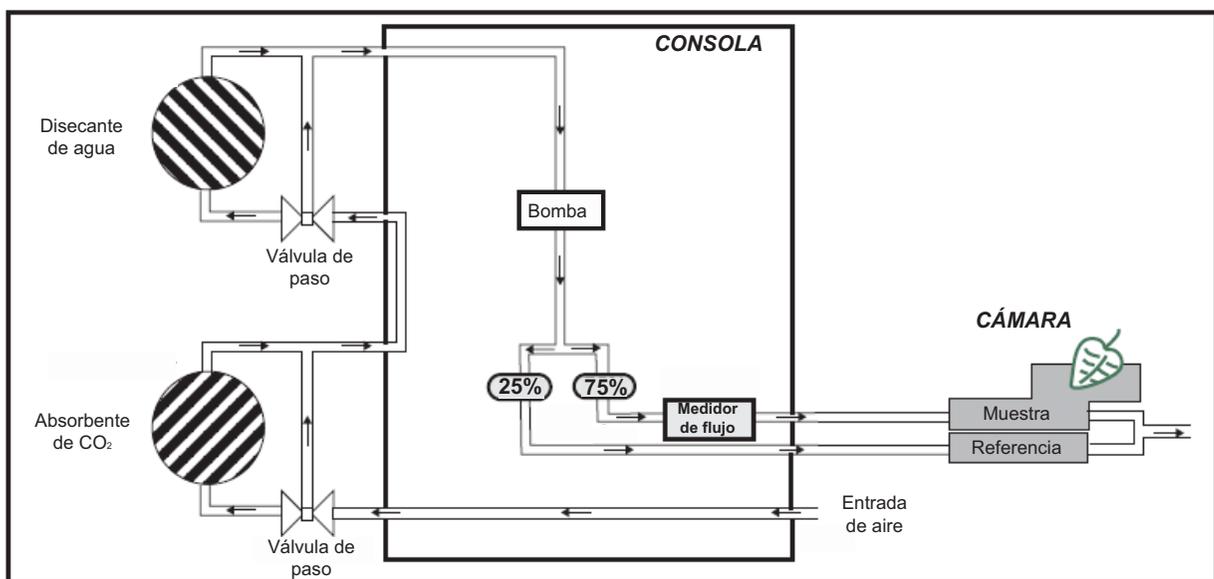
donde E es la tasa de transpiración (mol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

### 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 aparato 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. (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 mode-

lo 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 PPF (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 aparato. 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 induzca 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).



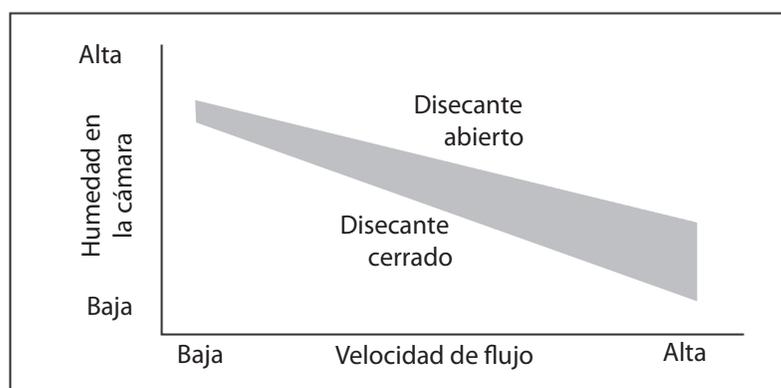
**Figura 6:** Distintos sistemas de iluminación utilizados por el sistema LI-6400. A) Sun+Sky; B) 6400-02; C) 6400-40.

- 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  $\text{CO}_2$  utilizado para eliminar el contenido de  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  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  $6\text{ }^\circ\text{C}$  respecto de la temperatura ambiente. El enfriamiento de la cámara se logra con ventiladores asociados a la placa de Peltier y cámara.

- Concentración de  $\text{CO}_2$ : El sistema cuenta con dos opciones de control de la concentración de  $\text{CO}_2$  en la cámara. La primera es regulando la cantidad de  $\text{CO}_2$  que entra a la cámara mediante el accionamiento manual del absorbente de  $\text{CO}_2$  ("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  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  del ambiente cerrando por completo la válvula de paso al absorbente de  $\text{CO}_2$  ("Soda lime" full scrub). La capacidad de independizarse de la concentración de  $\text{CO}_2$  del ambiente permite manejar por separado las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}$  y de  $\text{CO}_2$ . Además, el poder trabajar a mayores concentraciones de  $\text{CO}_2$  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  $c_a$  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 el 0.
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 PPFDF.
2. Fijar el  $\text{CO}_2$  de referencia en 400  $\mu\text{mol s}^{-1}$  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 PPFDF, 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 autoregistro o autolog esta diseñado para registrar datos a intervalos regulares de tiempo. El usuario sólo debe fijar un valor de PPFDF, 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 PPF (A-PAR): el usuario debe fijar los valores de PPF 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 PPF. Dichos tiempos deben ser estimados en función de la especie con la que se trabaje en particular así como las condiciones de tratamiento al cual se haya sometido a la misma. Esta estimación puede realizarse mediante la realización de mediciones preliminares. El sistema entregará los valores de fotosíntesis en cada nivel de PPF y una estimación de la estabilidad de la medición (ver manual Licor 64000, 2004 para más 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:

$$Ci = \frac{\left(g_{tc} - \frac{E}{2}\right)Cs - An}{g_{tc} + \frac{E}{2}}$$

donde Ci 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; Cs concentración de  $\text{CO}_2$  en la muestra; An tasa de fotosíntesis y E transpiración. El usuario deberá ingresar el nivel de PPF, el que deberá estar dentro del rango de saturación de fotosíntesis estimado a partir de curvas A-PPF.

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 “drierite”) en buen estado.
- Cambiar frecuentemente las juntas (almohadillas) de la cámara.
- Revisar el interior de la cámara, abriendo la misma, buscando restos vegetales que interrumpen el rayo del IRGA y retirarlos con pinza fina con mucho cuidado.
- En lo posible se debe tratar de cubrirse 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. 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.

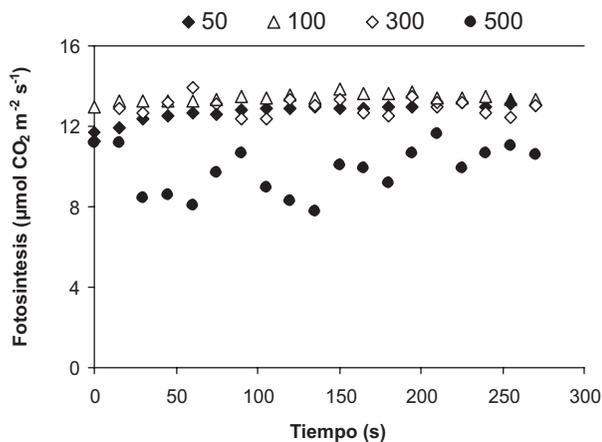
- Realizar un pre-muestreo para ajustar flujos, tiempos de espera y estabilidad en cada nivel de los autoprogramas. En las figuras 8 y 9 se muestran las diferencias en la respuesta fotosintética al variar los parámetros citados midiendo sobre una misma hoja.

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

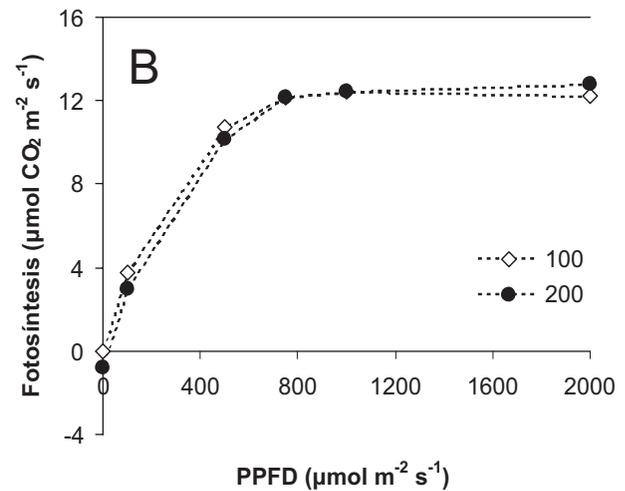
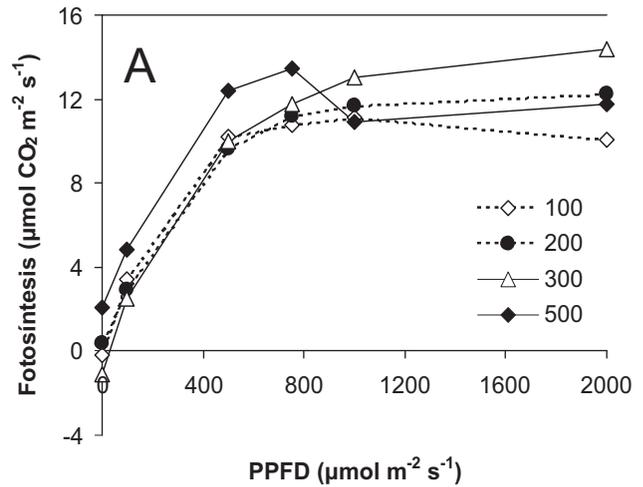
**EJEMPLO:** La figura 8 muestra tasas de fotosíntesis similares en los menores niveles de flujo ( $50, 100, 300 \mu\text{mol s}^{-1}$ ) y una disminución notable con el flujo de  $500 \mu\text{mol s}^{-1}$ . Particularmente en este caso, se podría elegir un nivel de flujo promedio de  $200 \mu\text{mol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

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).

### 3.2. Sistema abierto CIRAS-2 (PP Systems, Massa-



**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).

chusetts, 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 PAR 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 PPFD, 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 equipo 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 estabili-

dad 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 estable ( $\pm 2$  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.

Asimismo, para conocer la precisión en la determinación de diferencias entre los valores absolutos de concentración en las muestras de referencia y

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 (mL min <sup>-1</sup> )
Valores fijados por el usuario	Valores calculados
A Área Foliar (cm <sup>2</sup> )	An Tasa de fotosíntesis neta ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
V Flujo de aire (mL min <sup>-1</sup> )	E Tasa de transpiración (mmol m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
Q PAR ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Gs Conductancia estomática (mmol m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
C CO <sub>2</sub> de referencia (ppm)	Ci Concertación interna de CQ (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

de análisis, el equipo permite hacer balances de la información generada por los sensores para empaquetarlos. 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  $\text{CO}_2$  negativos y de  $\text{H}_2\text{O}$  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  $\text{CO}_2$  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 ( $A_n$ ), el cual no debe superar los  $0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  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  $25^\circ\text{C}$ . En estas curvas se establecen una serie de niveles con distintos valores, o bien de intensidad de luz o de concentración de  $\text{CO}_2$ . 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.

## CAPÍTULO 8

### TÉCNICAS DE MEDICIÓN DE INTERCAMBIO DE GASES EN PLANTAS: CURVAS DE RESPUESTA DE LA FOTOSÍNTESIS A LA LUZ Y AL CO<sub>2</sub>

**Autores:** Eduardo A Tambussi,  
Corina Graciano

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas,  
Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE),  
Universidad Nacional de La Plata.

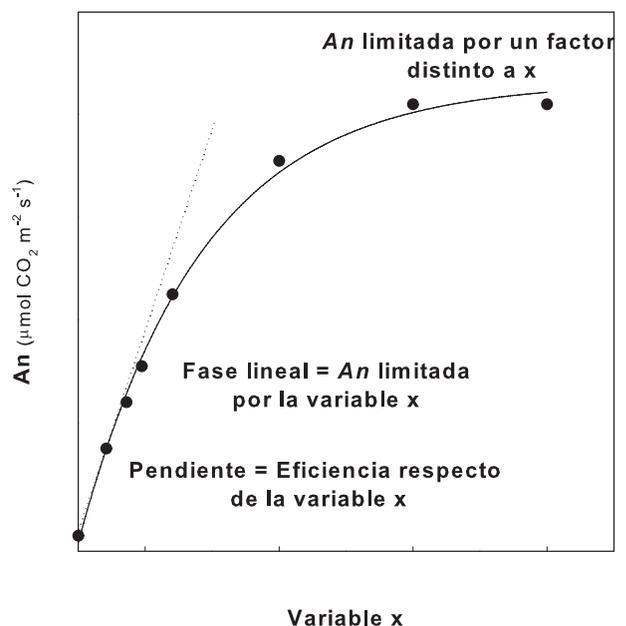
#### 1. Introducción

El uso más generalizado que han tenido los sistemas IRGA (Infra Red Gas Analyser), tanto sean de 'tipo cerrado' como de 'tipo abierto', ha sido la medición de la tasa fotosintética neta instantánea o  $A_n$  (las denominadas 'medidas puntuales' de fotosíntesis). Estas mediciones podían realizarse con la  $PPFD$  (del inglés 'Photosynthetically Photon Flux Density', o densidad de flujo fotónico fotosintético) real, es decir, el que la hoja está recibiendo *in situ*, o bien se podía obtener la tasa de asimilación a saturación lumínica ( $A_{sat}$ ; Nogués y Alegre, 2002). Este último parámetro, se realiza comúnmente utilizando una fuente de luz artificial y a niveles normales de CO<sub>2</sub> atmosférico (ca. 360 ppm). Si no se conoce el  $PPFD$  a saturación de la hoja en estudio (lo cual es variable según la especie y condiciones de crecimiento), debía suponerse un valor generalizado para plantas con metabolismo C<sub>3</sub> (800- 1200  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) o para plantas C<sub>4</sub> (ca. 1500-2000  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Ambos valores de fotosíntesis (por ej.  $A_n$  y  $A_{sat}$ ) aportan diferente información, dado que  $A_n$  nos indica *cuanto carbono está fijando una hoja* en las condiciones reales de toma de las mediciones, mientras que  $A_{sat}$  nos da una estimación de la *capacidad fotosintética de esa hoja*.

Los equipos IRGAs de tipo cerrado, que además aportaban otros datos tales como la conductancia estomática y la tasa transpiratoria, nos indican poco sobre las posibles causas subyacentes al valor observado de tasa fotosintética. Con la aparición

en el mercado de sistemas IRGA de 'tipo abierto', que permiten un control preciso de las variables ambientales en la cámara de medición (tales como temperatura, humedad y niveles de CO<sub>2</sub>, además de la irradiancia) otros usos se hicieron posibles (ver detalles de los diferentes IRGAs en Capítulo 7). Se generalizó así el uso de los equipos IRGA para estudiar no sólo la tasa fotosintética puntual, sino otros parámetros derivados de las curvas de respuesta de la  $A_n$  vs. la irradiancia o vs. el CO<sub>2</sub>. Estas curvas de repuesta permiten estudiar las posibles causas que determinan (o limitan) la tasa fotosintética en determinadas situaciones. En este capítulo analizaremos: (1) Curvas de respuesta  $A_n$  / luz; (2) Curvas de respuesta  $A_n$  / CO<sub>2</sub>. Adicionalmente comentaremos brevemente la respuesta de  $A_n$  al oxígeno y su posible interés.

Conceptualmente, los dos tipos de curva mencionados consisten en la medición de la tasa fotosintética neta ( $A_n$ ) ante diversos niveles de la variable ambiental considerada ( $PPFD$  o CO<sub>2</sub>), manteniendo constante el resto de las variables. Se obtiene una curva como la mostrada en la figura 1. Típicamente, esta curva posee una fase inicial lineal (o cuasi lineal) en la que el factor en estudio ( $PPFD$  o CO<sub>2</sub>) es el limitante de  $A_n$ . Luego la curva muestra saturación



**Figura 1:** Curva genérica de respuesta de la  $A_n$  a una variable (ej. CO<sub>2</sub> o luz).

a niveles más elevados de la variable considerada. Las limitantes que actúan en estas condiciones dependen del tipo de curva considerado (ver más adelante).

A continuación, se desarrollan los aspectos puntuales de estos dos tipos de curvas de respuesta.

## 2. Curvas de fotosíntesis versus luz (PPFD)

### 2.1. Fundamentos y parámetros

Tomando como modelo la curva generalizada mostrada la figura 1, se obtiene una curva de respuesta de la tasa fotosintética al PPFD. En la figura 2a se muestran algunos puntos clave de la curva y la información que aportan.

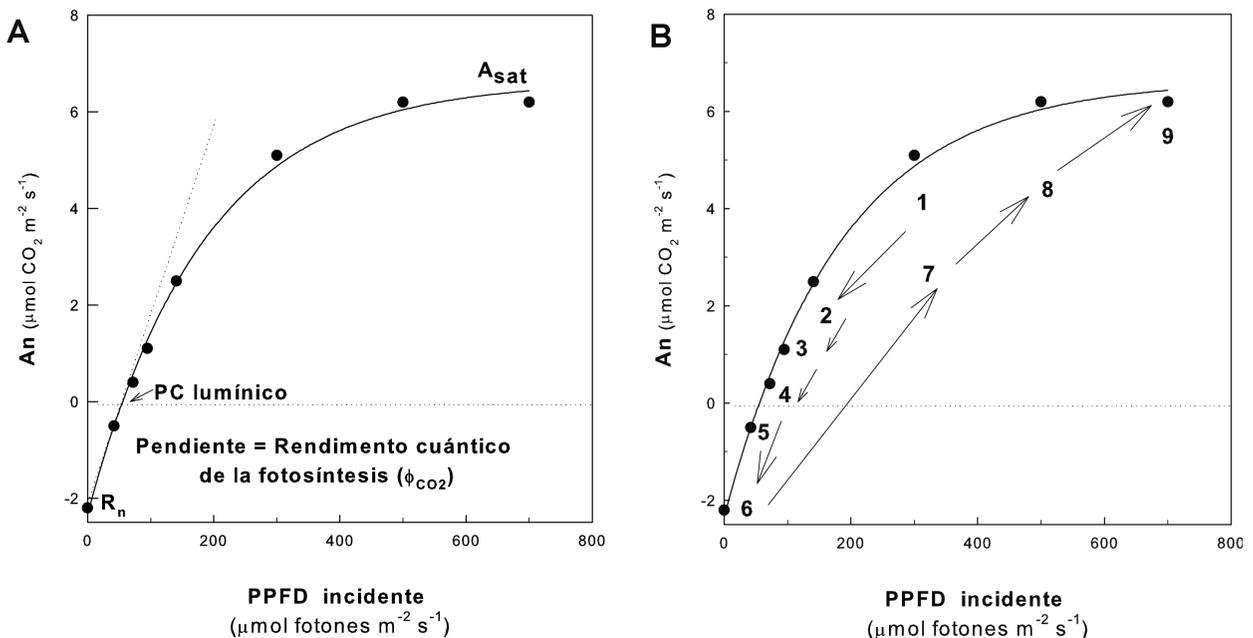
Básicamente, estos parámetros son:

(I) En el punto de intersección de  $A_n$  con valores de PPFD de 0 (en oscuridad), obtenemos una estimación de la tasa respiratoria mitocondrial aparente o  $R_n$  (por convención los valores  $A_n$  son positivos y los  $R_n$  se toman como negativos). Mejor

que extrapolando los valores de la fase lineal, este valor puede medirse realmente (colocando la hoja a PPFD = 0).

(II) En el punto de intersección de la curva con el eje de abscisas (o sea, a valores de  $A_n = 0$ ) se encuentra el punto de compensación lumínico (PC lumínico). Este valor suele ser menor en plantas y hojas aclimatadas a la sombra que en plantas u hojas expuestas a mayor irradiancia, debido principalmente a que los valores de respiración son inferiores en plantas aclimatadas a la sombra (Copman *et al.*, 2008; Valladares y Niinemets, 2008). El tipo de metabolismo fotosintético ( $C_3$  o  $C_4$ ) también es importante, ya que las plantas  $C_4$  tienen PC luz mayores que las  $C_3$ .

(III) La pendiente inicial en la fase lineal de la curva  $A_n/PPFD$  (donde  $A_n$  está limitado por la luz) es el rendimiento cuántico aparente de la fotosíntesis (von Caemmerer, 2000), expresado en  $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol fotones}^{-1}$  ( $\phi_{\text{CO}_2}$ ). Para calcular el  $\phi_{\text{CO}_2}$  sólo se consideran aquellos puntos que se ajustan a una recta, es decir utilizando los valores más bajos de PPFD. En hojas de plantas  $C_3$  que no estén sometidas a factores de estrés, valores de  $\phi_{\text{CO}_2}$  del



**Figura 2:** **A.** Curva de respuesta de la fotosíntesis al PPFD (densidad de flujo fotónico fotosintético) y los parámetros calculados a partir de ésta. Abreviaturas:  $A_{\text{sat}}$ , tasa fotosintética máxima a saturación de luz;  $R_n$ , tasa respiratoria mitocondrial (oscuridad) aparente. PC, punto de compensación lumínico;  $\phi_{\text{CO}_2}$ , rendimiento cuántico de la fotosíntesis. **B.** Secuencia de puntos de medición de  $A_n$  a diferentes niveles de PPFD para la obtención de la curva. El punto (1) correspondería a una hoja aclimatada previamente a esa PPFD.

orden de 0.025-0.03  $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol fotones}^{-1}$  pueden ser observados (Nogués y Baker, 1995).

(IV) El valor de  $An$  cuando la curva alcanza el *plateau* (es decir, cuando la fotosíntesis se satura respecto de la *PPFD*) es la capacidad fotosintética a saturación de luz, o  $A_{sat}$  <sup>(1)</sup>. En este punto la  $An$  ya no está limitada por la *PPFD*, sino por otros factores (fundamentalmente,  $\text{CO}_2$ ). El valor de  $A_{sat}$  es muy variable según la especie y condición de la planta. Para plantas  $C_3$  valores de hasta 20-30  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  pueden ser registrados, observándose valores menores para plantas sometidas a algún tipo de limitación ambiental. Plantas crecidas en cámaras de crecimiento (en general, con bajas *PPFD*), suelen tener valores de  $A_{sat}$  menores (por ej. en el orden de 10-15  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). En especies leñosas las tasas fotosintéticas suelen ser más bajas que en herbáceas. Algunos de los muchos ejemplos publicados, son valores entre 12-20  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus* (Huang *et al.*, 2008) y menos de 8  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  en plantas jóvenes de *Pinus* (King *et al.*, 2008; Tyree *et al.*, 2009) y de *Quercus* (Rodríguez-Calcerrada *et al.*, 2008). De todas maneras, hay que considerar que  $A_{sat}$  varía con la edad de la hoja, según la posición de la hoja en el canopy (hojas sombreadas tienen menor  $A_{sat}$  que hojas expuestas) (Iio *et al.*, 2009) y con la ontogenia de la planta (los árboles jóvenes suelen tener  $A_{sat}$  menores que árboles de mayor edad) (Coopman *et al.*, 2008; Joesting *et al.*, 2009).

## 2.2. Algunas aclaraciones respecto de la curvas de fotosíntesis vs *PPFD*

A continuación se mencionan algunos comentarios acerca de la medición de la tasa respiratoria y del rendimiento cuántico de la fotosíntesis.

1) *Tasa respiratoria aparente*: Dado que existe controversia acerca de cuál es la tasa respiratoria cuando la hoja está iluminada (Tcherkez *et al.*, 2008), llamamos 'aparente' a esta tasa respiratoria. Recientemente se ha demostrado que la tasa respiratoria a la luz ( $R_d$ ) es menor que en oscuridad (Tcherkez *et al.*, 2008) y dependiente, por ejemplo, de las condiciones previas. Por esta razón, el dato

de tasa respiratoria obtenido con esta metodología debe tomarse con cierta cautela. Existen métodos específicos para estimar la tasa respiratoria a la luz que pueden ser utilizados (ver, por ej. el método 'de Laisk' en Atkins *et al.*, 2000).

También es necesario mencionar (válido también para las medidas de fotosíntesis en general) que dado que estas tasas son expresadas por unidad de área foliar, debe conocerse el área foliar y mejor aun el área foliar específica (*SLA*, relación área foliar/peso foliar). Diferencias en *SLA* evidencian variación en espesor (o eventualmente, mayor o menor empaquetamiento de las células; Poorter, 1989) y, por tanto, en cantidad de tejido. Por esta razón, y antes de inferir conclusiones de índole fisiológica, deben descartarse diferencias en *SLA* y, por tanto, de la cantidad de tejido implicado en la medida. En casos de existir diferencias en *SLA* (entre especies, genotipos o tratamientos), lo más aconsejable es expresar también las tasas en base a unidades de peso foliar.

2) *Rendimiento cuántico aparente*: Existen dos posibles fuentes de error al medir este parámetro (Long *et al.*, 1996). En primer lugar, el sensor de luz debe estar en la posición exacta respecto de la hoja, lo cual rara vez ocurre. Además, dado que el rendimiento cuántico se mide en el sector de la curva próximo al punto de compensación, el diferencial de  $\text{CO}_2$  es mínimo y los errores en la medición de  $An$  son máximos (por ejemplo, tener especial cuidado con las fugas en la cámara de medición). Finalmente, debe usarse también aquí el término 'aparente', ya que la estimación se hace en base a la *PPFD* incidente y no a la realmente absorbida por la hoja. Para conocer la absorción de la hoja se requiere el uso de una esfera integradora (ver Long *et al.*, 1996), aunque las hojas de diversas especies tienen valores bastante conservados, próximos a 0.85 (von Caemmerer, 2000).

## 2.3. Obtención de la curva $An/PPFD$

La construcción de estas curvas requiere medir la  $An$  a diferentes *PPFD*, manteniendo la concentración de  $\text{CO}_2$  constante a niveles atmosféricos (360 ppm). El número de puntos debe ser un compromiso entre inversión de tiempo y la obtención de una curva satisfactoria. Los equipos tales como

el LICOR 6400 o el CIRAS-2 poseen un panel de LEDs (*Light Emitting Diodes*) que permiten un control exacto de la *PPFD* en el rango entre 0 y 2000  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Si no se dispone de esos equipos, pueden realizarse curvas calibrando la *PPFD* a diferentes valores utilizando un fuente de luz artificial (tipo dicroica u otra). En estos casos es conveniente eliminar la radiación infra-roja de las lámparas por ejemplo con un baño de agua, con el fin de evitar sobrecalentamiento de la hoja. Los diferentes valores de *PPFD* pueden obtenerse con mallas (espectralmente neutras) y variando la distancia de la fuente de luz. Los reguladores de intensidad tipo 'dimmer' deben ser evitados ya que alteran la composición espectral de la luz.

En la figura 2b se muestra cual sería la secuencia de valores de *PPFD* aconsejable para construir la curva:

(Paso 1) Lo más adecuado es comenzar por una *PPFD* similar al que se encontraba previamente la hoja, para evitar demoras en la aclimatación. Si la hoja se encontraba previamente a muy bajas *PPFD* o incluso en oscuridad (por ej. estomas cerrados, Rubisco y otras enzimas inactivas, etc.), se debe iluminar la hoja durante unos 30 minutos previos a comenzar la curva con el *PPFD* deseado, dependiendo de la especie (periodo de aclimatización)

(Pasos 2 a 6) Medir *An* a menores valores de *PPFD*, descendiendo hasta *PPFD* = 0 (oscuridad).

(Paso 7) Volver a medir la *An* al *PPFD* inicial (paso 1). Los valores de *An* medidos en (1) y (7) deben ser similares, aunque puede producirse cierta histéresis. De observarse que el valor de *An* en el paso (7) es sensiblemente inferior al de (1), esto podría deberse a cierre estomático. En este caso deberá esperarse hasta alcanzar valores de *An* similares al paso (1) o bien modificar el protocolo de la curva. Una opción es medir primero los valores a altos *PPFD* (zona de saturación) y luego los valores a bajos *PPFD* (fase lineal). En este caso hay que chequear que no se están utilizando valores demasiado altos de *PPFD* en la parte de saturación de la curva, lo cual podría producir fotoinhibición.

(Pasos 8 y 9) Tomar medidas de *An* a *PPFD* mayores hasta observar saturación. Otra alternativa, si

ya se conoce la respuesta al *PPFD* de nuestro material de trabajo, es comenzar con las irradiancias altas e ir descendiendo. Pero si no se conoce este valor, es aconsejable seguir el protocolo descrito, para evitar medir puntos superfluos (por encima de saturación) tanto como para evitar fotoinhibición.

*Tiempos de medida requeridos en cada nivel de PPFD:* el criterio definitivo para determinar el tiempo que demanda la aclimatación a cada nivel de *PPFD* es alcanzar valores de estabilidad. Los equipos IRGA disponibles en el mercado tales como el LICOR 6400 o el CIRAS-2 (PP System) muestran gráficos que permiten monitorear los cambios de *An* en el tiempo, y establecer así criterios de estabilidad adecuados. En curvas de luz de muchas especies, tiempos de 10 minutos (o incluso menores) por cada *PPFD* suelen ser suficientes para alcanzar la estabilidad a la nueva condición.

*Medición de la respiración:* Una mención especial merece la medida de la respiración. En los momentos posteriores a la transición luz-oscuridad suelen originarse los llamados 'bursts' fotorrespiratorios post iluminación (pico de emisión de  $\text{CO}_2$ , debido al consumo de ácidos orgánicos acumulados, en los primeros segundos de la transición luz-oscuridad) y otro pico de emisión de  $\text{CO}_2$  de origen respiratorio minutos después (Atkins *et al.*, 2000; Barbour *et al.*, 2007). Por esta razón, debe tenerse especial cuidado en el tiempo de espera en esta medida.

*Ajuste de la curva:* según los modelos de fotosíntesis más aceptados, la respuesta *An/PPFD* es una hipérbola no rectangular (Ögren, 1993). El ajuste de la curva puede realizarse con programas de graficación convencional, tales como Sigma Plot® o Table Curve®.

Además de la obtención de los parámetros mencionados, las curvas de respuesta a la luz pueden tener otras utilidades. Por ejemplo, si se desea estimar la tasa fotosintética de hojas de un canopeo de las que se conoce la *PPFD* que reciben (pero por cuestiones prácticas no es posible medir *An*, por ej. hojas en árboles de gran altura), la curva de respuesta *An/PPFD* puede brindarnos información en este sentido. La curva puede realizarse en hojas de ramas cortadas (siempre que se asegure un suministro constante de agua). Luego, con los valores de *PPFD* realmente medidos *in situ*, es

posible estimar la  $A_n$  de cada hoja en particular. Probablemente en este caso debería realizarse una curva para grupos de hojas funcionalmente similares (por ej, con similar ubicación en el canopeo, contenido de nitrógeno u otro criterio).

### 3. Curvas de respuesta $A_n$ versus $CO_2$

#### 3.1. Fundamentos y parámetros derivados

Aunque conceptualmente similares a las curvas de  $A_n$  vs.  $PPFD$ , las curvas de respuesta  $A_n/CO_2$  tienen algunas peculiaridades a destacar. En primer lugar, los datos de la variable independiente (en abscisas) son expresados no como la concentración ambiental de  $CO_2$  (la variable realmente controlada en el equipo) sino como la concentración intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ). Este es una variable calculada (no directamente medida), lo que genera algunas incertezas y problemas en la interpretación de las curvas y los parámetros que de ésta se calculan. Esto debe

tenerse en cuenta en determinadas condiciones que serán descritas en detalle más adelante.

En la figura 3a se muestra una curva idealizada de respuesta al  $CO_2$  y los parámetros que se pueden derivar de ella. Es importante aclarar que estas curvas de respuesta al  $CO_2$  se realizan a saturación de  $PPFD$ .

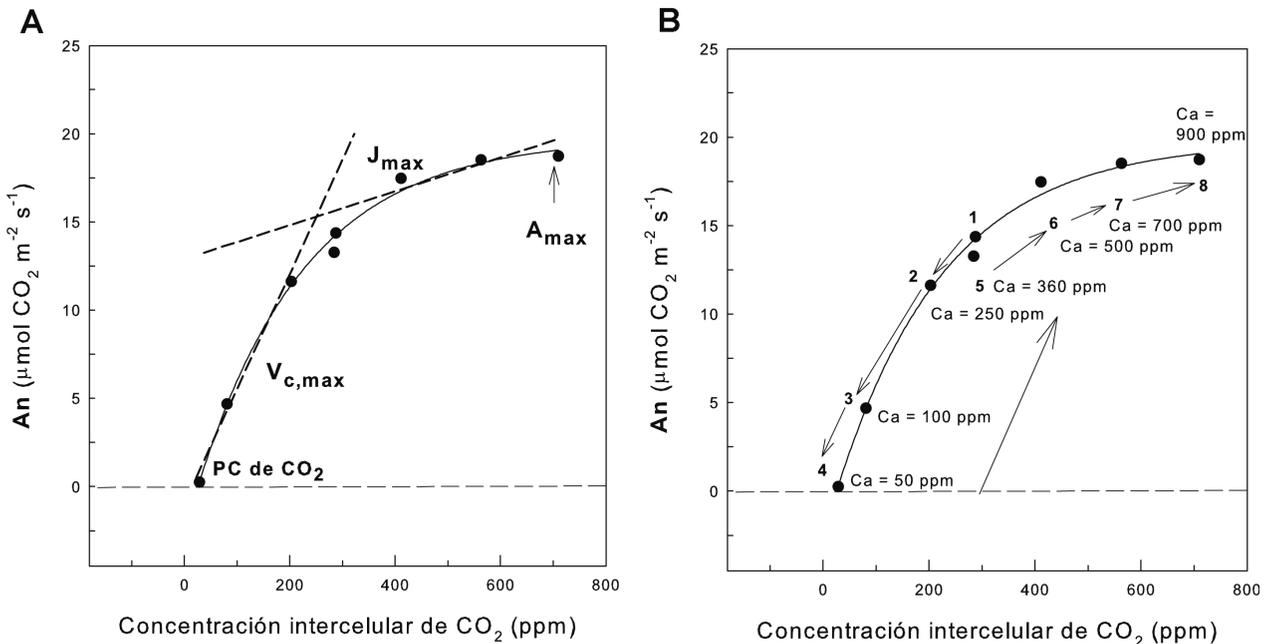
Los parámetros de la curva son:

(I) En el punto de intersección de  $A_n$  con valores de  $CO_2$  de 0 obtenemos una estimación de la tasa respiratoria mitocondrial aparente o  $R_n$  (por convención los valores

$A_n$  son positivos y los  $R_n$  se toman como negativos).

(II) Punto de compensación de  $CO_2$  ( $\Gamma$ ): es la concentración intercelular de  $CO_2$  que se requiere para tener una fotosíntesis neta igual a cero.

(III) Máxima velocidad de carboxilación de la enzima Rubisco ( $V_{c,max}$ ): es la pendiente inicial de la fase lineal de la curva (medida en  $\mu\text{mol } CO_2$



**Figura 3: A.** Curva típica de respuesta de la fotosíntesis al  $CO_2$  y los parámetros calculados a partir de ésta. La concentración de  $CO_2$  es expresada en términos del  $CO_2$  intercelular ( $C_i$ ). Abreviaturas:  $A_{max}$ , tasa fotosintética máxima a saturación de  $CO_2$ ;  $J_{max}$ , tasa potencial de transporte de electrones que participa de la regeneración de la Ribulosa 1,5-bifosfato;  $V_{c,max}$ , máxima velocidad de carboxilación de la enzima Rubisco. La limitación estomática no está representada (ver texto). **B.** Secuencia de puntos de medición de  $A_n$  a diferentes ppm de  $CO_2$  para la obtención de la curva. Próximo a cada punto se especifica la concentración del  $CO_2$  de la cámara ( $C_a$ ). Nótese que el  $C_i$  es igual a aproximadamente un 70-80% respecto del  $C_a$ . Los puntos de medición denotados como 1 y 5 ( $C_a = 360$  ppm) son conceptualmente idénticos a la  $A_{sat}$  obtenida en las curvas de luz.

$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ). La correlación entre  $V_{c,max}$  (*in vivo*) y la actividad carboxilasa de la Rubisco medida (*in vitro*) ha sido bien documentada (von Caemmerer y Farquhar, 1981).

(IV) Tasa fotosintética máxima a saturación de  $\text{CO}_2$  ( $A_{max}$ ).

(V) Limitación estomática ( $I$ ): se calcula como  $[(A_0 - A_{sat})/A_0 \times 100]$ , donde  $A_0$  es la tasa fotosintética que se observa a un  $C_i$  de 360 ppm, y  $A_{sat}$  es la tasa fotosintética a un  $C_a = 360$  ppm (Nogués *et al.*, 2004). El valor de  $A_0$  es la tasa fotosintética que se observaría con un valor de conductancia infinita, donde no existen limitantes estomáticas. Es decir,  $I$  representa la disminución proporcional de  $A_{sat}$  atribuible a los estomas. Valores cercanos al 15-20 % pueden observarse en plantas sin estrés (Nogués y Alegre, 2002; Tambussi *et al.*, 2005), ascendiendo a valores de hasta 50-60% en plantas que presentan cierre estomático por estrés hídrico (Nogués y Alegre, 2002).

(VI) Tasa máxima de transporte de electrones que participa de la regeneración de la Ribulosa 1,5-bifosfato ( $J_{max}$ ). Este parámetro se calcula en el sector de saturación de la curva de respuesta  $An/C_i$ . Está ampliamente aceptado que la tasa fotosintética a altos niveles de  $\text{CO}_2$  es limitada por la regeneración del aceptor primario del  $\text{CO}_2$ , o sea la Ribulosa 1,5-bifosfato o RuBP (von Caemmerer y Farquhar, 1986). La pendiente de este sector de la curva es utilizada para calcular  $J_{max}$  (ver Nogués y Alegre, 2002 y referencias citadas allí). Valores de  $J_{max}$  del orden de 200-300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  son frecuentes en plantas no sometidas a estrés, pero puede descender notablemente en diferentes situaciones de estrés abiótico o biótico (Nogués y Alegre, 2002).

La disminución en el parámetro  $V_{c,max}$  (por ej. ante un factor de estrés, senescencia) puede ser un indicador de pérdida y/o inactivación de la enzima Rubisco, mientras que disminuciones de  $J_{max}$  sugieren un posible decrecimiento en la capacidad de regenerar al aceptor primario de  $\text{CO}_2$ , la RuBP. Esto a su vez puede relacionarse con diferentes procesos, por ejemplo la síntesis de ATP (Mitchell *et al.*, 2000; Lawlor y Cornic, 2002). Por otra parte, ante un factor de estrés, cambios en el PC de  $\text{CO}_2$  ( $\Gamma$ ) pueden asociarse con diferentes causas, tales como modificaciones en la emisión de  $\text{CO}_2$  (respirato-

ria y fotorrespiratoria) o a cambios en la asimilación (Lawlor y Cornic, 2002).

### 3.2. Realización de la curva

La curva se construye midiendo  $An$  a diferentes concentraciones ambientales (o sea, en la cámara de medición) de  $\text{CO}_2$  ( $C_a$ ) manteniendo las otras variables constantes ( $T^\circ$ , humedad, y sobretodo  $PPFD$  saturante). La curva debe hacerse a saturación de luz y para asegurarnos esta condición, se utilizan valores de 1200-1500  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (al menos en plantas con metabolismo  $C_3$ ). En cuanto a la temperatura, y al igual que en las curvas de luz, la condición estándar es 25  $^\circ\text{C}$ , pero esto depende de los objetivos del estudio y de la especie analizada.

Los valores de  $\text{CO}_2$  ( $C_a$ ) que se suelen utilizar son: 50, 100, 250, 360, 500, 700 y 900 ppm (Tambussi *et al.*, 2005). La secuencia de mediciones adecuada se indica en la figura 3b:

(Paso 1) Se inicia la curva midiendo  $An$  a la concentración atmosférica de  $\text{CO}_2$  (aprox. 360 ppm)

(Pasos 2 a 4) Se mide  $An$  a los valores menores de  $C_a$  ( $< 360$  ppm; fase lineal de la curva)

(Paso 5) Se vuelve a tomar la medición a 360 ppm (como en el paso 1). Ambas medidas (paso 1 versus paso 5) deben ser similares una vez que se llega a la estabilidad.

(Pasos 6 a 8) Luego se toman los valores de 500, 700 y 900 ppm. Debe tenerse en cuenta que en cada punto (*por ej.* en cada concentración de  $\text{CO}_2$ ) de este tipo de curvas se requiere llegar primero a la estabilidad del sistema (estabilización del  $\text{CO}_2$  de referencia a la condición requerida) y luego a la estabilidad fisiológica (aclimatación de la hoja a la nueva condición). Nuevamente, esto se realiza monitoreando los cambios del  $\text{CO}_2$  de referencia y de  $A_n$  (estabilidad del sistema y de la hoja respectivamente) en la pantalla del equipo IRGA. Por esta razón, cada punto de las curvas  $An/C_i$  demanda un poco más de tiempo que las curvas de luz.

#### 3.2.1. Cálculo de los parámetros asociados a las curvas $A/C$

Desde el punto de vista del análisis de los datos, en el artículo de Sharkey *et al.* (2007) (ver detalles

en el listado de referencias bibliográficas) se provee información de un *link* para bajar de manera gratuita un software diseñado para Excel (Microsofts Windows) que permite el cálculo automático de los parámetros de las curvas  $A/C_i$ . En la misma página web se provee un archivo Word donde se indica qué modificación hay que hacer en los macros de Excel de manera de que el programa funcione satisfactoriamente.

### 3.3. Algunas consideraciones respecto a las curvas $A/C$

Existen algunos factores que pueden agregar incertidumbre en la interpretación de estas curvas, en particular en determinadas situaciones. Ellos son: (a) Impacto de la transpiración cuticular; (b) Cierre estomático no-uniforme ('*stomatal patchiness*') y (c) Incrementos de la resistencia del mesófilo. A continuación discutimos en detalle cada uno de estos problemas.

#### 3.3.1. Impacto de la transpiración cuticular

En primer lugar, y como se explicó anteriormente, las curvas de respuesta fotosíntesis/ $CO_2$  se expresan en base a la concentración (o a la presión parcial) de  $CO_2$  en la cavidad subestomática, comúnmente referida como  $C_i$  o concentración intercelular de  $CO_2$  (von Caemmerer, 2000). En los IRGA antes mencionados, el parámetro  $C_i$  es un valor calculado a partir de la relación:

$$A_n = g_s (C_a - C_i)$$

donde  $A_n$  es la tasa fotosintética neta,  $g_s$  es la conductancia estomática y  $C_a$  y  $C_i$  son la concentración ambiental e intercelular de  $CO_2$  respectivamente (Mc Murtrie y Wang, 1993).

Dado que la conductancia estomática es calculada a partir de la meditranspiración, con estomas muy cerrados (por ej. durante un estrés hídrico severo) comienza a tener más importancia la transpiración no estomática (residual o 'cuticular'; Boyer *et al.*, 1997). Ya que las pérdidas de agua por transpiración cuticular no están acopladas a la entrada de  $CO_2$  por difusión, el cálculo de  $C_i$  por este modelo comienza a ser erróneo. Para corregir los valores de  $g_s$  por la transpiración cuticular

puede consultarse el trabajo de Boyer *et al.* (1997), pero esto sólo es necesario a valores muy bajos de conductancia estomática (valores de  $g_s$  menores a  $30 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). A valores mayores de  $g_s$ , el error no parece ser importante (Flexas *et al.*, 2002).

#### 3.3.2. Cierre no-uniforme de los estomas ('*patchiness*')

El '*patchiness*' es un fenómeno que consiste en el cierre no uniforme de los estomas en diferentes partes de la hoja, creando '*parches*' de zonas con mayor o menor conductancia estomática (Sharkey y Seemann, 1989; Mott *et al.*, 1993). La difusión lateral que se produce en el interior de la hoja minimiza esta conductancia desigual en diferentes sectores. Sin embargo, cuando la hoja posee prolongaciones de tejido lignificado (por ej. esclerénquima) desde los haces vasculares hacia la epidermis, se generan zonas aisladas entre sí desde el punto de vista del intercambio de gases. Es decir, la difusión lateral es obstaculizada en este tipo de hojas llamadas 'heterobáricas' (en contraposición a hojas homobáricas, las cuales poseen buena difusión lateral; Terashima, 1992). En estos casos, el fenómeno de '*patchiness*' es más importante, y conduce a errores en el cálculo de la  $C_p$ , y por lo tanto, la curva  $A_n/C_i$  no es confiable, así como tampoco lo son los parámetros derivados de ésta. Aunque es un tema controvertido (Lawlor y Tezara, 2009), el '*patchiness*' es importante en casos tales como el estrés hídrico impuesto en forma rápida (caídas abruptas del contenido relativo de agua) o con aplicaciones exógenas de ABA, y en particular en hojas heterobáricas (Terashima, 1992). En estos casos, la realización de curvas  $A_n/C_i$  debe ser analizada previamente, para descartar este tipo de problemas antes de invertir demasiada energía y tiempo en el estudio. Para conocer si hojas de diferentes especies son homo- o heterobáricas puede recurrirse a la bibliografía disponible (Terashima, 1992). Algunos autores, sin embargo, han relativizado la importancia del '*patchiness*' (Lawlor y Tezara, 2009).

#### 3.3.3. Incrementos en la resistencia del mesófilo: ¿Concentración intercelular o cloroplástica de $CO_2$ ?

Más recientemente, algunos autores prefieren expresar la concentración de  $\text{CO}_2$  en el sitio efectivo de carboxilación, o sea el cloroplasto, es decir, se utiliza  $C_c$  en lugar de  $C_i$  (Medrano *et al.*, 2002). Esto se debe a que en determinadas situaciones aumenta la resistencia del mesófilo al flujo de  $\text{CO}_2$ , hasta la Rubisco, tal como ocurre en situaciones de déficit hídrico. En casos como éste puede producirse un colapso parcial del tejido por pérdida de turgencia y el consiguiente aumento de la resistencia al movimiento difusivo de  $\text{CO}_2$ . Esto conduce a valores de  $C_i$  muy diferentes a  $C_c$  y en este caso las curvas deben ser re-analizadas por este último parámetro (Medrano *et al.*, 2002). Existen modelos para la estimación de  $C_c$ , combinando medidas de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila, pero escapan a los alcances de este trabajo (ver por ej. Flexas *et al.*, 2002; Lawlor y Tezara, 2009).

Como conclusión general, podemos afirmar que excepto determinadas situaciones puntuales (por ej. estrés hídrico severo, donde las curvas  $A_n/\text{CO}_2$  poseen objeciones que deben tenerse en cuenta a la hora de decidir utilizar este tipo de metodologías), las curvas  $A_n/\text{CO}_2$  pueden reportar información útil al (eco) fisiólogo vegetal. Para una discusión actualizada de estas cuestiones, ver Lawlor y Tezara (2009).

#### 4. Manipulación del nivel de oxígeno (condiciones no-fotorrespiratorias)

Finalmente, mencionaremos brevemente otro uso que puede hacerse de los sistemas IRGA de tipo abierto. Nos referimos a la manipulación de los niveles de  $\text{O}_2$  en la cámara de medición, que puede resultar de utilidad, por ejemplo, en la exploración del metabolismo fotosintético de una especie ( $C_3$  vs  $C_4$ ). La estimulación de la  $A_n$  medida en condiciones no-fotorrespiratorias (por ej. 2% de  $\text{O}_2$ ) es considerada una evidencia que, junto a otros indicadores (por ej. altos valores de discriminación isotópica

del  $^{13}\text{C}$ ), nos indican la existencia de metabolismo  $C_3^2$ .

Es posible manipular la concentración de  $\text{O}_2$  del aire de entrada al sistema, realizando una mezcla de  $\text{N}_2$  y aire atmosférico 10:1 v/v, es decir llevando la concentración atmosférica de  $\text{O}_2$  del 21 % al 2 % (Nogues y Baker 1995; Tambussi *et al.*, 2005). Dado que estos sistemas están provistos de un inyector de  $\text{CO}_2$ , éste será regulado en forma independiente por el equipo tal como se hace en otras situaciones. Al menos el IRGA LICOR 6400 permite este tipo de prestaciones utilizando un mezclador de aire fabricado *ad hoc* (para otro equipos IRGA, consultar el manual del fabricante).

#### 5- Bibliografía

- Atkins OK, AH Millar, P Gardeström y D A Day (2000) Photosynthesis, carbohydrate metabolism and respiration in leaves of higher plants. En *Advances in Photosynthesis vol 9 'Photosynthesis: Physiology and Metabolism'*. Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S (Eds.). Kluwer Academic Press, Arizona, USA. pp. 153-175.
- Barbour Margaret M, G McDowell Nate, Tcherkez Guillaume, P Bickford Christopher y T Hanson David (2007) A new measurement technique reveals rapid post-illumination changes in the carbon isotope composition of leaf-respired  $\text{CO}_2$ . *Plant Cell Environ.* 30: 469-482.
- Boyer J S, S C Wong y G D Farquhar (1997)  $\text{CO}_2$  and water vapour exchange across leaf cuticle (epidermis) at various water potentials. *Plant Physiol.* 114: 185-191.
- Coopman RE, M Reyes-Diaz, V F Briceño, L J Corcuera, H M Cabrera y L A Bravo (2008) Changes during early development in photosynthetic light acclimation capacity explain the shade to sun transition in *Nothofagus nitida*. *Tree Physiol.* 28:1561-1571.
- Flexas J, J Bota, JM Escalona, B Sampol y H Medrano (2002) Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: and evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Funct. Plant. Biol.* 29:461-471.
- Huang Z, Z Xu, T J Blumfield y K Bubb (2008) Variations in relative stomatal and biochemical limitations to photosynthesis in a young blackbutt (*Eucalyptus pilularis*) plantation subjected to different weed control regimes. *Tree Physiol.* 28:997-1005.

<sup>2</sup> Debe aclararse que lo contrario no es necesariamente cierto: la ausencia de estimulación de la fotosíntesis a bajos niveles de  $\text{O}_2$  no permite afirmar la existencia de metabolismo  $C_4$ . Otras causas (v.g. limitación por fosfato) pueden explicar la ausencia de estimulación de la fotosíntesis en condiciones no-fotorrespiratorias aún en plantas  $C_3$  (Leegood 1989).

- lio A, H Fukasawa, Y Nose, M Naramoto, H Mizunaga y Y Kakubari (2009) Within-branch heterogeneity of the light environment and leaf temperature in a *Fagus crenata* crown and its significance for photosynthesis calculations. *Trees - Structure and Function*. 23:1053-1064.
- Joesting H M, B C McCarthy y K J Brown (2009) Determining the shade tolerance of American chestnut using morphological and physiological leaf parameters. *Forest Ecology and Manag.* 257:280-286.
- King N T, J R Seiler, T R Fox, y K H Johnsen (2008) Post-fertilization physiology and growth performance of loblolly pine clones. *Tree Physiol.* 28:703-711.
- Lawlor D W, G Cornic (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficit in higher plants. *Plant, Cell and Environ.* 25: 275-294.
- Lawlor D W y W Tezara (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann Bot.* 103: 561-579.
- Leegood R C (1989) Biochemical studies of photosynthesis: from CO<sub>2</sub> CO<sub>2</sub> to sucrose. En *Photosynthesis*, Alan R. Liss Inc. pp. 457-473.
- Long S P, P K Farage y R L Garcia (1996) Measurement of leaf and canopy photosynthetic CO<sub>2</sub> exchange in the field. *J. Exp. Bot.* 1629-1642.
- Loreto F, S Delfine y G Di Marco (1999) Estimation of photorespiratory carbon dioxide recycling during photosynthesis. *Aust. J. Plant Physiol.* 26:733-736.
- Mc Murtrie R E y Y P Wang (1993) Mathematical models of the photosynthetic response of tree stands to rising CO<sub>2</sub> concentration and temperatures. *Plant cell Environ.* 16: 1-13.
- Medrano H, J M Escalona, J Bota, J Gulías y J Flexas (2002) Regulation of photosynthesis of C<sub>3</sub> plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Ann Bot.* 89: 895-905.
- Mitchell R A, J C Theobald, M A Parry y D W Lawlor (2000) Is there scope for improving balance between RuBP-regeneration and carboxylation capacities in wheat at elevated CO<sub>2</sub>. *J Exp. Bot.* 51: 391-397.
- Mott KA, Z G Cardon y J A Berry (1993) Asymmetric patchy stomatal closure for the two surfaces of *Xanthium strumarium* L. leaves at low humidity. *Plant Cell Environ.* 16: 25-34.
- Nogués S y L Alegre (2002) An increase in water deficit has no impact on the photosynthetic capacity of field-grown Mediterranean plants. *Funct. Plant Biol.* 29: 621-630.
- Nogués S y N R Baker (1995) Evaluation of the role of damage to photosystem II in the inhibition of CO<sub>2</sub> assimilation in pea leaves on exposure to UV-B radiation. *Plant, Cell Environ* 18: 781-787.
- Nogués S, E Tambussi y J L Araus (2004) Adaptation to water stress: methodologies for the study of the photosynthetic response. En: 'Durum wheat breeding: current approaches and future strategies'. Royo C, MN Nachit, Di N Fonzo, JL Araus, WH Pfeiffer., GA Slafer.(Ed.). Food Product Press, New York, USA.
- Ögren E (1993) Convexity of the photosynthetic light-response curve in relation to intensity and direction of light during growth. *Plant Physiol.* 101: 1013-1019.
- Poorter H (1989) Interspecific variation in relative growth rate: on ecological causes and physiological consequences. En, Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants Lambers H, Cambridge ML, Konings H, Pons TL; Eds.), SPB Academic Publishing, The Hague. pp.45-68
- Rodríguez-Calcerrada J, J A Pardos, L Gil y I Aranda (2008) Ability to avoid water stress in seedlings of two oak species is lower in a dense forest understory than in a medium canopy gap. *Forest Ecology and Manag.* 255:421-430.
- Sharkey T D y J R Seemann (1989) Mild water stress effects on carbon-reduction-cycle intermediates, Ribulose Bisphosphate carboxylase activity, and spatial homogeneity of photosynthesis in intact leaves. *Plant Physiol.* 89: 1060-1065.
- Sharkey T D, C J Bernacchi, G O Farquhar y E L Singaas (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C<sub>3</sub> leaves. *Plant Cell and Environ.* 30:1035-1040.
- Tambussi EA, S Nogués, P Ferrio y J Voltas, J L Araus (2004). Does a higher yield potential improve barley performance under Mediterranean conditions?: a case study. *Field Crops Res.* 91: 149-160.
- Tambussi EA, S Nogués y J L Araus (2005) Ear of durum wheat under water stress: water relations and photosynthetic metabolism. *Planta* 221:446-458.
- Terashima I (1992) Anatomy of non-uniform leaf photosynthesis. *Photos Res.* 31: 195-212.
- Tcherkez G, R Bligny, E Gout, A Mahe, M Hodges y G Cornic (2008) Respiratory metabolism of illuminated leaves depends on CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> conditions. *PNAS* 105: 797-802.
- Tyree MC, Seiler JR y Maier CA (2009) Short-term impacts of nutrient manipulations on leaf gas exchange and biomass partitioning in

- contrasting 2-year-old *Pinus taeda* clones during seedling establishment. *Forest Ecology and Management* 257:1847-1858.
- Valladares F y Niinemets Ä (2008) Shade Tolerance, a Key Plant Feature of Complex Nature and Consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39:237-257.
- von Caemmerer S (2000) *Biochemical models of leaf photosynthesis*. CSIRO Publishing. pp.1 65.
- von Caemmerer S y G D Farquhar (1981) Some relationship between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves.

# CAPÍTULO 9

## LA FLUORESCENCIA MODULADA DE LA CLOROFILA: MÉTODO DEL PULSO SATURANTE

**Autores:** Eduardo A Tambussi, Corina Graciano

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), Universidad Nacional de La Plata.

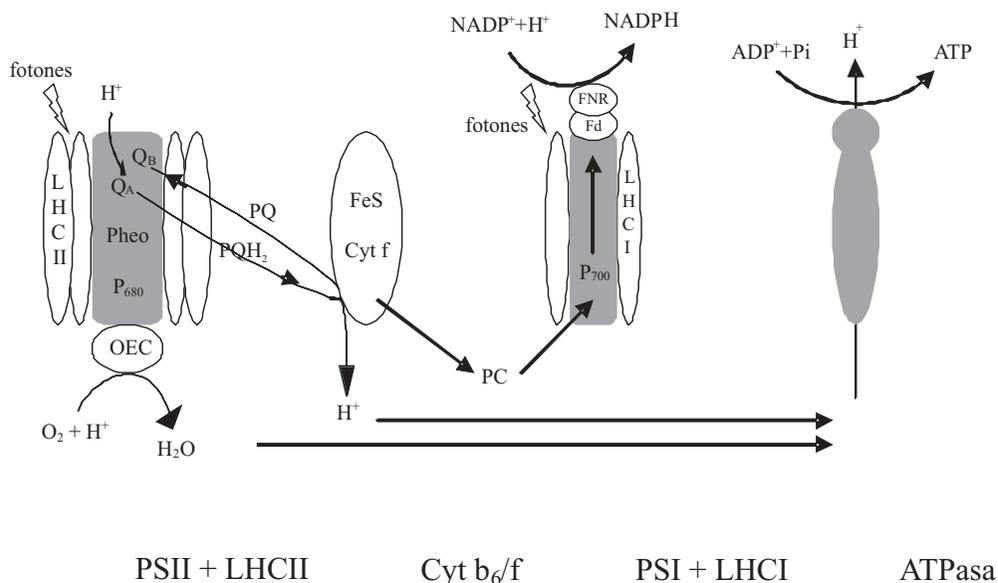
### 1. Introducción

En los últimos años se ha generalizado el uso de equipos de fluorescencia de la clorofila en fisiología y ecofisiología vegetal, en particular porque brinda medidas fiables, rápidas y no destructivas de diversos aspectos del funcionamiento del aparato fotoquímico de la hoja. Los equipos existentes en el mercado han ido mejorando mucho en los últimos años en portabilidad, por lo que su uso no se ha quedado restringido al laboratorio sino que permiten su manejo en condiciones de campo. El desarrollo,

aplicación y fundamentos teóricos de ésta técnica poseen una base fisicoquímica compleja cuyo desarrollo queda fuera del ámbito de este libro. Para profundizar diversos aspectos teóricos de la fluorescencia en plantas pueden consultarse excelentes revisiones sobre el tema (Govindjee, 1995). Para ver aspectos más aplicados recomendamos la revisión de Maxwell y Johnson (2000), y el texto especializado de Dell y Toivonen (2003) en el que puede encontrarse un capítulo dedicado a la aplicación de esta técnica en la investigación forestal (Mohammed *et al.*, 2003). Finalmente recomendamos el libro publicado por G.C. Papageorgiou y Govindjee (2004) para aquellos que quieran entender en toda su extensión gran parte del conocimiento actual en el uso de la fluorescencia de la clorofila en el ámbito de la ecofisiología. En este capítulo nos limitaremos a introducir de manera muy sintética los fundamentos de la técnica, y luego describiremos sus usos y aplicaciones más habituales.

### 2. Fundamentos

En la figura 1 se observa la estructura básica del aparato fotosintético en las membranas tilacoidales de los cloroplastos dentro de las células vegeta-



**Figura 1:** Esquema simplificado de la cadena de transporte fotosintético de electrones (sin tener en cuenta la estequiometría). Abreviaturas: Fd, ferredoxina; LHCI y LHCII, 'light harvesting complexes' o 'antenas' del fotosistema I y II, respectivamente; OEC, complejo emisor de oxígeno; Pheo, feofitina; PC, plastocianina; PQ, plastoquinona; PSI, PSII, fotosistemas I y II, respectivamente; QA, QB quinona A y B; P700 y P680, centros de reacción del PSI y PSII, respectivamente. (Modificado de Rosenqvist y van Kooten, 2003)

les. La cadena de transporte de electrones tilacoidal consta básicamente de dos fotosistemas y un complejo que vincula los dos anteriores (citocromo b6/f). También existen elementos adicionales que ayudan a la transferencia de electrones en diferentes tramos de la cadena (ver plastoquinona y plastocianina en la figura 1). En términos muy simplificados, el PSII captura electrones del H<sub>2</sub>O (con la consiguiente liberación de oxígeno) y los transfiere hasta el PSI, para reducir al aceptor electrónico NADP<sup>+</sup>. Con ello se crea una fuerza electroquímica que se almacena en forma de gradiente de protones entre el estroma y el lumen tilacoidal ( $\Delta\text{pH}$ ). El  $\Delta\text{pH}$  generado es utilizado para sintetizar ATP a nivel del complejo ATP sintasa.

Cada fotosistema consta de un 'centro de reacción' y un complejo 'antena' (denominados LHCI y LHCII, de '*light harvesting complex*'). Básicamente, los LHCs canalizan paquetes de energía (excitones) hacia el respectivo centro de reacción, los cuales provienen de la excitación de las moléculas de clorofila cuando absorben un fotón. En el centro de reacción del PSII se produce la 'separación de carga', es decir la oxidación del P680 (un 'par especial' de moléculas de clorofila *a*) y la transferencia de un electrón a un aceptor intermediario, la feofitina (Pheo). Luego la Pheo transfiere un electrón a la quinona A (Q<sub>A</sub>), y posteriormente éste es canalizado hasta el PSI por una serie de transportadores (ver figura 1).

Cuando una molécula de clorofila es excitada por la luz, la energía absorbida puede ser disipada a través de tres procesos: (a) fotoquímica (separación de carga a nivel de centro de reacción del PSII), (b) disipación térmica (procesos no-fotoquímicos) y (c) fluorescencia, o sea emisión de cuantos (fotones) de luz. Los tres procesos mencionados compiten entre sí en la des-excitación de la molécula, de tal forma que el aumento en la eficiencia de cualquiera de ellos resulta en la disminución del rendimiento de los otros. La fluorescencia es la emisión de luz que se emite cuando el electrón de una molécula vuelve a su estado energético basal. En el caso de las plantas, la fluorescencia procede fundamentalmente de las moléculas de la clorofila *a* asociadas al fotosistema II (Govindjee, 1995) y la emisión tiene un pico entre 690 y 730 nm.

La pregunta es: ¿cómo puede conocerse cuánto se disipa por cada uno de los tres procesos de des-

excitación previamente citados: fotoquímica, emisión térmica o fluorescencia? Imagínese una situación en la que todos los centros de reacción están 'cerrados' (es decir, que ya están totalmente reducidos y bloqueados para transferir la carga energética asociada a la captura de fotones). Esto puede tener lugar, por ejemplo, aplicando luz hiper-saturante, es decir al irradiar la hoja con una *PPFD* suficiente para asegurarnos que el *pool* de Q<sub>A</sub> está totalmente reducido (recuérdese que la Q<sub>A</sub> acepta electrones de la Phe a nivel del centro de reacción del PSII). En esta situación (*por ej.* todos los centros de reacción 'cerrados'), sólo la fluorescencia y la disipación térmica son vías de des-excitación alternativas para las moléculas de clorofila. El aparato fotosintético puede regular la magnitud de la disipación térmica, principalmente a través de cambios conformacionales de LHCII (un mecanismo no del todo caracterizado, pero que involucra al llamado ciclo de las xantófilas; Gilmore (2002) y referencias citadas allí). Estos cambios que se producen en el LHCII lo transforman de ser un 'embudo' eficiente de transferencia de energía hacia el centro de reacción, para pasar a ser un sistema 'disipador'. Todo proceso que haga disminuir la fluorescencia (recordar que los procesos de des-excitación son competitivos) se le denomina "de atenuación" (en inglés, '*quenching*'). Como mencionamos más arriba, éstos pueden ser procesos fotoquímicos o bien no-radiativos (térmicos) y se los conoce como atenuación fotoquímica ('*quenching*' fotoquímico) y atenuación no-fotoquímica ('*quenching*' no-fotoquímico) respectivamente.

### 3. Fluorescencia modulada y método del pulso saturante

Actualmente, la fluorescencia de la clorofila puede ser fácilmente estudiada mediante la modulación de la señal, que consiste en que la luz de excitación es emitida por pulsos a una frecuencia determinada. Electrónicamente, el equipo puede discriminar la señal de fluorescencia modulada, distinguiéndola por su frecuencia de la luz incidente a la cual está sometida la hoja. Por otra parte, la disipación fotoquímica y no-fotoquímica pueden ser discriminadas mediante la **técnica del pulso de luz saturante**, que es el método al que nos referiremos en la totalidad de este capítulo.

- Cuando una hoja, previamente aclimatada a condiciones de oscuridad, es iluminada con luz de muy baja irradiancia lo suficientemente débil de tal manera que no se produzca disipación de la energía lumínica a través de vías fotoquímicas, la hoja emite una señal baja de fluorescencia denominada fluorescencia basal en condiciones de aclimatación a la oscuridad ( $F_o$ ). Esta señal procede principalmente de los pigmentos antena del PSII.

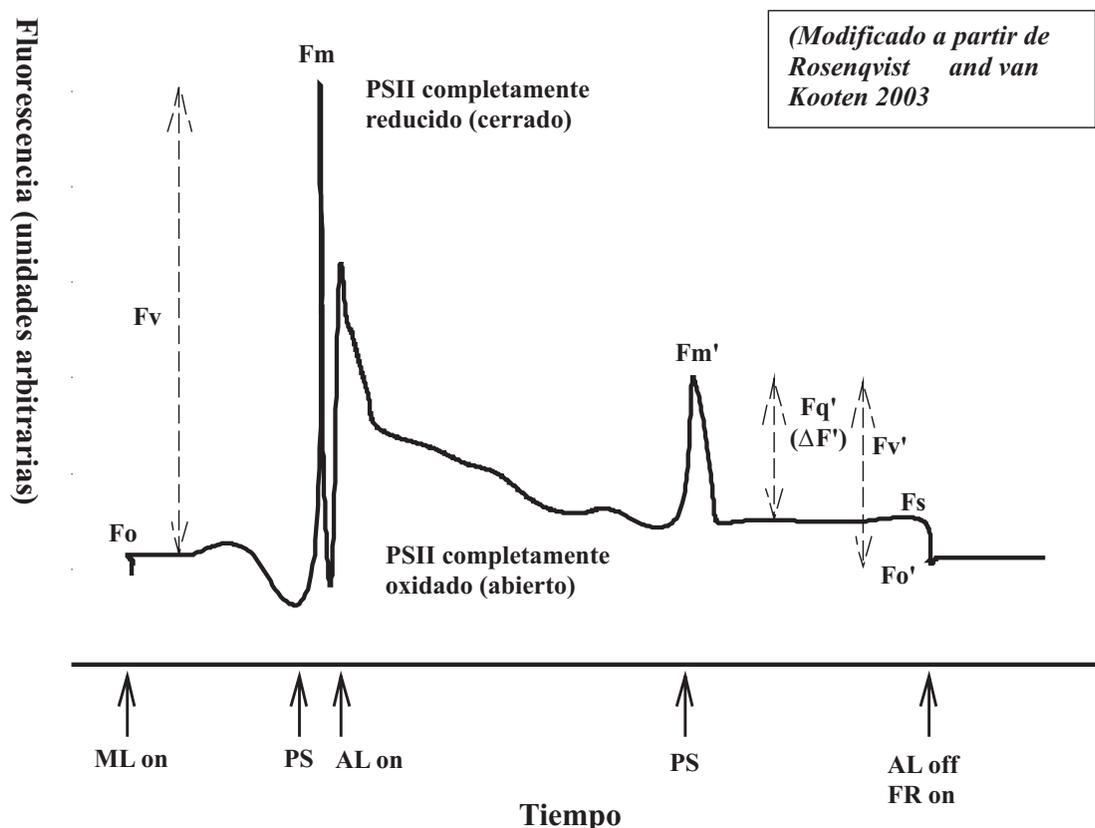
- Si a continuación se aplica un pulso breve de luz hiper-saturante (normalmente, varios miles de  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), la fluorescencia alcanza un máximo ( $F_m$ ) que resulta de la saturación de la fotoquímica de la hoja. En estas condiciones, el aceptor primario de electrones del PSII ( $Q_A$ ) está completamente reducido (por ej. los centros de reacción del PSII se encuentran 'cerrados').

- Si posteriormente se ilumina la hoja con luz actínica (es decir, luz fotosintéticamente activa), la hoja emite una señal de fluorescencia basal denomi-

nada  $F_s$ . Si luego es aplicado otro pulso saturante, se registra una nueva señal de máxima fluorescencia ( $F'_m$ ). Esta señal  $F'_m$  es siempre menor que  $F_m$  (hoja en oscuridad) debido a la existencia de procesos de disipación térmica (no-fotoquímicos) inducidos por la luz actínica y que normalmente están relajados en la oscuridad. Si luego la luz actínica es removida y se ilumina con luz débil de tipo roja lejana ( $\lambda = 730 \text{ nm}$ ), se obtiene una nueva señal basal llamada  $F_o'$ , la cual suele ser menor a la  $F_o$  (tomada en oscuridad). La figura 2 muestra los aspectos básicos y la nomenclatura de este método.

### 3.1. Parámetros y coeficientes básicos de fluorescencia

La técnica permite cuantificar toda una serie de parámetros básicos a partir de las distintas emisiones de fluorescencia que permiten profundizar en los procesos asociados a la fase lumínica durante



**Figura 2:** Curva de inducción de fluorescencia modulada de la clorofila en el método del pulso saturante. Abreviaturas: AL : luz actínica; FR: luz roja lejana; ML: luz de medida (no-actínica); PS: pulso saturante de luz.

la fijación de carbono. Dichos parámetros básicos se pueden resumir atendiendo al hecho de que su cuantificación tenga lugar en oscuridad o bajo iluminación:

Hojas aclimatadas a la oscuridad

$F_o$ : Fluorescencia mínima

$F_m$ : Fluorescencia máxima

$F_v$ : Fluorescencia variable ( $F_v = F_m - F_o$ )

Hojas aclimatadas a luz actínica

$F_s$ : Fluorescencia a estado estable a cualquier nivel de luz

$F_m'$ : Máxima fluorescencia en hojas iluminadas

$\Delta F'$  ( $=F_q'$ ): Cambio de fluorescencia provocado por el cierre de PSII ( $F_q' = F_m' - F_s$ )

$F_v'$ : Fluorescencia variable en hojas iluminadas

( $F_v' = F_m' - F_o'$ )

$F_o'$ : fluorescencia mínima en hojas iluminadas con luz roja lejana

A partir de los parámetros definidos anteriormente, se pueden calcular toda una serie de variables funcionales, los cuales se describen en la sección siguiente (ver Maxwell y Johnson, (2000), así como referencias citadas en este trabajo). Nótese que todos los parámetros de fluorescencia previamente citados son adimensionales, ya que se basan en cocientes entre coeficientes, los cuales se miden en unidades arbitrarias de fluorescencia.

### 3.1.1. Rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ )

Calculado como:  $F_v/F_m$ , donde  $F_v$  es la fluorescencia variable = ( $F_m - F_o$ ). Su medición se realiza en oscuridad en hojas aclimatadas durante 20-30 minutos. Este coeficiente puede tomar valores entre 0 y ca. 0,85. Hojas maduras, no senescentes y que no estén sufriendo estrés poseen típicamente valores alrededor de 0,8. Este índice muestra una clara correlación con el porcentaje de centros funcionales del fotosistema II (ver referencias en Anderson *et al.*, 1997), por lo que su disminución es considerada un indicador de pérdida de función (daño) a nivel del aparato fotosintético (Bilger *et al.*, 1995). Sin embargo, también se ha descrito una disminución de este parámetro asociado a procesos de fotoprotección (Osmond *et al.*,

1999), y esta posibilidad debería tenerse en cuenta. Típicamente, el coeficiente  $F_v/F_m$  no se modifica o se modifica muy poco en situación de estrés hídrico; llegándose a requerir niveles de estrés hídrico muy intenso, incluso por encima de los límites de supervivencia de las plantas, para observar acusadas variaciones en su valor (por ej., el PSII no sufre daño; Tambussi *et al.*, 2002). No obstante se ha observado que puede sufrir caídas pronunciadas en hojas de plantas sometidas a bajas temperaturas si la especie o ecotipo es susceptible ('chilling'; Tambussi *et al.*, 2004). Así por ejemplo, Aranda *et al.* (2005) caracterizaron la variación en la susceptibilidad a las bajas temperaturas entre diferentes poblaciones de *Q. suber* L. mediante el análisis de la variación estacional de la  $F_v/F_m$ . En este trabajo se observó un mayor grado de diferenciación inter-poblacional en los periodos más fríos.

### 3.1.2. Rendimiento cuántico efectivo del PSII ( $\phi_{PSII}$ )

Se calcula como:

$\phi_{PSII} = \Delta F'/F_m'$ , donde  $\Delta F'^{(*)} = (F_m' - F_s)$ .

La medición de este parámetro se realiza a la luz (la PPFD incidente dependerá del objetivo de estudio). El  $\phi_{PSII}$  es proporcional al rendimiento cuántico de la asimilación de  $CO_2$  en condiciones no-fotorrespiratorias (Genty *et al.*, 1989). Su valor puede estar entre 0 y 0,8 dependiendo de la PPFD y del estado de la hoja. A partir de este valor es posible estimar la tasa lineal de transporte electrónico, conociendo los valores de PPFD, absorción foliar y asumiendo una igual distribución de la energía absorbida entre el fotosistema I y II (ver 'ETR').

Nótese que cuando los mecanismos de disipación térmica son iguales a 0 (oscuridad), el rendimiento efectivo del PSII ( $\Delta F'/F_m'$ ) es igual al  $F_v/F_m$ .

(\*) Actualmente se simboliza como  $F_q'$

### 3.1.3. Atenuación no fotoquímica ('Quenching' no fotoquímico (NPQ))

También conocido como 'parámetro de Stern-Volmer' (Rosenqvist y van Kooten, 2003), este coeficiente es calculado como:

$$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$$

Como puede observarse, su cálculo requiere tanto parámetros de oscuridad ( $F_m'$ ) como a la luz ( $F_m'$ ). Esto hace que sea muy importante la medida de ambos parámetros justo en la misma zona de la hoja. Pequeños cambios en la localización del punto en el que se miden ambos parámetros, pueden inducir errores posteriores en la estima de NPQ. Este parámetro es directamente proporcional a la tasa de des-excitación por disipación térmica en el PSII. Tiene un valor de 0 en oscuridad (mecanismos de *quenching* no fotoquímicos relajados) y se aproxima a infinito a muy altas irradiancias. Sin embargo, los valores más habituales están entre 0 y 4.

Otra aproximación para la estima de la disipación térmica está representada por el parámetro qN:

$$qN = 1 - (F_m' - F_0') / (F_m' - F_0')$$

Su utilización requiere la medición del parámetro  $F_0'$ , para lo cual debe irradiarse unos segundos la hoja con una fuente de luz roja lejana (ver apartado 2). Alternativamente,  $F_0'$  puede estimarse mediante un modelo (ver mas adelante). El valor de qN puede estar entre 0 y 1. Aumentos de ambos parámetros (qN, NPQ) son indicadores de mayor disipación térmica a nivel del SII, y están positivamente correlacionados con los niveles de la xantófila zeaxantina (Tambussi *et al.*, 2002). Sin embargo, algunos autores prefieren utilizar NPQ en lugar de qN, dado que el primero se correlaciona linealmente con el rendimiento intrínseco del PSII (ver sección siguiente). Los ejemplos del uso de la estima de las atenuaciones fotoquímicas y no-fotoquímicas son abundantes en la bibliografía para analizar respuesta a frío, altas temperaturas y adaptación de la fotoquímica de la hoja a distintos ambientes lumínicos de crecimiento (citas en Mohammed *et al.*, 2003; Rodríguez-Calceirrada *et al.*, 2008).

### 3.1.4. Rendimiento intrínseco del PSII ( $F_v'/F_m'$ )

Se calcula como:  $F_v'/F_m'$ , donde  $F_v' = (F_m' - F_0')$

El rendimiento intrínseco representa la eficiencia de los centros abiertos (= oxidados) del PSII. Su caída representa un mayor nivel de disipación por mecanismos no radiativos (térmicos) a nivel de LHCII.

Es calculado como:

$$qP = (F_m' - F_s') / (F_m' - F_0')$$

Se considera una medida del estado de oxidación de  $Q_A$  o sea, la proporción de centros del PSII que se encuentran en estado 'abierto'. Su valor puede estar entre 0 y 1. Tomará valores de 1 en oscuridad y de 0 a muy altas irradiancias.

Aquí es importante señalar que el parámetro  $\Delta F'/F_m'$  es el producto de los dos últimos coeficientes (por ej. el rendimiento intrínseco del PSII y el qP):

$$\Delta F'/F_m' (= \phi_{PSII}) = F_v'/F_m' \times qP \text{ (Andrews } et al., 1993)$$

Por esta razón, algunos autores prefieren utilizar estos coeficientes (Nogués y Alegre, 2002), ya que cada uno por separado explica una parte de las variaciones de  $\phi_{PSII}$ . En otras palabras, los cambios en el rendimiento cuántico efectivo a la luz pueden deberse a cambios en la proporción de centros del PSII en estado 'abierto' (estimado por qP), a cambios en el rendimiento intrínseco de estos centros (estimado por  $F_v'/F_m'$ ) o bien a cambios en ambos coeficientes.

### 3.1.6. ETR (Tasa de transporte de electrones)

$$ETR = \phi_{PSII} \text{ PPFD } 0,5$$

a donde PPFD es la densidad de flujo fotónico fotosintético incidente, 'a' es la fracción de luz que es absorbida por la hoja (absortancia) y 0,5 es la fracción de luz absorbida por el PSII (Rosenqvist y van Kooten, 2003). Como fue discutido en la estimación del rendimiento cuántico mediante curvas de luz (capítulo 8), la absortancia de una hoja debe conocerse para saber qué fracción de la luz incidente es realmente absorbida. Esto puede medirse con una esfera integradora (Long *et al.*, 1996) o bien obtenerse a partir de valores previamente publicados. Valores de absortancia cercanos a 0.85 son bastante generalizados en hojas de muchas especies, en ausencia de estrés nutricional o lumínico y bajo condiciones de alta disponibilidad hídrica, pero pueden verse modificados ligeramente según el caso. Por ejemplo, si estamos estudiando el ETR en el curso del tiempo en hojas senescentes (pérdida de clorofila), la absortancia puede disminuir y debe medirse para estimar correctamente el ETR.

Finalmente, debemos aclarar que existen numerosos parámetros relacionados con la medida de la fluorescencia de la clorofila en la bibliografía (Roháček, 2002), pero su significado fisiológico es más oscuro y están menos extendidos en su uso, por lo que no los describiremos aquí.

### 3.2. Procedimiento operativo para la evaluación de los distintos parámetros estimados a partir de medida de la fluorescencia de la clorofila

Los protocolos de medida deben ajustarse a las hipótesis de partida que el investigador desea contrastar. A continuación se presenta lo que en la práctica más habitual podría ser uno de los protocolos a utilizar:

1- Se mide  $F_s$  y  $F_m'$  y se calcula el rendimiento cuántico efectivo a la luz ( $\phi_{PSII}$ ). La irradiancia puede ser la misma a la que crecía la planta o bien a otra que nos interese (siempre debe aclimatarse previamente). Los equipos almacenan en la memoria el valor de *PPFD* durante la medición, lo cual resulta indispensable para el cálculo de la *ETR*.

2- Se oscurece la misma hoja que fue medida en el paso (1) y se mide  $F_v/F_m$  tras 30 minutos de aclimatación a la oscuridad. Este intervalo de tiempo permite que se relajen los mecanismos de disipación no fotoquímica. Para medir este parámetro en condiciones de campo, los equipos de fluorescencia vienen provistos con pinzas '*clips*' especiales que permiten oscurecer el sector de hoja deseado antes de la medición. Si trabajamos en el laboratorio, se puede aclimatar la hoja en una habitación mantenida en oscuridad, y se realiza la medida en la penumbra de dicho cuarto 'oscuro' (comprobar que la *PPFD* sea no detectable con los sensores que se usan habitualmente).

3- Con la medición del paso (1) se calcula la *ETR*, conociendo la *PPFD* exacta para cada medición, el  $\phi_{PSII}$  y la absorción foliar.

4- Combinando los parámetros de (1) y (2) se pueden calcular parámetros derivados (*qN*, *NPQ*, *qP*; ver fórmulas más arriba).

Para el cálculo de los parámetros *qP* y *qN* debe conocerse  $F_o'$ . Este valor es obtenido cuando se elimina la luz actínica y se ilumina la hoja con luz roja lejana (730 nm) durante unos segundos. La

luz roja lejana excita preferencialmente al PSI y de esta manera canaliza los electrones desde el PSII hacia el PSI. Se logra así que todos los centros de reacción del PSII estén en estado oxidado ('abiertos'). Algunos equipos tales como el PAM 2000 o el FMS-2 (Hansatech) vienen provistos con una fuente de rojo lejano que permite la medición de  $F_o'$ . Si no se dispone de esta prestación (ej. fluorímetro MiniPAM), el parámetro puede estimarse según el modelo de Oxborough y Baker (1997):

$$F_o' = \frac{F_o}{\left[ \frac{F_v}{F_m} + \frac{F_o}{F_m'} \right]}$$

El protocolo descrito es sólo uno de los posibles, pero existen otras alternativas. Por, ejemplo, si sólo se desea estimar un potencial daño al PSII puede medirse  $F_v/F_m$  directamente en hojas adaptadas a la oscuridad. Alternativamente, si sólo se busca conocer la tasa de transporte de electrones, se medirá el rendimiento cuántico a la luz y posteriormente se calculará *ETR*.

Debe mencionarse que a temperatura ambiente, el PSII es el que posee mayor rendimiento de fluorescencia de los dos fotosistemas -alrededor de un 90 %- . El PSI posee baja emisión y ésta es bastante constante (por lo cual no aporta demasiada información). En el PSII, y tal como hemos visto, la emisión de fluorescencia es muy dependiente de las condiciones fisiológicas de la hoja. Por esta razón, las técnicas de fluorescencia a temperatura ambiente 'monitorean' básicamente al PSII, aunque cierta señal proviene también del PSI. Para estudiar por métodos de fluorescencia el comportamiento del PSI hay que trabajar a temperaturas muy bajas, próximas a las del nitrógeno líquido (77°K), y esto es de interés sólo en ciertos casos excepcionales para estudios enfocados al análisis de la fotoquímica de la planta a un nivel casi molecular (Harbinson y Rosenqvist, 2003).

## 4. Algunas consideraciones y precauciones importantes a tener en cuenta

1- Como toda medida enfocada al estudio del aparato fotosintético, deben tenerse muy en cuenta las condiciones a las que estaba aclimatada la hoja

previamente a la medición. Si deseamos medir el rendimiento cuántico a la luz (por ej. para estimar *ETR*) debe tenerse un especial cuidado en que la hoja se encuentre en estado estable en su metabolismo fotosintético. Para asegurarnos esto, es conveniente aclimatar la hoja minutos antes a las condiciones de *PPFD* a las que vamos a realizar la medición (20-30 minutos como mínimo si la hoja estaba en oscuridad, según la especie). Una manera de asegurarnos que nos encontramos en un estado estable es observar en el monitor del equipo el valor de la fluorescencia actual antes de aplicar el pulso saturante. La señal de fluorescencia no debe variar con ninguna tendencia clara, más allá del ruido aceptable del equipo.

2- Una posible fuente de error en la medición de *ETR* es el sombreado que puede producir la fibra óptica en el sector de hoja sobre el que se realiza la medida (Bilger *et al.*, 1995). Los equipos de fluorescencia más usados (tales como el PAM 2000, MINI-PAM, y el FMS-2 de Hansatech) poseen un sistema de inserción de la fibra que forma un ángulo oblicuo respecto de la hoja. Sin embargo, y dependiendo de dónde provenga la fuente de luz actínica (luz del sol o luz artificial), podemos provocar un sombreado en la propia hoja. Los sensores de *PPFD* que traen estos equipos están desplazados respecto de la hoja y por esta razón pueden registrar un valor de *PPFD* diferente al sector de hoja implicado en la medición. Esto nos conducirá a valores erróneos de *ETR*. Para evitar este auto-sombreado, debe ajustarse correctamente la distancia de la fibra óptica en la pinza de medición.

3- En las mediciones a muy baja *PPFD* (y más aún en la oscuridad), debemos asegurarnos que la luz modulada sea 'no actínica' (que no produzca fotoquímica, o sea, fotosintéticamente inactiva). En este sentido es importante consultar el manual del fluorímetro acerca de los valores recomendados. Tener en cuenta que plantas que crecen a bajas irradiancias son más sensibles que las plantas crecidas a altos niveles de *PPFD* (Rosqvist y van Kooten, 2003). También debe comprobarse que la *PPFD* del pulso saturante sea realmente tal, es decir que 'cierre' a todos los centros de reacción del PSII. Intensidades situadas en el rango 6000 - 8000

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  suelen ser suficientes para saturar toda la fotoquímica de la hoja. En cualquier caso, esto puede verificarse modificando el pulso de luz del equipo y observando qué sucede con el parámetro  $F_m$  o  $F_m'$  (según se trate de medidas en oscuridad o luz respectivamente). Si obtenemos valores estables a diferentes *PPFD*, esto nos indica que el pulso saturante es correcto.

4- *ETR* y asimilación de carbono: Aunque *a priori* el valor de *ETR* puede ser utilizado como una estimación de la actividad fotosintética, existen algunas limitaciones que pueden modificar la correlación entre transporte de electrones fotosintético, y la asimilación de  $\text{CO}_2$ . Una de estas limitaciones es que además del ciclo de Calvin, existen otros destinos alternativos para el flujo de electrones a través de la cadena de transporte electrónico. Entre estos destinos alternativos podemos nombrar la fotorrespiración (en plantas  $\text{C}_3$ ), la reacción de Mehler (reducción de la molécula de oxígeno a nivel del PSI; Lawlor y Tezara, 2009) y la reducción de nitrato (Foyer *et al.*, 2000). Una manera de estudiar estos destinos alternativos es efectuar medidas simultáneas de fluorescencia y asimilación de  $\text{CO}_2$  por IRGA. Ambos sistemas pueden ser acoplados en forma 'artesanal' (Tambussi *et al.*, 2005), pero algunos equipos de medición de intercambio de gases (en particular, los modelos más recientes del LICOR 6400), vienen provistos de un fluorímetro incorporado. Esto permite realizar medidas simultáneas de asimilación de carbono y *ETR* sobre el mismo sector de hoja y exactamente bajo las mismas condiciones (detalles en capítulo 7). Si se compara *ETR* versus  $A_n$  (tasa de asimilación neta) a diferentes *PPFD*, la pérdida de linealidad entre ambos parámetros es indicador de la existencia de destinos alternativos de electrones (Fracheboud y Leipner, 2003).

Cambios en el cociente *ETR*/ $A_n$  son utilizados como un indicador de estos destinos alternativos de electrones (Flexas *et al.*, 2002). Una posible limitación de este enfoque es que en realidad, los parámetros *ETR* y  $A_n$  son evaluados sobre poblaciones diferentes de cloroplastos: mientras que la  $A_n$  medida por IRGA integra la asimilación de carbono de todo el sector de hoja encerrado en la cámara de medición, la fluorescencia de la clorofila involucra sólo

a las capas de células más superficiales en la cara adaxial (Rosenqvist y van Kooten, 2003). Si bien esto puede no representar un gran problema, debe ser tenido en cuenta a la hora de analizar los resultados. Por ejemplo, puede darse el caso que los cloroplastos de las capas superficiales de células muestren fotoinhibición a altas irradiancias, mientras que el resto de las células (situadas más profundamente) estén fotosintetizando normalmente. En estos casos  $ETR$  (fluorescencia) y  $A_n$  medido por IRGA no se relacionarán linealmente.

## 5. Coeficientes recomendados según el objetivo de estudio

Objetivo a estudiar		Coefficiente recomendado
Transporte de electrones fotosintético (actual)	→	$ETR$
Magnitud de la disipación térmica a nivel del PSII	→	NPQ o bien $qN$
Exceso de excitación sobre el PSII	→	$qP$
Daño al PSII	→	$F_w/F_m$

## 6. Bibliografía

Anderson J M, Y I Park y W S Chow (1997) Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in the nature. *Physiol Plant.* 100: 214-223.  
 Andrews J R, G J Bredenkamp y N R Baker

(1993) Evaluation of the role of state transitions in determining the efficiency of light utilization for CO<sub>2</sub> assimilation in leaves. *Photos Res.* 38: 15-26.

Aranda I, L Castro, R Alía, J A Pardos y L Gil (2005) Low temperature during winter elicits differential responses among populations of the Mediterranean evergreen cork oak (*Quercus suber*). *Tree Physiol.* 25: 1085-1090.

Bilger W, U Schreiber, M Bock (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia.* 102: 425-432.

Dell JR y PMA Toivonen (Eds.) (2003) Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology. Kluwer Academic Publishers. 259 pag.

Flexas J, J Bota, J M Escalona, B Sampol y H Medrano (2002) Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Funct Plant Biol.* 29: 461-471.

Foyer C H, S Ferrario-Méry, S C Huber (2000) Regulation of carbon fluxes in the cytosol: coordination of sucrose synthesis, nitrate reduction and organic acid and amino acid biosynthesis. En *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, Kluwer Academic Publishers, Leegod, Sharkey, von Caemmerer (Eds). pp. 177-203.

Fracheboud Y y J Leipner (2003). The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature, and drought stress. En *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology* (Dell JR, PMA Toivonen Eds), Kluwer Academic Publishers. pp.125-150.

Genty B, Briantais J M, N R Baker (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Bioch and Bioph Acta.* 990: 87-92.

Gilmore A M (2002) Advances in understanding acclimation to light stress and light-energy dissipation in photosynthetic organisms: an overview of the Light Stress and Photosynthetic meeting (LS2001) and dedicated Special papers. *Funct. Plant. Biol.* 29: 1125-1129.

Govindjee (1995) Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence- *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 131-160.

Harbinson J y E Rosenqvist (2003) An introduction to chlorophyll fluorescence. En *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology* (Dell JR, PMA Toivonen Eds),

- Kluwer Academic Publishers. pp 1-29.
- Lawlor D W y W Tezara (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann Bot* 103: 561-579.
- Long S P, P K Farage y RL Garcia (1996) Measurement of leaf and canopy photosynthetic CO<sub>2</sub> exchange in the field. *J. Exp. Bot.* 1629-1642.
- Maxwell K y G N Johnson (2000) Chlorophyll fluorescence- a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659-668.
- Mohammed GH, P Zarco-Tejada y J H Miller (2003) Applications of chlorophyll fluorescence in forestry and ecophysiology. En *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology* (Dell JR, PMA Toivonen Eds), Kluwer Academic Publishers. pp79-124.
- Nogués S y L Alegre (2002) An increase in water deficit has no impact on the photosynthetic capacity of field-grown Mediterranean plants. *Funct. Plant Biology.* 29: 621-630.
- Osmond C B, J M Anderson, M C Ball y J J G Egerton (1999) Compromising efficiency: the molecular ecology of light-resource utilization in plants. En *'Physiological Plant Ecology* (Press, M.C., Scholes, J.D., and Barker, M.G. eds) Blackwell Science. pp 1-24.
- Oxborough K y N R Baker (1997) Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components- calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo'. *Photos Res.* 54: 135-142.
- Papageorgiou G C y Govindjee (2004) Eds. Chlorophyll a Fluorescence. A signature of photosynthesis. Volumen 19 from the Serie "Advances in Photosynthesis and Respiration". Govindjee (Edit.). Springer. pp 818.
- Rodríguez-Calcerrada, J, J A Pardos, L Gil y I Aranda (2007). Acclimation to light in seedlings of *Quercus petraea* (Mattuscha) Liebl. and *Quercus pyrenaica* Willd. planted along a forest-edge gradient. *Trees, Structure and Function.* 21:45-54.
- Roháček K (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definition, photosynthetic meaning, and mutual relationship. *Photosynthetica.* 40(1): 13-29.
- Rosenqvist y O van Kooten (2003) Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature. En *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology* (Dell JR, PMA Toivonen Eds), Kluwer Academic Publishers. pp 31-77.
- Tambussi E A, J Casadesus, S Munné-Bosch y JL Araus (2002) Photoprotection in water-stressed plants of durum wheat (*Triticum turgidum var. durum*): changes in chlorophyll fluorescence, spectral signature and photosynthetic pigments. *Funct Plant Biol.* 29: 35-44.
- Tambussi EA, C G Bártoli, J J Guiamet, J Beltrano y J L Araus (2004) Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Meer.) leaves. *Plant Science.* 167: 19-26.
- Tambussi E A, S Nogués, J L Araus (2005) Ear of durum wheat under water stress: water relations and photosynthetic metabolism. *Planta.* 221: 446-458.
- Itaspermam erum niscim faciis vit lam rae as si del estibus andae id molorepeli volupta tentio quaspel iquuntet atur solupta tquaped quam dolo idusdant quid ut voluptur aceatias andit di renti corrumeni autatur soluptate num utate solorporepe nimporeptae rem niendio nsecus, quid molupta tquibusti voluptati id mo et eatiori tatisquate soluptatquae non rernatincias enis rent ullatibus etur? Qui comnihi caturi odis et faccus eveles quos solora di quaecto reuireium aut odignit, que conseque cum quati bero blat molo qui omnis dolorem lantota turions equisque nim quunto doluptata cullatem rehendi tiscienias etur as es mo tem ipsus.
- Ga. Ut eum eos as ea porrovi denditas volorepudis a si to con cusdam esecione dolut ut asseque vit aut quis ma venimus experch iliquiandi que eris as reseque laborerum facepemate plam adiorae sa discid magnihil ilibea que vent deligenimus et, sed quisit, cor sitatemquam iliqui beatio. Hendit estiusa pisquibust hicti tore velendi doluptae. Otatum eatis doluptatio que prehenest, site et as quaest volupta dero comnimus, que non nus, ut acestot asperioist, aliqua sinctotaepa dolescid qui ommo tem. Harumque et, odis volo qui derspe nosa dis maio dolupta temodis el incti opta voluptatem nonse rem fugitium volecte nonsequ iatur, nullam, sinvenis eum explam est, quia debit, aut estrum et hit lamus eos eveliqu iduciis eventem quasint, is essunt labo. Et ma dolorem aut estioistius volupti aepelit equisim aut la conem nimporryum andaeste numque re laborem latia semam late quatiur aut quis ped qui doles pori con nobisi iusapictotae invella ndignis ius ipientem sunt etus es mi, aut doluptae. Itatur sunti ius etur? Quia cus, tem exped ullitaq uissitatum invelestrum ullaudi onsequa spienti onsequi doluptiorem dem eos dolore int accaecto velic temporibus minctur, sitatur a am, conse od qui ipsam harum enis de



# CAPÍTULO 10

## USO DE ISÓTOPOS ESTABLES COMO MARCADORES DE PROCESOS ECOLÓGICOS

**Autor:** María Elena Fernández

Consejo Nacional de Investigaciones

Científicas y Técnicas - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Bariloche

### 1. Introducción

El uso de isótopos estables en estudios ecológico-agronómicos ha crecido en las últimas décadas, considerándose los valiosos trazadores no radiactivos e integradores de cómo las plantas interactúan y responden a su ambiente biótico y abiótico (Dawson *et al.*, 2002). Como es sabido, cada elemento químico posee un número atómico (número de protones en el núcleo) y un número másico (suma de protones y neutrones del núcleo). Este último puede diferir dentro de un elemento debido a la cantidad de neutrones. Los elementos que poseen la misma carga eléctrica y número atómico, pero distinta masa (o peso atómico) se denominan isótopos, los que pueden ser estables o inestables (radiactivos). En el primer caso, se trata de elementos que no emiten partículas ni radiación, y constituyen el eje del presente capítulo. Los segundos, son átomos cuyos núcleos sufren desintegraciones a través del tiempo, emitiendo partículas ( $\alpha$ ,  $\beta^+$  o  $\beta^-$ ) y/o radiación, con lo que alcanzan un nivel de estabilidad nuclear en el tiempo. Estas desintegraciones ocurren en forma constante y predecible, por lo que se utilizan para datar procesos que han ocurrido en el pasado (por ejemplo, uso del  $^{14}\text{C}$ ). Un mismo elemento puede tener isótopos estables e inestables. Este es el caso, por ejemplo, del Hidrógeno, que posee dos isótopos estables - $^1\text{H}$  y Deuterio ( $^2\text{H}$  o D)- y uno inestable -el Tritio ( $^3\text{H}$ )-, o del Carbono, que posee dos formas isotópicas estables ( $^{12}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y una inestable ( $^{14}\text{C}$ ).

Si bien la mayoría de los elementos posee más de un isótopo, los estudios en ciencias ambientales utilizan principalmente isótopos de los elementos más abundantes en el medio natural: H, O, C, N y

S. Estos constituyen los elementos principales de los sistemas biológicos, hidrológicos y geológicos. Todos ellos son elementos livianos, y como consecuencia de ello, la diferencia relativa de las masas de los diferentes isótopos se tornan mayores, posibilitando la medición de diferencias en la composición isotópica de un determinado compuesto. Estas diferencias son consecuencia del proceso denominado fraccionamiento isotópico que ocurre durante las reacciones químicas y ciertos procesos físicos (Clark y Fritz, 1997). El fraccionamiento isotópico se produce debido a que las moléculas que poseen diferentes masas por la presencia de uno u otro isótopo de sus átomos constitutivos, presentan diferentes tasas de reacción.

En forma natural, el isótopo de menor masa (liviano) es el más abundante, mientras que el/los de mayor masa (pesado o raro) es el menos abundante. Como ejemplo, en la naturaleza, la relación de abundancia del  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{14}\text{C}$  es de 98,89%, 1,11% y trazas, respectivamente. En el caso del oxígeno terrestre, el isótopo más común  $^{16}\text{O}$  representa el 99,796%, frente al 0,204% del  $^{18}\text{O}$ . La proporción normal de abundancias (ej.  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}=0,00204$ ) se modifica levemente en los productos de las reacciones donde hubo fraccionamiento. Así, la presencia de estas formas "raras" en muy bajas concentraciones naturales permite cuantificar procesos en los que ha ocurrido algún tipo de discriminación, ya sea por procesos físicos, químicos o bioquímicos, haciendo que la magnitud del proceso sea proporcional al grado de discriminación. Conociendo la variación entre la proporción de isótopos en las fuentes potenciales de los mismos y los productos, se puede llegar a cuantificar la magnitud del proceso. Esta es la base conceptual del uso de isótopos estables en las ciencias ambientales.

Por otro lado, además de utilizarse la técnica de cuantificar las concentraciones de isótopos sin modificar las mismas en relación con su abundancia natural, existe la alternativa de que el investigador agregue una marca isotópica en el sistema (generalmente, en mucha mayor proporción de lo que ocurre naturalmente), lo que permite el seguimiento posterior del elemento en los diferentes compartimientos del sistema en estudio.

Desde el punto de vista de la forma de expresión de la composición isotópica de una muestra, cuando se habla de abundancias de las formas raras de

los distintos isótopos, éstas se denotan con la letra delta minúscula  $\delta$ , seguida de la concentración por mil (‰). Esta concentración no se expresa como la relación isotópica absoluta de la muestra, sino como la diferencia relativa entre las relaciones isotópicas de la muestra y de una referencia o patrón internacional (por ej. Dawson *et al.*, 2002) y se expresa de la siguiente forma:

$$\delta^{xx}E = 1000 \left[ \left( \frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{estándar}}} \right) - 1 \right]$$

donde E es el elemento de interés (ej. O, H, N, C), xx es la masa del isótopo más raro (y más pesado) del par que se esté analizando, R denota relación entre la concentración del isótopo menos abundante y la del más abundante (ej.  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ).

En el caso de los isótopos del oxígeno y el hidrógeno que conforman la molécula de agua, el estándar utilizado es denominado V-SMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water de la Internacional Atomic Energy Agency o IAEA), mientras que en el caso de los isótopos del C, el estándar utilizado actualmente es denominado V-PDB, también de la IAEA, que reemplazó al estándar inicial que se trataba de una estructura cálcica interna del fósil *Belemnitella americana* de la formación cretácica Pee Dee de Carolina del Sur (EEUU). Este mismo estándar también se usa para el O. La diferencia entre la concentración del isótopo raro en los compuestos que actúan como fuente de un proceso y el producto del mismo, se debe al proceso de “discriminación”, denotándose con la letra delta mayúscula,  $\Delta$ . Así, como producto del proceso de discriminación, la fuente y el producto presentarán una “señal isotópica” diferente, es decir, poseerán distinta concentración de isótopo raro.

Los análisis de determinación de concentración de isótopos en una muestra se realizan mediante espectrometría de masas, existiendo varios tipos de espectrómetros. Para una revisión de los mismos y una ampliación de los conceptos generales de la química isotópica puede consultarse Clark y Fritz (1997); Barrie y Prosser (1996); Dawson y Brooks (2001), entre otros.

A fin de orientar a potenciales usuarios de las técnicas isotópicas en estudios ecofisiológicos, a continuación se detallan algunos ejemplos de aplicación de isótopos estables en ecología-agronomía, con

énfasis en aspectos metodológicos y de interpretación de resultados. Posteriormente se provee un listado de otras aplicaciones posibles que no serán cubiertas en el presente capítulo.

## **2. Uso de isótopos estables del carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) para determinar la eficiencia en el uso del agua de las plantas**

Antes de introducirnos en la aplicación del  $^{13}\text{C}$ , es conveniente aclarar algunas cuestiones semánticas en relación con el término “eficiencia en el uso del agua” (EUA). Este es un término relativamente ambiguo ya que que, según la bibliografía consultada y el trabajo específico, puede significar distintas cosas y/o estar medido a diferentes escalas temporales y espaciales. En términos generales, la EUA es la relación (cociente) entre el carbono fijado y el agua transpirada en dicho proceso. A nivel instantáneo se puede definir la EUA como el cociente entre la fotosíntesis neta y la transpiración foliar (escala temporal de segundos). También a nivel instantáneo se habla de la EUA intrínseca (EUA<sub>i</sub>) que es la relación entre la fotosíntesis neta y la conductancia estomática del tejido foliar, que al ser dividida por la demanda evaporativa, da la EUA anteriormente definida (ya que, simplificando grandemente y asumiendo que la conductancia aerodinámica es infinita, la transpiración foliar es igual al producto entre la conductancia estomática al vapor de agua y la demanda evaporativa). Cuando hablamos de la aplicación de la técnica del  $^{13}\text{C}$  para estimar EUA de las plantas, nos estamos refiriendo, como se verá más adelante, a esta escala temporal corta, de nivel instantáneo, con la ventaja de que esa escala de corto plazo queda integrada en el tejido abarcando un mayor plazo.

Sin embargo, muchas veces el investigador está interesado en conocer la EUA a otra escala, analizando la relación entre la biomasa producida (no todo el C fijado, sino el que ha quedado fijado en biomasa) y el agua transpirada, o el agua evapotranspirada, determinando la EUA total del sistema (EUA<sub>t</sub>). En este último caso, se considera no sólo el agua que sale del sistema desde los estomas de la planta, sino aquella que se evapora desde la superficie foliar y el suelo. En algunos casos, cuando se trabaja con sistemas irrigados, algunos autores

hablan de eficiencia en relación con la producción de biomasa y el agua administrada por riego, independientemente de cuánta de esa agua se perdió realmente por la transpiración de las plantas. Asimismo, en muchos casos no se cuantifica toda la biomasa producida sino aquella asignada a algún compartimento de interés: madera de fuste en árboles, frutos, fracción aérea total, etc. Es importante tener en claro que no necesariamente la EUA instantánea se va a correlacionar con las EUA a otras escalas, aspecto que debe tenerse en cuenta a la hora de decidir si se va a usar o no la técnica del  $^{13}\text{C}$ . Como se mencionó, ésta tiene relación con los procesos a nivel instantáneo. La EUA referida, por ejemplo a la producción de determinado fruto en relación con el agua transpirada por la planta, va a depender además de la asignación que la misma planta haga del C a los frutos.

Definidos estos términos cabe preguntarse cuál es el fundamento por el cuál puede estimarse la EUA instantánea a partir del  $^{13}\text{C}$  de los tejidos. En varias etapas del proceso de fijación de C por parte de las plantas durante la fotosíntesis, ocurren procesos de discriminación en contra del isótopo más pesado del C. En primer lugar, durante la difusión del C desde la atmósfera hasta los espacios intercelulares (proceso físico) existe cierto grado de discriminación (del orden de 4,4 ‰ (O'Leary, 1981)), debido a que las moléculas de  $^{12}\text{CO}_2$  son más livianas que las de  $^{13}\text{CO}_2$  y por lo tanto, difunden más rápido. Luego, durante los procesos bioquímicos que conducen a la fijación del C en compuestos carbonados también ocurre discriminación en contra del  $^{13}\text{C}$ , debido a una mayor afinidad de la Rubisco y la PEP carboxilasa (enzimas claves de la fotosíntesis) por la forma más liviana del C ( $^{12}\text{C}$ ). Esta última discriminación es del orden del 27 ‰ (Roeske y O'Leary, 1984) y difiere entre plantas con metabolismo fotosintético  $\text{C}^3$  y  $\text{C}^4$ . Estos procesos hacen que las concentraciones de  $^{13}\text{C}$  en la fuente (atmósfera) y en el producto (compuestos carbonados producto de la fotosíntesis) posean distinta señal isotópica, siendo menores en el segundo. En la década del '80, Farquhar y Richards (1984) enunciaron una ecuación que relacionaba el grado de discriminación fotosintética del  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta$ ) de manera lineal con la proporción entre la concentración interna de  $\text{CO}_2$  (Ci) y la atmosférica Ca):

$$\Delta = (\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{planta}}) / (1 + \delta^{13}\text{C}_{\text{planta}}) = a + (b' - a) \text{Ci}/\text{Ca}$$

donde a y b' son la tasa de discriminación durante la difusión del  $\text{CO}_2$  y por parte de las enzimas fotosintéticas, respectivamente. Cabe mencionarse que la proporción entre la concentración interna de C (Ci) y la atmosférica (Ca) es un reflejo del balance entre la asimilación neta (A) y la conductancia estomática al  $\text{CO}_2$  (gsc), por la siguiente ecuación:

$$A = \text{gsc} (\text{Ca} - \text{Ci}),$$

y a su vez, gsc se relaciona linealmente con la conductancia estomática al vapor de agua gsw (gsw = 1.6 gsc). De estas relaciones se puede deducir que existe una relación entre la eficiencia intrínseca en el uso del agua (EUAi) y la discriminación del  $^{13}\text{C}$ :

$$\text{EUAi} = A / \text{gsw} = \text{Ca} / 1.6 ((b' - \Delta) / (b' - a))$$

que sirve como base conceptual para inferir cambios o diferencias en EUA.

Es sabido que cuando una planta se encuentra frente a una situación de déficit hídrico, ya sea en el suelo y/o por una alta demanda evaporativa de la atmósfera, tiende a disminuir su conductancia estomática (gs) debido al cierre parcial o total de sus estomas. En ese caso, las enzimas fotosintéticas tienden a fijar preferentemente el  $^{12}\text{C}$ , pero luego, frente a una menor provisión de C por el cierre estomático, disminuye su discriminación en contra del  $^{13}\text{C}$ , aumentando la proporción de este isótopo en los productos carbonados. Como consecuencia de esta fijación de C con los estomas cerrados, la cual implicaría un aumento de la EUA, la teoría propone que va a existir mayor proporción de isótopo raro ( $^{13}\text{C}$ ) en los tejidos. Desde el punto de vista de la notación, esto se verifica como una disminución en  $\Delta$  (menor discriminación en contra del  $^{13}\text{C}$ , es decir, menor diferencia de concentraciones entre fuente y producto) o un aumento del  $\delta^{13}\text{C}$  de los tejidos (valor menos negativo, más cercano a cero), debido a la mayor proporción de  $^{13}\text{C}$ .

Esta es la teoría general, que ha sido utilizada en innumerables estudios de comparación de EUA entre individuos, años dentro de un individuo (distintos

anillos de crecimiento de un árbol), o entre genotipos o especies. Sin embargo, antes de la aplicación de esta metodología es importante conocer sus limitaciones, las que muchas veces no se toman en cuenta en la interpretación de los resultados. Estas limitaciones han sido claramente expuestas y discutidas en el trabajo de Seibt *et al.* (2008) cuya lectura se recomienda. A continuación se presenta una síntesis de estas limitaciones:

- La ecuación lineal de Farquhar y Richards (1984) no toma en cuenta (en realidad, lo incluye implícitamente, pero no permite discriminarlo) el fraccionamiento que ocurre durante la difusión del CO<sub>2</sub> desde la cavidad subestomática al cloroplasto, a través del mesófilo (es decir, asociado a la conductancia del mesófilo, gm). Tampoco contempla el fraccionamiento durante la fotorrespiración. Los estudios más recientes cada vez dan mayor importancia a la gm, variable difícil de cuantificar, y que aparentemente es muy variable, siendo afectada por la condición hídrica de la hoja, el área foliar específica, y la temperatura, entre otros (Long y Bernacchi, 2003). Si las estimaciones de EUA se realizan sobre plantas que poseen intrínsecamente diferente anatomía foliar, o bien diferente condición hídrica, las diferencias en  $\Delta$  encontradas pueden no deberse a diferencias en la EUA sino a distintas gm. Si se hacen estudios en una secuencia temporal (estudios en anillos de crecimiento), la demanda evaporativa (DE) pudo haber cambiado, por lo que los cambios en DE pueden interpretarse como relacionados a la EUA cuando en realidad hay una combinación de cambios en la EUAi y DE con múltiples interpretaciones. Debe recordarse que la ecuación de Farquhar y Richards (1984) permite relacionar funcionalmente la discriminación isotópica del <sup>13</sup>C con la EUA intrínseca (denominador: gs) y no directamente con la real (denominador: E). Por lo tanto, si la demanda evaporativa es la misma para los dos objetos comparados (dos individuos, dos años), la tendencia en un tipo y otro de EUA es también la misma, pero esto no ocurre si la DE difiere entre los objetos de comparación. - La EUA y el  $\delta^{13}\text{C}$  de la planta pueden variar independientemente, influidos por distintos factores. La figura 1 (extraída y traducida de Seibt *et al.*, 2008) muestra qué elementos determinan ambas variables. Estos elementos deben conocerse si se sospecha que

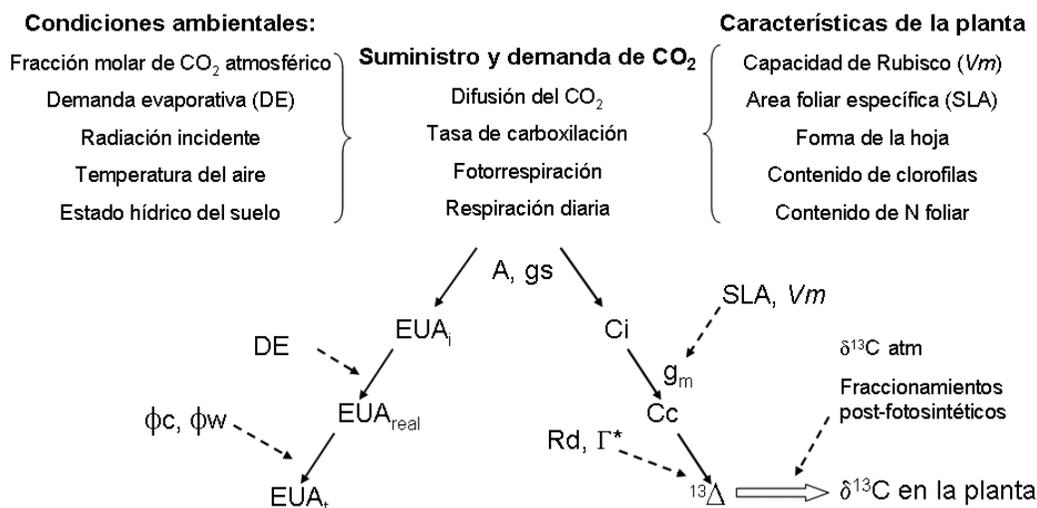
han presentado variaciones entre especies o entre fechas en mediciones temporales, de manera de hacer una correcta interpretación de la EUA a partir de la señal isotópica.

- Otro aspecto a considerar es la posible diferencia en tendencias entre la EUA instantánea (que es la que hemos mencionado hasta ahora) y la total de una planta (EUAt). Aquí participan tres elementos más: el carbono que se perdió en el proceso de respiración, el carbono que se asignó a la parte de la planta cuya productividad se está midiendo (generalmente, parte aérea), y el agua que se pierde sin redundar en crecimiento (evaporación desde el suelo y/o las hojas; transpiración durante la noche, evaporación desde superficies no fotosintéticas). Como se mencionó anteriormente, las eficiencias a nivel instantáneo y la total no necesariamente están correlacionadas.

### 2.1. Muestreo para estudios con <sup>13</sup>C

A diferencia de lo que ocurre en la utilización de otros isótopos (como se verá más adelante con el caso de los presentes en la molécula de agua), el muestreo de tejido vegetal para su análisis de <sup>13</sup>C es sencillo y no requiere demasiados recaudos debido a que no se esperan fraccionamientos durante o posteriores al muestreo. Tanto si se toman hojas como madera, las muestras deben rotularse debidamente, secarse en estufa a una temperatura no superior a 40°C y luego pueden guardarse aún por un tiempo prolongado hasta su análisis. A partir de estas muestras finamente molidas, se analiza su concentración de <sup>13</sup>C en un espectrómetro de masas. En la Argentina, este tipo de análisis es llevado a cabo por el Instituto de Geocronología y Geología Isotópica (INGEIS) del CONICET-UBA ([www.ingeis.uba.ar](http://www.ingeis.uba.ar)). Para tener una idea de costos, cada análisis cuesta aproximadamente U\$S 20 (aunque este valor es variable, y al menos en la actualidad, es un poco superior en Brasil y levemente inferior en la República Oriental del Uruguay). De acuerdo con ello, y siempre en función de la pregunta que se intenta responder y el dinero disponible, se pueden analizar o no muestras compuestas de distintos individuos dentro de un tratamiento, de diferentes anillos de crecimiento de un mismo individuo, de hojas de distintas edades, etc. Es importante recordar que cada órgano, e inclusive cada edad dentro de un ór-

## Controles de la EUA y las señales isotópicas en plantas C3



**Figura 1:** Factores que controlan la eficiencia en el uso del agua (EUA) total de la planta ( $EUA_t$ ) y la señal isotópica en la misma ( $\delta^{13}C_{\text{planta}}$ ).  $A$ = fotosíntesis neta,  $g_s$ = conductancia estomática;  $EUA_i$ =  $iEUA$  intrínseca;  $EUA_{\text{real}}$ = EUA real instantánea;  $DE$ = demanda evaporativa;  $\phi_c$ = carbono perdido en la respiración;  $\phi_w$ = fracción de agua perdida improductivamente (por tejidos no fotosintéticos, evaporación del suelo, transpiración nocturna).  $C_i$ = concentración interna (espacios intercelulares) de  $CO_2$ ,  $g_m$ = conductancia del mesófilo;  $C_c$ = concentración de  $CO_2$  en los cloroplastos;  $SLA$ = área foliar específica;  $V_m$ = capacidad de la Rubisco;  $R_d$ = respiración diaria;  $\Gamma^*$ = punto de compensación de  $CO_2$  en ausencia de respiración en oscuridad;  $^{13}\Delta$ = discriminación del  $^{13}C$ . Extraído y traducido de Seibt *et al.* (2008).

gano (por ej, hojas del año vs hojas del año anterior) pueden diferir dentro de un mismo organismo en su señal de  $^{13}C$ . La cantidad necesaria por muestra es muy pequeña (del orden de 50 mg de material seco). Por lo general, los laboratorios solicitan que cada muestra se envíe previamente molida. Con respecto al número de muestras a analizar por tratamiento/situación, como en cualquier estudio y variable, esto depende de la variabilidad intrínseca de la misma dentro de la escala que se está analizando.

Otro de los aspectos importantes a considerar en los estudios de  $^{13}C$  es el tipo de órgano a muestrear. Diversos estudios han mostrado que la señal isotópica no es igual en los tejidos fotosintéticos (hojas) y los no fotosintéticos (ej. troncos o raíces) de la misma planta, estando más enriquecidos en  $^{13}C$  los segundos. Las causas de estas diferencias no son conocidas, pero sí analizadas a nivel de hipótesis en el trabajo de Cernusak *et al.* (2009). Estas diferencias deben ser tenidas en cuenta a la hora de comparar individuos ya que no es válido utilizar distintos órganos en los distintos individuos como fuente de

información, por lo cual se recomienda comparar siempre el mismo tipo de tejido. Qué órgano es conveniente tomar para distintos casos, es difícil de decir o recomendar a priori. En la literatura, y siempre con intención de estimar EUA, se muestrea indistintamente madera y hojas. El muestreo de tejido foliar es siempre más sencillo, pero como se mencionó no da el mismo resultado que si se muestrea madera. Es claro que si se quiere comparar la EUA entre distintos años (más allá de las limitaciones del caso), se muestrea madera ya que los anillos de crecimiento pueden ser un buen registro de lo que ocurrió año a año. Sin embargo, tampoco esto es garantía de que analizando el  $^{13}C$  del anillo del año  $x$  se esté estimando la EUA en dicho año  $x$ . Esto es debido a que en diversas especies parte del anillo de crecimiento se produce con reservas carbonadas de la temporada precedente (por ej. MacFarlane y Adams, 1998; Skomarkova *et al.*, 2006). Estos aspectos deben ser tomados en cuenta especialmente cuando se intenta asignar un cambio específico de EUA a una temporada en particular, o inclusive a una fracción

de la misma, como ocurre en el uso de esta técnica para reconstrucciones climáticas. En este sentido, el aumento en la concentración de  $^{13}\text{C}$  en determinada fracción del anillo suele interpretarse como una prueba de sequía. Sin embargo, para poder hacer estas interpretaciones debe conocerse muy bien cuál es la asignación del C (respiración, madera, reservas, etc) en cada momento para la especie x ambiente en cuestión, aspecto que en general es muy poco conocido. Para agregar complejidad al análisis, cabe mencionarse que no necesariamente el aumento de  $^{13}\text{C}$  (y de la EUA) se produce como respuesta a la sequía, ya que algunos trabajos muestran que los individuos con menor déficit hídrico son aquellos que presentan mayor EUA (por ej. Warren *et al.*, 2001; Fernández y Gyenge, 2009).

En resumen, como regla general es importante conocer muy bien el sistema de estudio antes de “aventurarse” a una interpretación de los resultados de  $^{13}\text{C}$ . A mi entender, al ser una técnica muy sencilla, suele usársela un poco indiscriminadamente. Si se van a hacer comparaciones entre individuos, idealmente deben estar en un ambiente común y tener una anatomía foliar similar. Siempre se deben comparar los resultados del mismo tipo de órgano.

Finalmente, el grado de variación en los valores posibles de  $\delta^{13}\text{C}$  es bastante bajo, en un rango normal aproximado entre -20 y -28‰.

### **3. Uso de isótopos estables del hidrógeno (D/1H) y oxígeno (18O/16O) para determinar fuentes de agua e interacciones planta-planta**

Los elementos presentes en la molécula de agua se utilizan frecuentemente en dos grandes grupos de estudios ecológico-agronómicos:

- Para determinar fuentes de agua de distintos individuos o especies creciendo en un lugar común, de un individuo/especie en distintos períodos de tiempo, de una misma especie creciendo en distintos ambientes, etc.

- Para comprender interacciones ecológicas mediadas por recursos hídricos, tales como el uso de agua que fue ascendida hidráulicamente desde horizontes inferiores por un individuo, por parte de otro individuo de la misma u otra especie.

En ambos casos, el método se basa en comparar la señal isotópica (denotada como  $\delta^{18}\text{O}$  y  $\delta\text{D}$ ) del agua que está dentro de la planta (en el xilema de la misma) con la del agua de las posibles fuentes. Esta metodología se fundamenta en dos supuestos:

- a- existe fraccionamiento isotópico (discriminación en contra del isótopo raro) durante los procesos físicos que conforman el ciclo del agua (evaporación-condensación en las nubes, en el suelo, etc), el que a su vez, depende de la temperatura. Debido a esto, los procesos que ocurren en distintos momentos del año, donde la temperatura media es diferente, determinan que el agua caída/evaporada en distintos períodos posea una señal isotópica diferente y distintiva

- b- no existe fraccionamiento isotópico en el proceso de toma de agua por parte de las plantas a través de sus raíces. Esto determina que si una planta toma agua de una fuente cuya señal es de x‰, el agua contenida en la misma (antes de pasar por procesos de evaporación que ocurren en las superficies transpiratorias) va a tener la misma señal x‰.

Son numerosos los estudios que han utilizado esta técnica para analizar las fuentes de agua de distintas especies/individuos en comunidades vegetales, así como para analizar la influencia de la presencia de una especie sobre el desempeño de otras. Entre estos últimos puede citarse el trabajo pionero de Caldwell y Richards (1989), donde se prueba por primera vez, mediante la adición de agua pesada (enriquecida en deuterio), que el agua ascendida hidráulicamente por una especie puede ser utilizada por otra. Estudios posteriores, también utilizando isótopos del O y del H, han explorado el rol ecofisiológico de este proceso en otras comunidades vegetales naturales (ej. Dawson, 1993). Son menos numerosos, por el contrario, los estudios que han utilizado esta técnica para analizar interacciones entre especies con valor productivo, como es el caso de sistemas silvopastoriles (Fernández *et al.*, 2008).

#### **3.1. Muestreo para estudios con 18O y D**

A diferencia de lo que ocurre con el C, que está “fijado” en el tejido vegetal que se muestrea y que no puede sufrir fraccionamientos durante este proceso, la evaporación

del agua desde los tejidos vegetales sí produce fraccionamientos, alterando la señal isotópica original (la de la fuente de agua). Este hecho es determinante desde el punto de vista metodológico: al recoger una muestra vegetal es importante que la misma no esté sufriendo procesos de evaporación/transpiración. En el caso de tejidos lignificados (ej. ramas de árboles) este proceso es minimizado por la misma corteza, pero en plantas herbáceas, deberán tomarse muestras de raíces o bien de la base de los macollos, en el interior mismo de la planta. Debido a lo expuesto, en el caso de las especies leñosas, se muestrean tejidos lignificados, como trozos de ramas cuando éstas son finas, o en el caso de que sean inalcanzables por la altura, se puede tomar madera (xilema activo) del tronco con un barreno forestal de por lo menos 12 mm de diámetro. Puede tomarse una muestra del último anillo de crecimiento o aún más profundamente, siempre que se muestre el xilema activo (por donde circula agua activamente) al momento de la medición. Una vez que el material es extraído de la planta, debe colocarse inmediatamente en un recipiente con cierre perfectamente hermético. Se recomiendan viales de vidrio con un cono plástico en el interior de la tapa como se muestra en la fotografía (figura 2, vial Fisher Scientific #03-338-30G). Las muestras deben colocarse en un recipiente refrigerado hasta ser llevadas al laboratorio. Pueden guardarse en



**Figura 2:** Frasco de vidrio con tapa que minimiza evaporación, recomendado para la toma de muestras de tejido vegetal, suelo o agua.

freezer hasta la extracción del agua, que se realiza en una línea de vacío. Los mismos recaudos deben tomarse para el caso de muestras de suelo, cuya agua se analizará como potencial fuente de agua de la vegetación. Las muestras de suelo pueden extraerse de distintas profundidades con un barreno de suelo, y colocarse inmediatamente en los viales herméticos, debidamente rotulados. Asimismo, suelen muestrearse fuentes de agua de pozos, arroyos u otros cuerpos de agua. En este caso, y también para minimizar la evaporación durante el muestreo, éste debe ser veloz y el agua recogerse en un recipiente hermético. Luego de que se toman las muestras, y se cierran los viales, se procede al recubrimiento de las tapas con parafilm®, a fin de aumentar aun más las barreras a la evaporación y consecuente fraccionamiento. La mínima cantidad de muestra de agua a analizar es muy baja (del orden de los microlitros), por lo que alcanza con la extracción de una muestra por individuo (por ej. un trozo de ramita de aprox. 7 cm de largo, o la parte basal de unos 10 macollos en gramíneas) para contar con la cantidad de muestra suficiente para analizar. En el caso del suelo, por supuesto la cantidad va a depender del contenido de agua del mismo, pero llenando con suelo un vial de los que figuran en la figura 2 es suficiente para contar con el agua necesaria para su análisis en el espectrómetro de masas.

Como se mencionó, la extracción del agua desde las muestras de tejido vegetal o suelo se realiza en una línea de vacío a través de la cual migra el vapor de agua extraído desde la muestra, condensándose luego en un recipiente. El vacío es necesario para evitar la contaminación de la muestra con las señales isotópicas propias del vapor de agua presente en el aire (un ejemplo detallado del método de extracción puede consultarse en Shimabuku, 2001). La condensación del agua se obtiene mediante el uso de nitrógeno líquido. Normalmente se envía a analizar el agua extraída de la muestra (suelo, tejido vegetal) a los laboratorios que poseen el espectrómetro. Excepto que se llegue a algún arreglo especial con éstos (que seguramente elevará los costos tanto de análisis como de transporte), los laboratorios reciben el agua y no la muestra “bruta” inicial. Esto hace que deba contarse con una línea de vacío propia para realizar este primer paso previo al

análisis. De acuerdo a mi conocimiento, no existe en la Argentina ningún laboratorio que realice este servicio en forma corriente, pero sugiero que antes de montar una línea se consulte con colegas que hayan montado una previamente para recibir consejos o inclusive para ver si pueden realizar el servicio. Frasco de vidrio con tapa que minimiza evaporación, recomendado para la toma de muestras de tejido vegetal, suelo o agua.

Existen distintos modelos de líneas de vacío. En la figura 3 se muestra la que utiliza el laboratorio de la EPA de los EEUU (Environmental Protection Agency, ISIRF, [www.epa.gov/wed/pages/facilities/isirf.htm](http://www.epa.gov/wed/pages/facilities/isirf.htm), detalles de la confección y partes de esta línea están descriptos en Shimabuku (2001). Otro modelo de línea (figuras 4 y 5), de más fácil armado y uso que la anterior, es la que está instalada en el Laboratorio del Dr. J. Elheringer en la Universidad de Utah (SIRFER, Salt Lake City, EEUU, <http://ecophys.biology.utah.edu/sirfer.html>). Ambas líneas poseen la misma estructura básica conformada por un recipiente donde se pone el vial abierto con la muestra en su interior, unido a otro recipiente donde se colecta el agua extraída desde el primero. Para ello, se calienta el primer brazo donde se encuentra la muestra, el agua de la misma se evapora y difunde hacia el otro brazo, inserto en un recipiente con  $N_2$  líquido, que obliga a que el vapor de agua se condense. Se conecta a esta línea un vacuómetro que permite visualizar que el proceso se efectúe

en vacío de manera de evitar contaminación de la muestra. Una diferencia general entre ambas líneas radica en los materiales con los que están confeccionadas: en la línea de la EPA todo es material de vidrio (se pueden conseguir piezas estándar, que deben unirse mediante soplado por un vidriero), unido mediante uniones esmeriladas y con o-rings. Esta línea posee gran cantidad de uniones entre partes, lo que aumenta la posibilidad de pérdidas de vacío. La línea armada en el laboratorio SIRFER-Utah posee pocas partes de vidrio, que se unen a dispositivos de acero inoxidable, con roscas de tipo Ultra-Torr donde se ajustan los dos brazos de vidrio.

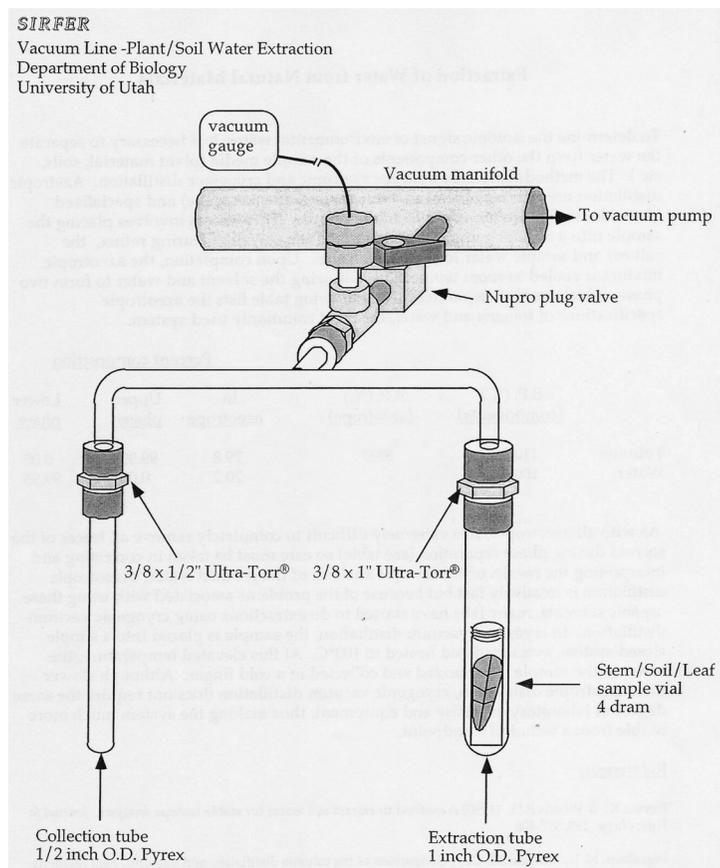
Es de fundamental importancia lograr la evaporación total del agua contenida en la muestra, de manera de evitar el enriquecimiento en el isótopo más liviano (que se evapora y difunde primero) en la muestra que posteriormente se analizará en el espectrómetro de masas. La duración de este proceso es distinta según la cantidad de muestra, el contenido de agua de la misma y la línea de vacío utilizada. Nuestra experiencia con la línea de la EPA indicó un tiempo de extracción de 6 horas por muestra, mientras que en la línea del SIRFER-Utah, utilizan tiempos de extracción de aproximadamente 2 horas por muestra. Una vez que el agua se extrajo de la muestra vegetal o de suelo, se quita el  $N_2$  líquido, se deja que el sistema alcance temperatura ambiente, se abre la línea, se recoge la muestra de agua con una pipeta Pasteur y se co-



Figura 3: Fotografía de la línea construida bajo el sistema de la EPA. A la izquierda: línea funcionando, con el tubo conteniendo la muestra envuelto en un cable con resistencia para proporcionar alta temperatura, y el tubo colector sumergido en  $N_2$  líquido. A la derecha: detalle de uniones de vidrio con válvulas plásticas y conector del vacuómetro.



**Figura 4:** Línea de vacío construida en el laboratorio SIRFER a cargo del Dr. Jim Elheringer, University of Utah. En el tubo más grande de la derecha es donde se coloca la muestra original, y en el tubo pequeño es donde se colecta el agua extraída de la misma. El primero se sumerge en un vaso de precipitado con agua hirviendo, y el segundo en un termo con N<sub>2</sub> líquido. (Fotografía tomada por M.E.Fernández en el laboratorio de referencia).



**Figura 5:** Esquema representando la línea de vacío de la Universidad de Utah (figura 4) extraído de la página web del laboratorio SIRFER.

loca en otro vial con tapa cónica, de menor tamaño. Este pequeño vial con el agua extraída es el que se envía al laboratorio para analizar su concentración isotópica.

Un punto importante a destacar cuando se trabaja con isótopos de la molécula de agua, es que la señal isotópica del D se correlaciona altamente con la del  $^{18}\text{O}$ , debido a los procesos de discriminación diferencial (pero correlacionados) que se producen en los eventos de evaporación-condensación de agua en la atmósfera. Por esta razón, cuando la fuente de agua potencial es el agua de lluvia o nieve, una determinada pregunta se puede responder analizando uno u otro de estos isótopos, ya que en general no darán información independiente. Potencialmente, si habría un aporte de información diferencial si por alguna razón del funcionamiento del sistema de estudio, ocurre una discriminación particular en contra de alguno de los dos isótopos (D u  $^{18}\text{O}$ ), mientras que no ocurre con el otro, alterando la correlación natural del agua meteórica. En este caso particular, el análisis de ambos tipos de isótopos puede brindar información relevante.

En la Argentina, el análisis de muestras de agua para determinación de su concentración de deuterio u  $^{18}\text{O}$  también es llevado a cabo por el INGEIS.

### 3.2. Modelos de mezclas y cuatificación de aportes de distintas fuentes:

Es posible que una planta utilice más de una fuente de agua. El aporte relativo de dos fuentes potenciales puede estimarse cuantitativamente aplicando lo que se denomina un "Modelo de Mezclas" (por ej. Phillips y Gregg, 2003), que se basa en las siguientes ecuaciones simples:

$$\begin{aligned}\delta m &= \delta A pA + \delta B pB \\ pA + pB &= 1\end{aligned}$$

$$\text{entonces: } pA = (\delta m - \delta B) / (\delta A - \delta B)$$

donde  $\delta m$ ,  $\delta A$  y  $\delta B$  son la señal isotópica en la mezcla (agua xilemática), la fuente A y la fuente B potenciales, y pA y pB son la proporción del agua de la fuente A y de la fuente B en la mezcla, respectivamente. Cuantos más elementos diferentes (e independientes) se tenga para un estudio de este

tipo, más fuentes potenciales pueden discriminarse. En los ejemplos con agua, y debido a que la marca isotópica del O y del H están fuertemente correlacionadas, sólo pueden cuantificarse el aporte diferencial de dos fuentes distintas de este recurso (por ejemplo, agua superficial y agua subterránea; agua del suelo en general y agua enriquecida por el experimentador; agua ascendida hidráulicamente por una planta vs agua presente en el suelo superficial, etc.).

## 4- Otros usos de los isótopos estables en ciencias ambientales

Son numerosos los usos de isótopos estables en las ciencias ambientales, incluyendo los isótopos de los elementos ya vistos, pero con otros fines, o bien los de otros elementos químicos. El análisis exhaustivo de los mismos escapa a los objetivos y alcance del presente capítulo, haciéndose sólo una enumeración de algunos de ellos:

- Uso de  $^{13}\text{C}$  en estudios de dinámica del C en el suelo cuya materia orgánica provenga de distintas tipos de vegetación (plantas C4 vs C3, que poseen distinta señal isotópica), en función de cambios en el uso de la tierra o prácticas agrícolas. Estos estudios se basan en que durante el proceso de formación de materia orgánica no hay discriminación del  $^{13}\text{C}$ , por lo tanto, la materia orgánica conserva la marcación de la vegetación que le dio origen (Boutton, 1996).

- Uso de  $^{15}\text{N}$  en estudios de fertilidad de suelos y nutrición de plantas, en los que en general se adiciona un compuesto enriquecido en  $^{15}\text{N}$  en el medio a fin de cualicuantificar el uso del material marcado (ej. un fertilizante, o una determinada forma molecular del N, como amonio o nitrato) por distintas plantas/bacterias, las tasas de transformación del mismo, o la dilución de ese marcador por parte de la mineralización de la materia orgánica del suelo.

- Uso de varios elementos en hidrología, para analizar fuentes de recarga en cuencas, mezclas de fuentes de agua, tiempo medio de residencia de acuíferos confinados, fuentes de contaminación de aguas, etc. Los estudios en hidrogeología utilizan además de los isótopos de los elementos de la molécula de agua, otros trazadores, algunos

estables (ej. isótopos del Helio, C, N y S) y otros radiactivos (isótopos del Argón, Uranio, Radón, etc).

- Uso de  $^{18}\text{O}$  y  $\text{D}$  presentes en celulosa de distintos anillos de crecimiento para reconstrucción paleoclimática.

- Uso de diversos elementos para estudiar ciclos biogeoquímicos en los océanos. Por ejemplo, el fosfato disuelto en los océanos covaría linealmente con el  $^{13}\text{C}$ , usándose éste último como estimador del primero para analizar nutrientes disueltos; asimismo, el  $^{18}\text{O}$  puede utilizarse como estimador para estimar patrones regionales de salinidad de distintos mares y océanos; el  $^{13}\text{C}$  también se utiliza para analizar perfiles de circulación de corrientes a distintas profundidades, etc.

- Uso de  $^{13}\text{C}$  en estudios de caparazones de plankton marino para reconstrucción paleoclimática, a partir de análisis de perfiles en hielos o sedimentos.

- Uso de  $^{13}\text{C}$  en estudios de dietas de animales actuales y paleofauna: "eres lo que comes", por lo que cambios en la vegetación a nivel geológico (por ej., difusión de plantas  $\text{C}_4$ ) se reflejan en el registro de  $\text{C}$  en los huesos fósiles. Asimismo, distintas fuentes de alimentación (por ejemplo, a través de rutas migratorias), quedan registradas en el esmalte de los dientes y pelos de los mamíferos, así como en las barbas de las ballenas.

- Uso de  $^{15}\text{N}$  en reconstrucción de cadenas tróficas: los distintos eslabones y miembros de un eslabón de la cadena trófica poseen distinta discriminación en contra del  $^{15}\text{N}$  a nivel metabólico, lo que permite analizar fuentes de dietas de eslabones superiores.

- Uso de  $^{13}\text{C}$  en estudios de ciclo de  $\text{C}$  a nivel ecosistémico y global: se analiza el  $^{13}\text{C}$  de la atmósfera en distintos lugares, cuya concentración depende de la fijación del  $\text{CO}_2$  que se realiza en océanos y tierra firme, donde los fraccionamientos son diferentes de acuerdo a los procesos físico-biológicos involucrados.

El libro "Isótopos Estables en Agroecosistemas" (Lazzari y Videla Eds., 2007) es un intento por reunir los trabajos que se están llevando a cabo con estas metodologías en la Argentina (con aportes de Brasil y Uruguay), incluyendo sólo los estudios en sistemas agronómico-forestales. Se recomienda su consulta si se desea contactar grupos en nuestro país.

El curso de postgrado "Stable Isotope Ecology" que dicta anualmente la Univ. of Utah, a cargo del Dr. J. Elheringer y con la participación de numerosos profesionales reconocidos, constituye una excelente introducción teórico-práctica a este tema, abarcando todo el espectro de aplicaciones antes mencionados.

## 5. Bibliografía

- Barrie A y S J Prossed (1996) Cap 1: Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. pp: 1-46. En: Mass Spectrometry of Soils. TW Boutton y S. Yamasaki Eds. Marcel Dekker Inc., NY. pp. 517.
- Boutton, T W (1996) Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. pp. 47-82. En: Mass Spectrometry of Soils. TW Boutton y S Yamasaki Eds. Marcel Dekker Inc., NY. pp. 517.
- Caldwell M M y J H Richards (1989) Hydraulic lift: water efflux from upper roots improves effectiveness of water uptake by deep roots. *Oecologia*. 79:1-5
- Cernusak L A, G Tcherkez, C Keitel, W K Cornwell, L S Santiago, A Knohl, M M Barbour, D G Williams, P B Reich, D S Ellsworth, T E Dawson, H G Griffiths, G D Farquhar y I J Wright (2009) Why are non-photosynthetic tissues generally  $^{13}\text{C}$  enriched compared with leaves in  $\text{C}_3$  plants? Review and synthesis of current hypotheses. *Functional Plant Biology*. 36: 199-213
- Clark, I D y P Fritz (1997) Cap. 1: The environmental isotopes. En: Environmental Isotopes in Hydrogeology. pp: 2-34, Lewis Publishers, NY. pp. 328.
- Dawson, T E (1993) Hydraulic lift and water use by plants: implications for water balance, performance and plant-plant interactions. *Oecologia*. 95: 565-574.
- Dawson T E y P D Brooks (2001) Cap. 1: Fundamentals of stable isotope chemistry and measurement. pp: 1-18. En: Stable Isotope Techniques in the Study of Biological processes and functioning of ecosystems. M Unkovich, J Pate, A McNeill y J Gibbs. Eds., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp.289.
- Dawson, T E, S Mambelli, A H Plamboeck, P H

- Templer y K P Tu (2002) Stable Isotopes in Plant Ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33: 507-59.
- Farquhar G D, R A Richards (1984) Isotopic composition of plant carbon correlates with water use efficiency of wheat genotypes. *Aust J Plant Physiol.* 11:539-552.
- Fernández, M E, J E Gyenge, J Licata, T M Schlichter y B Bond (2008) Belowground interactions for water between trees and grasses in a temperate semiarid agroforestry system. *Agroforestry Systems.* 74: 185-197.
- Fernández, M E y J E Gyenge (2009) Testing Binkley's hypothesis about the interaction of individual tree water use efficiency and growth efficiency with dominance patterns in open and close canopy stands. *For. Ecol. Manage.* 257: 1859-1865
- Lázzari M A y C Videla Eds (2007) Isótopos estables en agroecosistemas. Edición de la Univ. Nac. de Bahía Blanca. 165 pp.
- Long S P y C J Bernacchi (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Exp J Bot.* 54 (392): 2393-2401.
- MacFarlane C y M A Adams (1998)  $\delta^{13}\text{C}$  of wood in growth-rings indicates cambial activity of drought-stressed trees of *Eucalyptus globulus*. *Func Ecol.* 12: 655-664.
- O'Leary MH (1981) Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry.* 20: 553-567.
- Phillips D L y J W Gregg (2003) Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Oecologia.* 136(2): 261-269
- Roeske C A y M H O'leary (1984) Carbon isotope effects on the enzyme-catalyzed carboxylation of ribulose bisphosphate. *Biochemistry.* 23: 6275-6284.
- Seibt U, A Rajabi, H Griffiths y J Berry (2008) Carbon isotopes and water use efficiency: sense and sensitivity. *Oecologia.* 155: 441-454.
- Shimabuku R (2001) Water extraction and processing. ISIRF, sip/AP 02, version 2.00. pp. 1-23.
- Skomarkova M V, E A Vaganov, M Mund, A Knohl, P Linke, A Boerner y E D Schulze (2006) Inter-annual and seasonal variability of radial growth, wood density and carbon isotope ratios in tree rings of beech (*Fagus sylvatica*) growing in Germany and Italy. *Trees.* 20: 571-586.
- Warren C R, J F McGrath y M A Adams (2001) Water availability and carbon isotope discrimination in conifers. *Oecologia.* 127: 476-486.