Desarrollo de un sistema electrónico para la medida de la fluorescencia de clorofilas en plantas

Alumnos: Jorge Parra García y Jordi Germán Calle León
Tutor IES "Alcántara" (Alcantarilla): Teresa de Jesús García Martínez
Investigadores: Juan Suardiaz (UPCT) y José A. Hernández (CEBAS-CSIC)

La fluorescencia es un fenómeno foto-físico de las moléculas de clorofila que permite estudiar la función del fotosistema II (PSII) durante el transporte electrónico en la fotosíntesis y su sensibilidad al daño que puede sufrir por efecto de diferentes estreses, y las consecuencias que esto tiene en el transporte electrónico, y por tanto en el proceso global de la fotosíntesis. En el presente trabajo se ha evaluado los cambios que tienen lugar en la fluorescencia de clorofilas en plantas de guisante y de brócoli en respuesta a diferentes estreses ambientales.

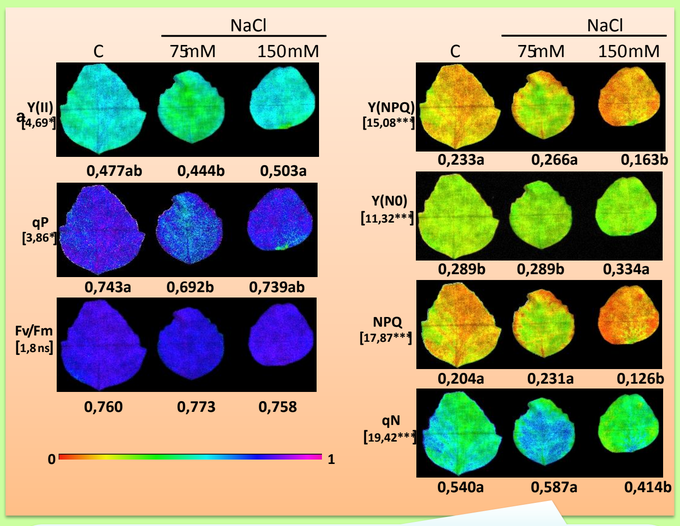
El objetivo final de este trabajo es el desarrollo de un sistema electrónico de bajo coste basado en Arduino o similar que permita detectar la emisión de fluorescencia de clorofilas y comparar su funcionamiento con un equipo profesional (IMAGIM-PAM, M-series, Heinz Walz, Effeltrich, Germany).

PARTE BIOLÓGICA

Análisis de muestras

RESULTADOS

SALINIDAD



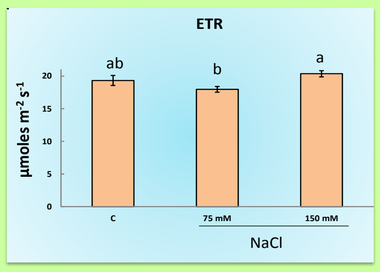
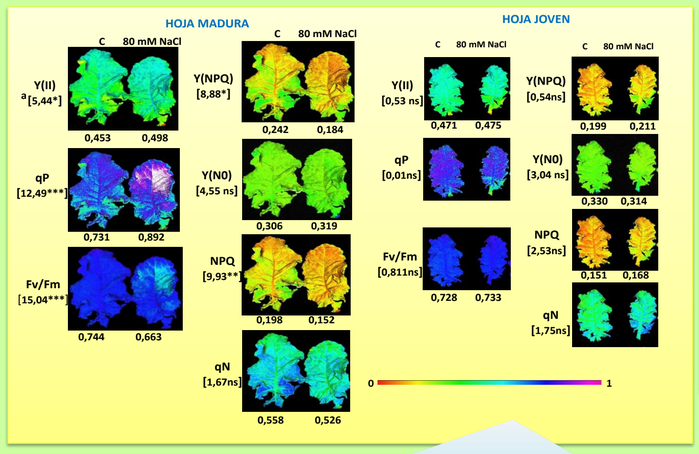


Fig 1.- Efecto del tratamiento con NaCl durante 4 días de plantas de guisante sobre diferentes parámetros de fluorescencia de clorofilas y sobre la tasa de transporte electrónico (ETR, expresada como µmoles de electrones m-2 s-1). Los datos representan la media de al menos 20 medidas. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de múltiple de Tukey (P< 0.05). ªValores de F del análisis ANOVA de un factor. Los valores de F eran significativos con un nivel de probabilidad del 95% (*), 99 (**) o del 99.9% (***). ns (no significativo).

El nivel 150 mM provocaba descensos en los parámetros de quenching no fotoquímico Y(NPQ), NPQ y qN, y un aumento del parámetro Y(N0). Estos cambios indican que estas plantas presentan una menor capacidad para defender al cloroplasto frente a daños fotooxidativos provocados por un exceso de energía luminosa.

HOJAS DE GUISANTES *(Pisum sativum L.)*



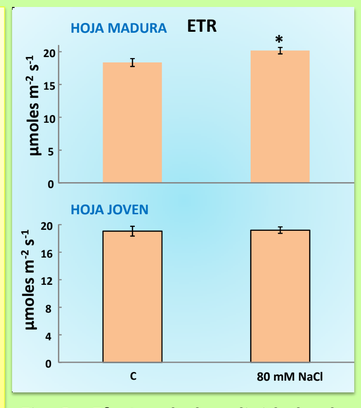


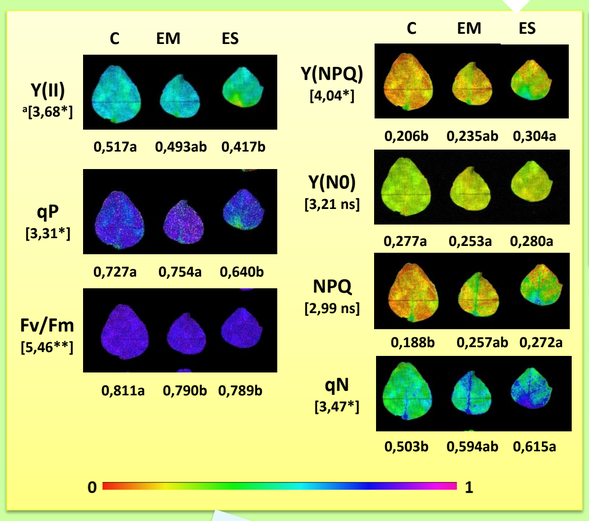
Fig. 2.- Efecto de la salinidad sobre diferentes parámetros de fluorescencia de clorofila y tasa de transporte electrónico (ETR, µmol electrones m-2 s-1) en hojas maduras y jóvenes de brócoli. Los datos representan la media de al menos 10 medidas. ªValores de F del análisis ANOVA de un factor. Los valores de F eran significativos con un nivel de probabilidad del 95% (*), 99% (**) o del 99,9% (***). ns, no significativo.

En hojas maduras se producía una estimulación del transporte electrónico, un aumento del rendimiento cuántico (Y(II)) y de qP, pero se producía un descenso de los parámetros relacionados con la disipación segura del exceso de energía. En hoja joven la salinidad no afectaba al proceso fotosintético.

HOJAS DE BRÓCOLI *(Brassica oleracea L.)*

ESTRÉS HÍDRICO

HOJAS DE GUISANTES *(Pisum sativum L.)*



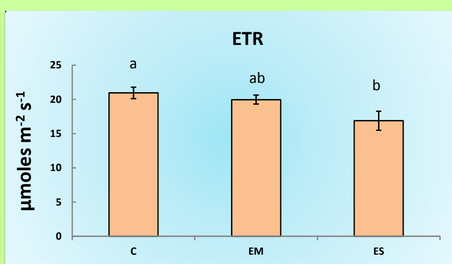
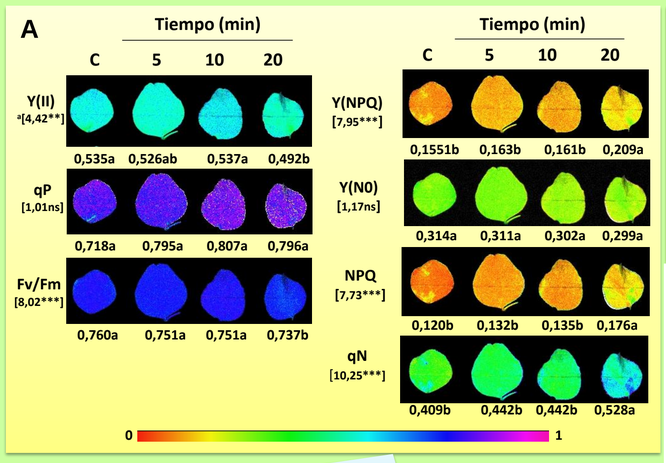


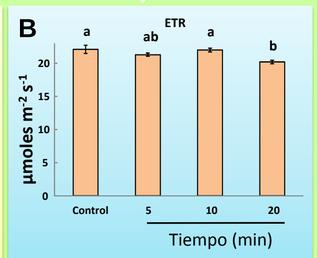
Fig .3.- Efecto del estrés hídrico sobre diferentes parámetros de fluorescencia de clorofilas y sobre la tasa de transporte electrónico (ETR, expresada como µmoles de electrones m-2 s-1), en plantas de guisante. Los datos representan la media de al menos 15 medidas. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de múltiple de Tukey (P< 0.05). ªValores de F del análisis ANOVA de un factor. Los valores de F eran significativos con un nivel de probabilidad del 95% (*), 99 (**) o del 99.9% (***). ns (no significativo). C, Control; EM, estrés moderado, ES, estrés severo.

El estrés hídrico moderado, en general no afectaba de forma significativa a los parámetros de fluorescencia, a excepción de un descenso en Fv/Fm (eficiencia del PSII). El estrés hídrico severo, también producía un descenso en Fv/Fm así como en el rendimiento cuántico [Y(II)] y en qP y un descenso en la tasa de transporte electrónico (ETR). Sin embargo, en este caso las plantas activaban los mecanismos de disipación del exceso de energía de una forma segura (es decir, Y(NPQ), NPQ y qN).

ALTA INTENSIDAD LUMINOSA

HOJAS DE GUISANTES *(Pisum sativum L.)*





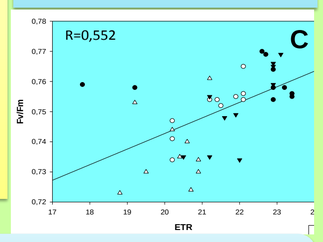
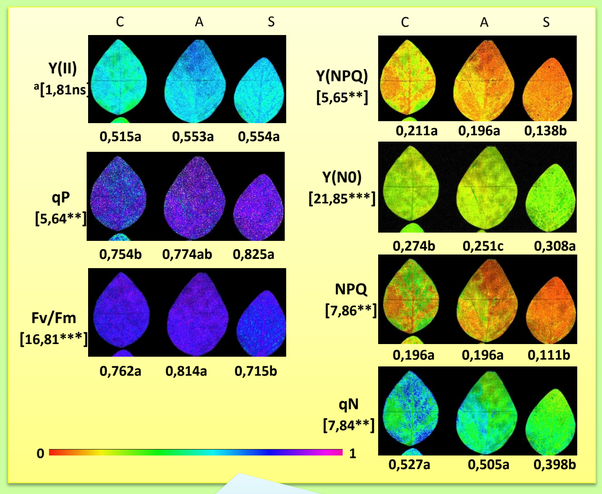
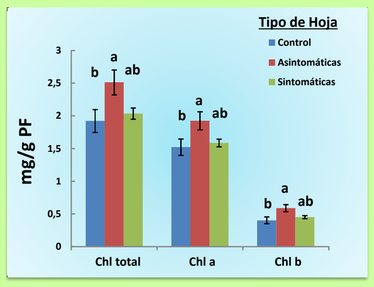


Fig.4.- Efecto de la alta intensidad luminosa (100 µmol electrones m-2 s-1) sobre diferentes parámetros de fluorescencia de clorofilas (A) y sobre la tasa de transporte electrónico (ETR, expresada como µmoles de electrones m-2 s-1) (B) en hojas de guisante. Los datos representan la media de al menos 10 medidas. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de múltiple de Tukey (P< 0.05). ªValores de F del análisis ANOVA de un factor. Los valores de F eran significativos con un nivel de probabilidad del 95% (*), 99 (**) o del 99.9% (***). ns (no significativo). C: Grafico de correlación entre Fv/Fm y ETR.

Un tratamiento por alta intensidad luminosa durante 20 min reducía Y(II), Fv/Fm y ETR. Sin embargo, activa los mecanismos de disipación de exceso de energía mediante calor (aumento de Y(NPQ), NPQ y qN. Igualmente se puede comprobar una correlación positiva entre ETR y Fv/Fm.

Plum Pox Virus





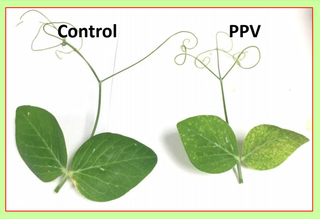


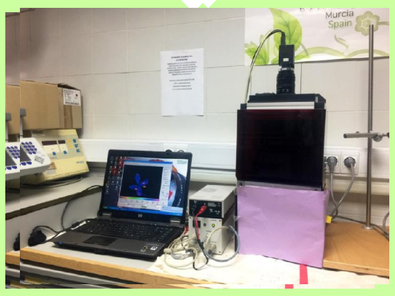
Fig. 5.- Efecto de la infección por Plum pox virus sobre diferentes parámetros de fluorescencia de clorofilas (A), los contenidos de clorofila (B) y en los síntomas de PPV (C) en hojas de guisante. Los datos representan la media de al menos 10 medidas. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de múltiple de Tukey (P< 0.05). ªValores de F del análisis ANOVA de un factor. Los valores de F eran significativos con un nivel de probabilidad del 95% (*), 99 (**) o del 99.9% (***). ns (no significativo). C, hoja control; A: hoja infectada asintomática; S: hoja infectada con síntomas.

No hay un efecto en ETR. Hojas A y S responden de forma diferente, que podría estar relacionado con el aumento del contenido de Clorofilas (total, a y b). Si bien la infección no afectaba a los parámetros de quenching fotoquímico (incluso aumentaban), los mecanismos de protección está, disminuidos (Y(NPQ), NPQ y qN). Además se observaba un aumento del parámetro Y(N0). Estos cambios indican que estas plantas presentan una menor capacidad para defender al cloroplasto frente a daños fotooxidativos provocados por un exceso de energía luminosa.

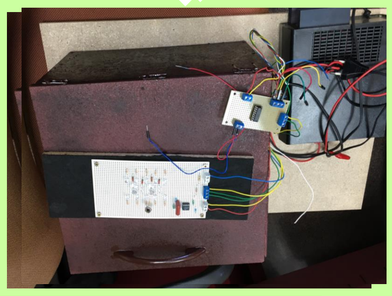
PARTE TECNOLÓGICA

Desarrollo del prototipo

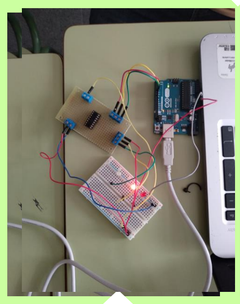
APARATO A SIMULAR: FLUORÍMETRO



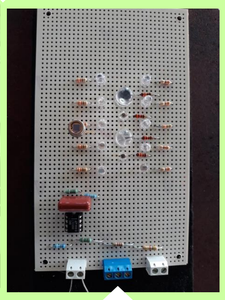
APARATO SIMULADO



COMPONENTES



Placa Arduino
Driver de potencia



Amplificador de transimpedancia
LEDS + Fotodiodo

PROGRAMACIÓN

```
Circuito_definitivo
#define LEDA 3
#define LEDB 4
#define LEDC 5
#define TIEMPO 1000
int iTiempo;
int iFotodiodo;
void setup() {
  pinMode (LEDA, OUTPUT);
  pinMode (LEDB, OUTPUT);
  pinMode (LEDC, OUTPUT);
  digitalWrite (LEDA, LOW);
  digitalWrite (LEDB, LOW);
  digitalWrite (LEDC, LOW);
  Serial.begin (9600);
  iTiempo=0;
  iFotodiodo=0;

  // put your setup code her
}

void loop() {
   delay (3*TIEMPO);
  Serial.print("Oscuridad");
  Serial.print("\t");
  // Empezamos a 0 durante x
  digitalWrite (LEDA, LOW);
  digitalWrite (LEDB, LOW);
  digitalWrite (LEDC, LOW);
```

```
Circuito_definitivo
void loop() {
   delay (3*TIEMPO);
  Serial.print("Oscuridad");
  Serial.print("\t");
  // Empezamos a 0 durante x segundos
  digitalWrite (LEDA, LOW);
  digitalWrite (LEDB, LOW);
  digitalWrite (LEDC, LOW);
   delay (2*TIEMPO);
  iFotodiodo=analogRead(A0);
  iTiempo=iTiempo+TIEMPO/1000;
  Serial.print(iTiempo);
  Serial.print("\t");
  Serial.println(iFotodiodo);

  // Encendemos A durante 20 segundos
  Serial.print("Azul");
  Serial.print("\t");
  digitalWrite (LEDA, HIGH);
  digitalWrite (LEDB, LOW);
  digitalWrite (LEDC, LOW);
   delay (20*TIEMPO);
  iFotodiodo=analogRead(A0);
  iTiempo=iTiempo+TIEMPO/1000;

  Serial.print(iTiempo);
  Serial.print("\t");
  Serial.println(iFotodiodo);
```

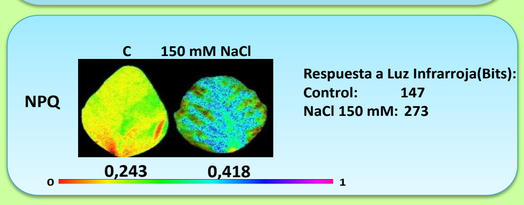
```
Circuito_definitivo
  // Encendemos A y B durante x segundos
  Serial.print("Azul Saturado");
  Serial.print("\t");

  digitalWrite (LEDA, HIGH);
  digitalWrite (LEDB, HIGH);
  digitalWrite (LEDC, LOW);
  delay (2*TIEMPO);
  iFotodiodo=analogRead(A0);
  iTiempo=iTiempo+TIEMPO/1000;
  Serial.print(iTiempo);
  Serial.print("\t");
  Serial.println(iFotodiodo);

  // Encendemos C durante x segundos
  Serial.print("Infrarrojo");
  Serial.print("\t");
  digitalWrite (LEDA, LOW);
  digitalWrite (LEDB, LOW);
  digitalWrite (LEDC, HIGH);
  delay (2*TIEMPO);
  iFotodiodo=analogRead(A0);
  iTiempo=iTiempo+TIEMPO/1000;

  Serial.print(iTiempo);
  Serial.print("\t");
  Serial.println(iFotodiodo);
```

Hemos comparado el prototipo (coste aproximado 100 €) con equipo profesional (30000 €) en plantas sometidas a estrés salino. De forma cualitativa y cuantitativa, su funcionamiento es parecido al equipo profesional cuando las hojas se iluminan con luz roja (660 nm) e infrarroja cercana (850 nm), en relación con los parámetros Y(NPQ), NPQ y qN.



CONCLUSIONES

Los parámetros de fluorescencia de clorofilas responden de forma diferente dependiendo del tipo de estrés al que se someta a las plantas. La salinidad y la infección por PPV disminuían los parámetros de quenching no fotoquímico, indicando una menor capacidad de la planta para eliminar el exceso de poder reductor de forma segura. Sin embargo, las plantas sometidas a estrés hídrico severo o a la alta intensidad luminosa reducían los parámetros de quenching fotoquímico y la ETR, pero inducían los parámetros de quenching no fotoquímico. Esta respuesta indica un doble mecanismo de protección: por un lado reducen el transporte electrónico (ETR) y la actividad del PSII (Fv/Fm), y por otro lado activa mecanismos de disipación del exceso de poder reductor en forma de calor.

En conclusión, este trabajo muestra como la técnica de fluorescencia de clorofilas es muy útil para valorar tanto situaciones de estrés abiótico como biótico, pudiendo analizar el efecto de dichos estreses en el cloroplasto, incluso antes de que se observen señales de síntomas en las hojas.