

LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA *a* COMO HERRAMIENTA EN LA INVESTIGACIÓN DE EFECTOS TÓXICOS EN EL APARATO FOTOSINTÉTICO DE PLANTAS Y ALGAS*

Sergio González Moreno, Hugo Perales Vela, Martha O Salcedo Alvarez

RESUMEN

El análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II del aparato fotosintético de plantas terrestres, acuáticas y algas hace posible caracterizar los efectos y modos de acción de diferentes tipos de estrés ambiental (temperatura, sequía, alta intensidad luminosa, salinidad, inundación) y diversos contaminantes del agua como metales pesados, herbicidas, detergentes, así como de una variedad de compuestos contaminantes del aire. También puede ser de gran ayuda en la identificación de contaminantes tóxicos y sus fuentes. Este método de análisis puede ser aplicable a las plantas o algas intactas *in situ* e *in vivo*, o a cloroplastos aislados, siendo además, no invasivo o destructivo, rápido y sensible.

PALABRAS CLAVE: fotosíntesis, fluorescencia de clorofila *a*, plantas, algas, efectos tóxicos.

ABSTRACT

Chlorophyll *a* fluorescence emission analysis of photosystem II from the photosynthetic apparatus of terrestrial and aquatic plants and algae makes possible to characterize the effects and modes of action of different kinds of environmental stress (temperature, drought, high irradiance, salinity, flooding), several water pollutants such as heavy metals, herbicides, detergents, and a variety of air pollutants, as well. It may be of great help for identification of toxic pollutants and their sources. In addition, this method of analysis can be applied to plants and algae *in situ*, and *in vivo* or to isolated chloroplasts, is not invasive neither destructive and it is a fast and sensitive technique.

KEY WORDS: photosynthesis, chlorophyll *a* fluorescence, plants, algae, toxic effects.

INTRODUCCIÓN

La fotosíntesis es el proceso por el cual las plantas, algas, cianobacterias y bacterias fotosintéticas convierten la energía luminosa en energía química en forma de enlaces químicos y es la base de todas las cadenas alimenticias de las que depende la vida animal y humana.

El proceso fotosintético se inicia cuando la luz es absorbida por los pigmentos fotosintéticos (básicamente clorofila *a*, *b* y carotenoides) de los complejos antena de la membrana fotosintética. Parte de la energía ab-

sorbida es transferida como energía de excitación y atrapada por el centro de reacción, en donde es utilizada para hacer trabajo químicamente útil, y la otra parte es disipada principalmente como calor y en menor grado re-emitida como energía luminosa de menor energía (fluorescencia). Esta distribución de la energía en los tres procesos ocurre simultáneamente, de tal forma que el incremento en la eficiencia de uno de ellos, resultará en la disminución de los otros dos. Por lo tanto, a través de la medición del rendimiento de la fluorescencia de la clorofila

se puede obtener información de la eficiencia fotoquímica y la disipación térmica de la energía absorbida (1). En los complejos antena, la energía de un fotón absorbido se suma a la de la molécula de pigmento que la absorbe, quedando ésta en un estado excitado inestable, con marcada tendencia a ceder este exceso de energía denominado energía de excitación o excitón y volver al estado fundamental de energía mínima. La desexcitación se efectúa por tres rutas: a) pérdida de energía como calor; b) como transferencia de energía a otras moléculas suficiente-

*Recibido: 29 de febrero de 2008 Aceptado: 11 de noviembre de 2008

Laboratorio de Bioquímica, Unidad de Morfofisiología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalneapantla, Estado de México, México. CP 54090. Correo E: sergon_9@yahoo.com

mente cercanas y c) liberación de energía radiante como fotón visible de menor energía (fluorescencia) que el que causó la formación del estado excitado. La energía transferida entre las clorofilas de las antenas y canalizada a las clorofilas del centro de reacción hace que, en éstas, un electrón pase del estado basal a un estado excitado. Cuando la molécula de clorofila excitada pierde un electrón, se produce la separación de carga eléctrica dentro del centro de reacción (quedando la clorofila α oxidada ($\text{Chl } \alpha^+$) y una molécula de feofitina aceptora del electrón reducida (Pheo)). Esto se conoce como evento fotoquímico primario y utiliza alrededor del 97% de los fotones absorbidos, mientras que el 2.5 % son transformados a calor y 0.5% son re-emitidos como luz fluorescente roja. Si no ocurre la separación de carga, 95-97% de la energía luminosa absorbida se libera como calor y 2.5-5.0% como fluorescencia. En las plantas, las moléculas de clorofila α asociadas a los fotosistemas I y II (PSI, PSII) son las responsables de la emisión de la fluorescencia, sin embargo, a la temperatura de ambiente (25°C), la contribución del PSI a la emisión total es mínima en comparación con el PSII. Las características cinéticas de la reacción de la fluorescencia emitida son determinadas por la intensidad luminosa de excitación, la concentración de pigmentos que absorben la luz, la transferencia de la energía de excitación, la naturaleza y orientación de los pigmentos fluorescentes, el estado redox de aceptores y donadores del PSII, el apilamiento de los tilacoides y la translocación de protones, entre otros. En condiciones naturales, *in vivo*, la emisión de fluorescencia de los sistemas fotosintéticos cambia continuamente siguiendo su adaptación al ambiente cambiante. Diversos factores físicos o químicos de estrés ambiental como temperaturas altas, heladas,

sequía, cambios en la intensidad luminosa, salinidad, deficiencias nutricionales, presencia de metales pesados, detergentes, herbicidas y ozono entre otros, afectan la función del PSII de manera directa o indirecta lo cual modifica la emisión de la fluorescencia. Por ello, los cambios en la emisión de la fluorescencia, pueden utilizarse para revelar mecanismos de respuesta, cuantificación de respuestas al estrés e identificación de ciertos contaminantes y sus fuentes (1-4).

Las primeras evidencias de la relación entre las reacciones primarias de la fotosíntesis y la emisión de fluorescencia de la clorofila del PSII se tuvieron al exponer a la luz, hojas adaptadas a la oscuridad, donde se obtuvo un registro de emisión de fluorescencia roja. La curva de inducción de fluorescencia (conocida como "cinética de Kautsky", en honor a quien la describió) mostró una fase de incremento rápido de fluorescencia en el primer segundo de iluminación seguida de una fase lenta de declive de fluorescencia durante varios minutos. La "fase rápida", O-I-D-P (cada una designada secuencialmente por las letras O, J, I, P), también llamada O-J-I-P, está relacionada principalmente con eventos primarios del PSII. Por otro lado, la "fase lenta" compuesta de las fases o inflexiones P-S-M-T, está asociada principalmente con interacciones entre procesos de las membranas de los tilacoides y procesos metabólicos en el estroma del cloroplasto, relacionados con un incremento en la asimilación de CO_2 (Fig. 1). El aumento de fluorescencia en la "fase rápida" O-P se ha explicado como una consecuencia de la reducción (ganancia de electrones) del total de aceptores de electrones en el PSII, particularmente la quinona A (Q_A) y la plastoquinona (PQ). Una vez que el PSII absorbe luz y Q_A ha aceptado un electrón, no es capaz de aceptar otro hasta que el primero ha pasa-

do al siguiente acarreador de electrones, la quinona B (Q_B). Durante este periodo, el centro de reacción está "cerrado" porque está totalmente reducido. En cualquier punto en el tiempo, la presencia de una proporción de centros de reacción reducidos "cerrados", conduce a una disminución en la eficiencia fotoquímica, con un correspondiente incremento en la fluorescencia. Después de esto, a partir de la fase P y hasta la fase T, el nivel de fluorescencia empieza a decaer en el transcurso de minutos. Aunque muchos factores pueden modificar la fluorescencia de las membranas tilacoides, son principalmente dos los que hacen la mayor contribución al nivel de fluorescencia durante la fases de decaimiento P-T; el primero es el estado redox de Q_A y el segundo, la magnitud del gradiente de potencial electroquímico protónico (ΔpH) que existe a través de las membranas tilacoides. Los cambios en el estado redox de Q_A ocurren como resultado de cambios en la velocidad de transporte de electrones no cíclico y el incremento en el consumo de NADPH por el metabolismo del carbono lo que resulta en un incremento en la velocidad de transporte de electrones y oxidación de Q_A . El decaimiento de fluorescencia debido a la oxidación de Q_A se ha denominado "decaimiento fotoquímico" qP , mientras que, el debido a cambios en la magnitud del gradiente de potencial electroquímico protónico transtilacoidal se denomina "decaimiento no fotoquímico" (qNP). La magnitud del coeficiente de decaimiento no fotoquímico (qNP) refleja además de los cambios en el gradiente de pH, inactivación de centros de reacción (fotoinhibición), cambios conformacionales dentro de los complejos de pigmentos en la membrana tilacoide, desconexión de complejos cosechadores de luz móviles del PSII, formación de zeaxantina, disminu-

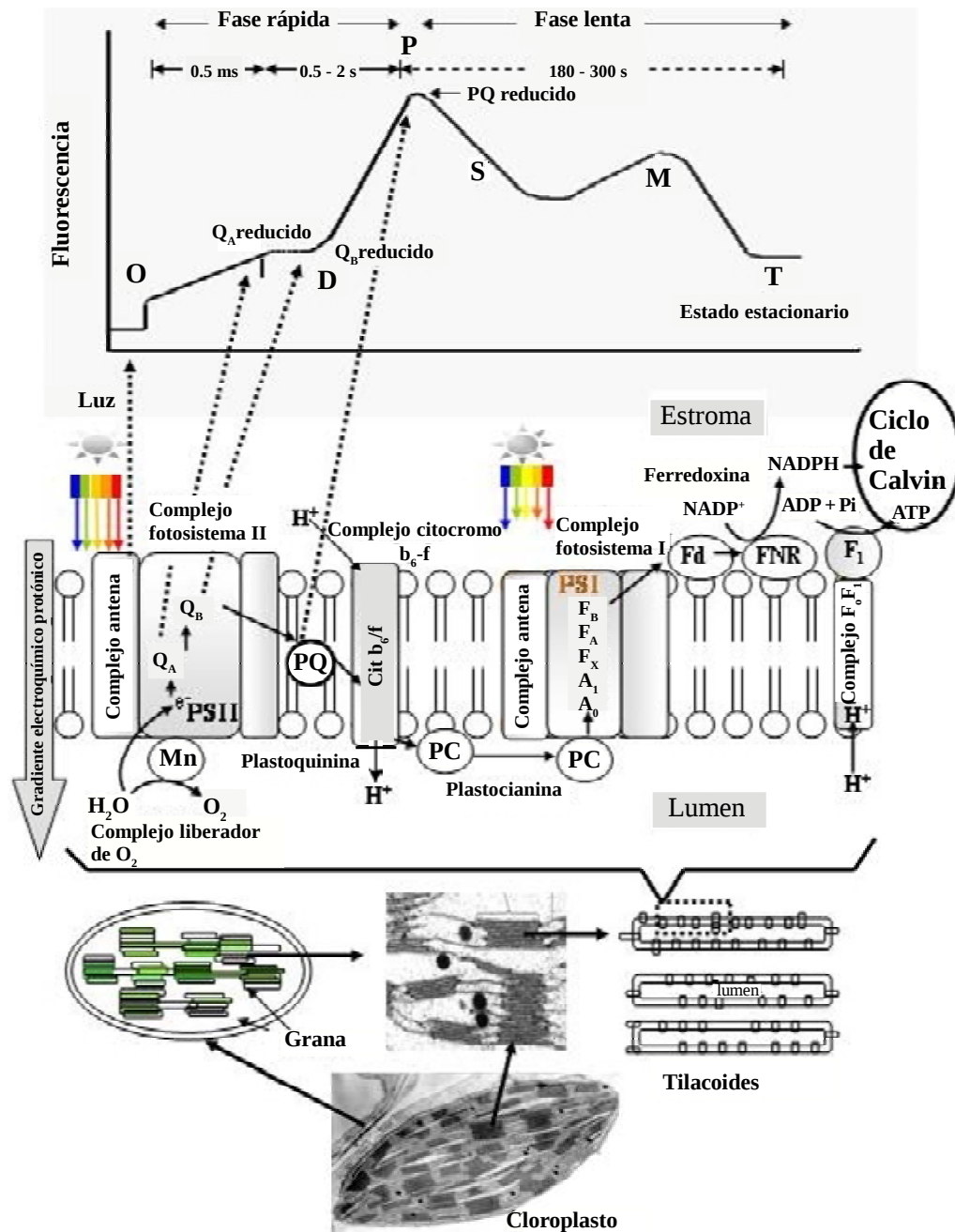


Figura 1. Curva de inducción de fluorescencia de clorofila *a* (fases rápida y lenta, OJIPQ) y su correspondencia con las reacciones de la cadena transportadora de electrones. La primera señal registrada se denominó O (Origin) y su intensidad usualmente se expresa como F_o (fluorescencia inicial o basal). En este punto, Q_A está en su mayoría oxidada. La fase I (inflexión) corresponde a la reducción de Q_A . La fase D (declive) es indicativa de la oxidación de Q_A en la transferencia de electrones de Q_A a Q_B . El nivel de fluorescencia P corresponde a la reducción de PQ y su intensidad normalmente se denomina F_m (fluorescencia máxima). La fase S (Estado estacionario) de decaimiento de fluorescencia está relacionada con la re-oxidación de Q_A , la energización de la membrana tilacoide debida a translocación de protones (ΔpH) y a transición de estado 1 a 2. Las fases M (máxima) y T (terminal) corresponden a la disminución de qP e incremento de qN (ΔpH) y están relacionadas con la captación de CO_2 , velocidad de liberación de O_2 y la disponibilidad de $NADP^+$, ADP y fosfato.

ción del rendimiento cuántico efectivo de la fotoquímica del PSII (Φ_{PSII}) y la velocidad de transporte de electrones fotosintético (ETR). Los cambios en estos dos procesos

se completan en 15-20 minutos (variable entre las especies) en los que se alcanza un estado estacionario (1, 5).

Desde la descripción inicial de los procesos mencionados a la fecha, el co-

nocimiento de la relación entre reacciones primarias de la fotosíntesis y la fluorescencia de la clorofila *a* se ha incrementado notablemente gracias a los avances en la instrumentación

para medir la fluorescencia con tiempos de resolución altos (10 μ s) y a la capacidad de adquisición de datos misma que se ha mejorado en varios órdenes de magnitud.

Relación entre la emisión de fluorescencia registrada y los eventos fotoquímicos primarios

Cuando una muestra preacondicionada a la oscuridad es iluminada, la fluorescencia de la clorofila *a* se incrementa rápidamente. Este incremento es un reflejo de la reducción "cierre" de los centros de reacción del PSII y por lo tanto provee información de la actividad fotoquímica del PSII y la reducción "llenado" de la poza de plastoquinona. La cinética de la fluorescencia de la clorofila presenta cuatro inflexiones nombradas OJIP cuando se grafica el tiempo en logaritmo (Fig. 2):

(1) O, es el valor mínimo de la fluorescencia (F_0). Aparece alrededor de los 50 μ s y en ese momento todos los centros de reacción están oxidados "abiertos", $qP = 1$ y $qNP = 0$.

(2) J, se desarrolla a los 2 ms ($F_J = F_{2ms}$) y está relacionada con la reducción parcial de la Q_A .

(3) I, se desarrolla a los 20 ms ($F_I = F_{20ms}$) y está relacionada con la reducción parcial de Q_A y Q_B .

(4) P, es el valor máximo de la fluorescencia (F_m). El tiempo en el que se alcanza depende del protocolo experimental aunque en condiciones fisiológicas normales se alcanza en alrededor de 1s. En este momento todos los centros de reacción están reducidos "cerrados", $qP = 0$ y $qNP = 1$. P es el punto de fluorescencia máxima debido a que el flujo de electrones desde PQ a través del complejo b/f es el paso más lento de la cadena. Por otra parte, el tiempo para llegar desde las fases I (o J) a P no es más corto debido a que hay mucha más PQ que Q_A .

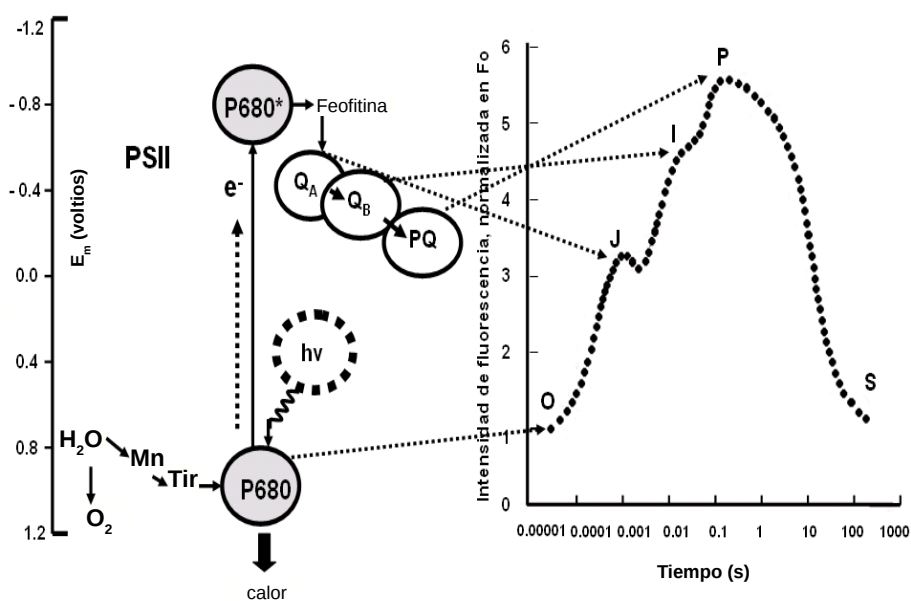


Figura 2. Cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II en la fase rápida y su relación con las reacciones en la cadena transportadora de electrones. O, es el valor mínimo de la fluorescencia (F_0). Aparece alrededor de los 50 μ s y en ese momento todos los centros de reacción están oxidados "abiertos". J, se desarrolla a los 2 ms ($F_J = F_{2ms}$) y está relacionada con la reducción parcial de la Q_A . I, se desarrolla a los 20 ms ($F_I = F_{20ms}$) y está relacionada con la reducción parcial de Q_A y Q_B . P, es el valor máximo de la fluorescencia (F_m). El tiempo en el que se alcanza depende del protocolo experimental. En este momento todos los centros de reacción están reducidos "cerrados".

La interpretación de estas señales experimentales con los cambios en los componentes moleculares de las reacciones se ha establecido sobre un modelo que supone que los complejos cosechadores de luz (LHC-PSII) donde se encuentran los pigmentos antena y los centros de reacción (RC-PSII) son sistemas individuales. El modelo permite un análisis simple del flujo de energía a través del PSII (2, 6). El flujo de energía puede ser entendido por varios parámetros: Flujo absorbido (flujo de fotones absorbido por pigmentos de la antena (ABS), flujo atrapado (flujo de energía transferida al centro de reacción que será convertida en energía redox reduciendo Q_A a Q_A^- (TR), flujo de transporte electrónico (al oxidarse Q_A^- se inicia el transporte de electrones que conduce a la fijación de CO_2)(ET) y el flujo de disipación de energía no atra-

pada como calor o transferida a otros sistemas no fluorescentes (DI) (Fig. 3). Como puede observarse en el modelo, la eficiencia cuántica máxima de la reacción fotoquímica primaria TRo/ABS = ϕ_{p_0} , la eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón mas allá de Q_A^- en la cadena transportadora de electrones ETo/TRo = ψ_0 , y la probabilidad de que un fotón absorbido mueva un electrón en la cadena transportadora de electrones ETo/ABS = ϕ_{E_0} están directamente relacionados a los tres flujos como cocientes de 2 de ellos. ϕ_{E_0} se deriva de la multiplicación de ϕ_{p_0} y ψ_0 . El producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria (ϕ_{p_0}) es también denominado como fase luminosa, debido a que su valor puede ser modificado por la intensidad lumínica. Por otro lado, la eficiencia con la que un excitón atrapado mueve un electrón

después de Q_A^- en la cadena transportadora de electrones (ψ_o), es denominada fase térmica, ya que ésta no es modificada por la intensidad lumínica, pero sí por la temperatura. Lo anterior ha sido de mucho valor, ya que en condiciones de estrés se puede definir de manera específica la fase que está afectando la condición a la cual ha sido expuesto el organismo (Fig. 5 y tabla anexa 5B).

El análisis cuantitativo de la cinética de la reacción de producción de la fluorescencia, llamada "prueba OJIP", puede usarse para explicar el flujo de energía a través del PSII como el flujo de energía por área de emisión (CS), y también por centro de reacción (RC). La relación entre los datos experimentales y la formulación planteada, estuvo basada en la consideración y los siguientes experimentos (2): en tiempo cero, (después de un periodo de oscuridad), todos los

centros de reacción están oxidados "abiertos", la velocidad de atrapamiento TRo/CR que conduce a la reducción de Q_A a Q_A^- , debe ser máxima; al bloquear la reoxidación de Q_A^- con DCMU 3-(3,4-Diclorofenil)-dimetilurea (inhibidor del paso de electrones de Q_A a Q_B), TRo/RC estará dada por la pendiente inicial normalizada (Mo_{DCMU}) de la curva de inducción de fluorescencia (entre 50 y 300 μ s) en la fluorescencia variable máxima $F_v = F_m - F_o$. Si no se bloquea la reoxidación de Q_A^- , el valor normalizado de la pendiente inicial, Mo , indica la velocidad neta de cierre de los centros de reacción RCs, donde el proceso de atrapamiento incrementa el número de centros reducidos y el transporte de electrones lo disminuye ($Mo = TRo/RC - ET_o/RC$). Mo en las muestras tratadas con DCMU puede simularse por la amplificación de Mo medida en muestras sin DCMU por

un factor recíproco a V_j ($V_j = (F_{2ms} - F_o)/(F_m - F_o)$) y entonces, $TRo/CR = Mo_{DCMU} = Mo/V_j$. A partir de estas ecuaciones se definieron otras que permiten el análisis cuantitativo de los flujos específicos en relación al área de emisión (utilizando los valores de F_o y F_m) o al centro de reacción (utilizando los valores de Mo y V_j y de las eficiencias cuánticas o relaciones de flujo) (Tabla 1).

Medición de la emisión de fluorescencia de la clorofila del fotosistema II

En la actualidad se utilizan principalmente 2 técnicas fluorométricas, una que mide la fluorescencia directa, inducida por excitación continua y otra, la fluorescencia modulada, inducida por excitación modulada. En el primer caso, la hoja se adapta previamente a la oscuridad por 10-30 minutos, posteriormente se expone a luz de 650 nm con una intensidad de alrededor de 3000 μ moles. $m^{-2}.s^{-1}$ durante 1-10 segundos y simultáneamente se miden y almacenan los valores de la fluorescencia emitida únicamente por la clorofila del PSII, desde los 10 μ s hasta los segundos programados. Así se obtiene la cinética de emisión de fluorescencia, y los valores de algunos parámetros como F_o , F_m , F_v , F_v/F_m (eficiencia fotoquímica del PSII) y t_{Fmax} (tiempo (ms) en el que se alcanza la fluorescencia máxima); a partir de los valores registrados, se calculan otros parámetros que expresan el funcionamiento de diversos componentes del PSII (2).

Para medir la fluorescencia modulada se utiliza un fluorómetro que consiste básicamente de 4 fuentes de luz cualitativa y cuantitativamente diferentes: a) luz roja modulada de baja intensidad (2 μ moles. $m^{-2}.s^{-1}$, 583 nm), b) pulsos de luz actínica de alta intensidad (5-20,000 μ moles. $m^{-2}.s^{-1}$), c) luz actínica blanca continua de 300-600 μ moles. $m^{-2}.s^{-1}$, d) luz rojo lejano

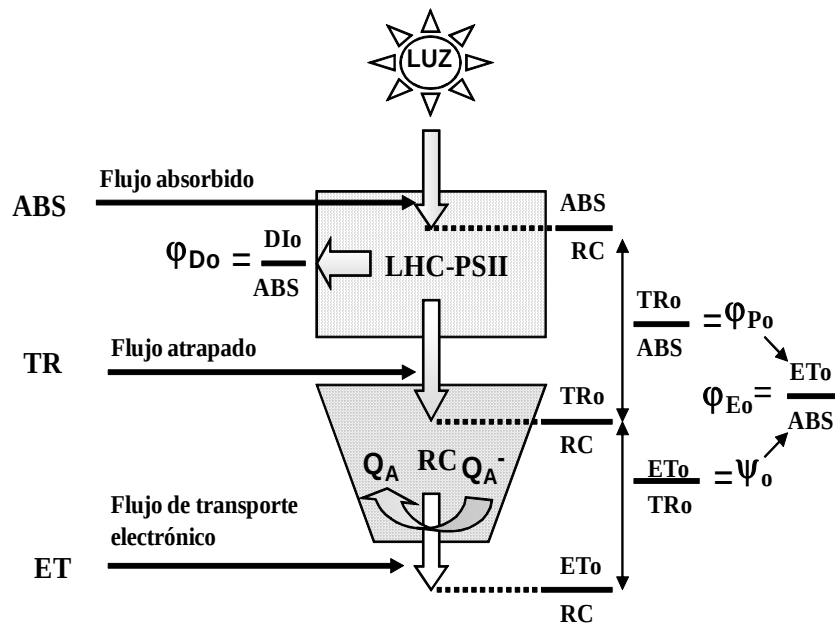


Figura 3. Modelo simplificado de los flujos de energía en el aparato fotosintético. ABS se refiere a el flujo de fotones absorbido por los pigmentos de la antena (Chl^*). Parte de esta energía de excitación se disipa como calor y en menor grado como emisión de fluorescencia y la otra parte es canalizada como flujo atrapado TR al centro de reacción y es convertido a energía redox reduciendo al aceptor de electrones Q_A a Q_A^- el cual se oxida creando transporte de electrones ET. La figura derecha ilustra la derivación de: rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria (Φ_{Po}), la eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón más allá de Q_A^- en la cadena transportadora de electrones (ψ_o) y la probabilidad de que un fotón absorbido mueva un electrón en la cadena transportadora de electrones (E_o); a partir de las relaciones de flujo de energía específicos.

TABLA 1
Formulación del análisis JIP usando los datos de la fase rápida de emisión de fluorescencia.

Parámetros Técnicos		
Fluorescencia a 50 μ s	Fo	
Fluorescencia máxima	Fm	
Fluorescencia variable a 2ms	Fv	= Fm-Fo
Pendiente desde el origen de la fluorescencia	Mo	= (F300 μ s-Fo)/(Fm-Fo)
Fluorescencia variable a 2ms	Vj	= (F2ms-Fo)/(Fm-Fo)
Flujos específicos expresados por centros de reacción (RC)		
Absorción por RC	ABS/RC	= (Mo/Vj)/(1-Fo/Fm)
Atrapamiento a tiempo 0 por RC	TRo/RC	= Mo/Vj = (ABS/RC) ϕ_{p0}
Disipación a tiempo 0 por RC	DIo/RC	= (ABS/RC) - (TRo/RC)
Transporte electrónico a tiempo 0 por RC	ETo/RC	= (TRo/RC) ψ_o
Flujos específicos expresados por área (cross section) (CS)		
Absorción por CS	ABS/CS	= Fo o Fm
Atrapamiento a tiempo 0 por CS	TRo/CS	= (TRo/ABS)/(ABS/CS)
Disipación a tiempo 0 por CS	DIo/CS	= (ABS/CS) - (TRo/CS)
Transporte electrónico a tiempo 0 por CS	ETo/CS	= (ETo/RC)(RC/ABS)
Densidad de RC por CS	RC/CS	= (ABS/CS)(RC/ABS)
Eficiencias cuánticas (o relaciones de flujo)		
Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria	ϕ_{p0}	= TRo/ABS = (Fm-Fo)/(Fm - (1-Fo/Fm) = Fv/Fm
Producto cuántico máximo de disminución de excitación fotoquímica	ϕ_{D0}	= DIo/ABS = 1- ϕ_{p0} = Fo/Fm
Eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón después de QA ⁻	ψ_o	= ETo/TRo = 1-Vj
Probabilidad de un excitón absorbido mueva un electrón después de QA ⁻	ϕ_{E0}	= $\phi_{p0} \cdot \psi_o$ = (TRo/ABS)/(ETo/TRo) = ETo/ABS = (1-Fo/Fm)(1-Vj)
Índices vitales		
Índice de funcionamiento	PI _{ABS}	= [RC/ABS][$\phi_{p0}/(1-\phi_{p0})$][$\psi_o/1-\psi_o$]
Fuerza impulsora de la fotosíntesis	DF _{ABS}	= Log [PI _{ABS}]

(μ moles. $m^{-2}.s^{-1}$, de 735 nm) y un detector de fluorescencia que registra solamente la fluorescencia emitida en la frecuencia y la fase de luz modulada. La hoja se expone a la luz modulada de baja intensidad para determinar Fo, luego se superpone un pulso de luz de alta intensidad para determinar Fm, y enseguida, también superpuesta a la luz modulada, se aplica luz actínica blanca continua durante algunos minutos para llevar al es-

tado estacionario; nuevamente, se aplica un pulso de luz saturante para determinar Fm' y al final se aplica luz rojo lejano para promover la reoxidación de plastoquinona y determinar Fo'. (Fig. 5D). A partir de estos parámetros se calculan los valores de rendimiento fotoquímico operacional del PSII (Φ_{PSII}), decaimiento fotoquímico (qP), decaimiento no fotoquímico (qNP) y transporte de electrones (ETR) (1, 5). Ambos mé-

todos pueden dar información no idéntica totalmente, pero tampoco contradictoria. En la actualidad los fluorómetros de mayor uso a nivel mundial son los de las marcas alemana (Walz) e inglesa (Hansatech). La figura 4 muestra 2 de los equipos Hansatech para la medición de fluorescencia directa o fluorescencia modulada en plantas y algas.

Información que se obtiene mediante el análisis de emisión de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II

De acuerdo al análisis de la fase rápida OJIP y las ecuaciones planteadas para la cuantificación del comportamiento del PSII (3, 5), se puede tener información sobre: a) los flujos de energía específicos para absorción (ABS), atrapamiento, (TRo), transporte de electrones (ETo) y disipación (DIo) por centro de reacción o por área activa de la hoja; b) eficiencia cuántica o relación de flujos como el rendimiento cuántico de la fotoquímica primaria (ϕ_{p0}), la eficiencia con la cual un excitón atrapado puede mover un electrón en la cadena transportadora de electrones mas allá de QA⁻ (ψ_o), y el rendimiento cuántico de transporte de electrones (ϕ_{E0}); c) la cantidad de centros de reacción activos por área de emisión; índice de funcionamiento (PI) el cual combina criterios estructurales y funcionales del PSII; d) el número de centros de reacción de reapertura muy lenta o centros de reacción que no unen Q_B; e) estimación del número de centros liberadores de oxígeno (OEC); f) el número de veces que Q_A se reduce desde el tiempo 0 *to* al tiempo en el que se alcanza al máximo de fluorescencia t_{Fmax} (N); g) la fracción promedio de centros de reacción abiertos durante el tiempo necesario para completar la reducción de todos los centros de reacción (Tabla 1). En cuanto al análisis de la fase lenta de



Fluorómetro de fluorescencia continua
Handy PEA Hansatech

Fluorómetro de fluorescencia modu-
lada FMS2 Hansatech

Figura 4. Fluorómetros Hansatech para el registro de fluorescencia directa o modulada en plantas y algas.

la cinética de inducción de fluorescencia (7) se puede obtener información importante en relación a los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos asociados con la conversión de energía en los cloroplastos. Varios parámetros de la fluorescencia de la clorofila *a* proporcionan información sobre el proceso de fotosíntesis en las plantas o algas bajo diferentes condiciones externas o internas. Los valores numéricos de los parámetros de fluorescencia reflejan la interacción de las plantas con su medio, el metabolismo de cloroplastos, los mecanismos regulatorios en la membrana tilacoide, y la transferencia de energía de excitación.

Medición de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* en algas

Para tener información de la actividad fotosintética de un alga a través de la medición de la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a*, es necesario el poder distinguir entre la li-

beración de la energía absorbida por procesos fotoquímicos (qP) y los No-fotoquímicos (qNP). La manera usual de hacerlo, es a través del "apagado" de una de las dos vías, de tal manera que se puede medir el producto de la otra. Generalmente se "apaga" la vía fotoquímica a través de la técnica de dos pulsos, la cual permite que momentáneamente la contribución de los procesos fotoquímicos sean igual a cero. Por medio de esta técnica se puede calcular el decaimiento fotoquímico (qP), el cual representa la proporción de la energía de excitación atrapada por los centros de reacción abiertos y que ha sido usada para el transporte electrónico.

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

Otro término relacionado con el anterior es el rendimiento fotoquímico operacional del PSII (Φ_{PSII}). Éste mide la proporción de energía absorbida que está siendo usada para impulsar

el proceso fotoquímico. De modo que, es una medida de la eficiencia del transporte electrónico lineal.

$$\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$$

El parámetro anterior puede ser usado para calcular la tasa de transporte electrónico (ETR).

$$ETR = ((F_m' - F_s) / F_m') \times 0.84 \times 0.5 \times PAR \text{ (m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{)}$$

Donde el valor de 0.84 en la fórmula, equivale a la proporción de luz que es absorbida por el alga y el de 0.5 a la proporción de luz que es transferida al sistema a cada uno de los fotosistemas (PSII y PSI) y la radiación fotosintéticamente activa (PAR) utilizada en $\mu\text{moles.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (1)

Por otro lado, el decaimiento no fotoquímico (qNP o NPQ) representa la proporción de energía disipada térmicamente y puede ser calculado de dos maneras:

$$qNP = F_m - F_m' / F_m - F_o'$$

$$NPQ = F_m - F_m' / F_m'$$

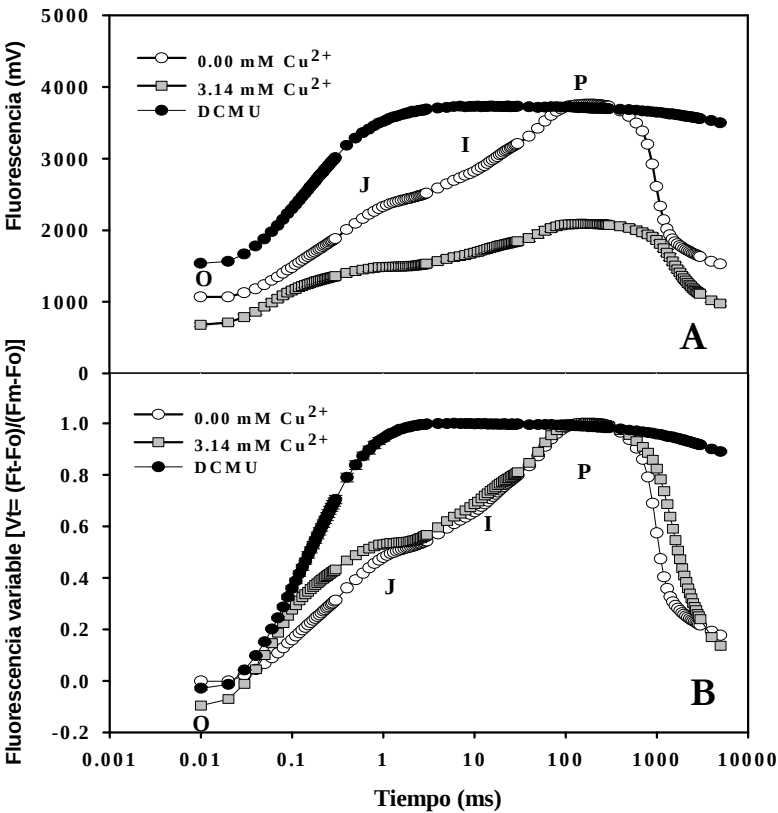
El término qNP o NPQ refleja la influencia de procesos no fotoquímicos en la emisión de fluorescencia de la clorofila durante la transición de una muestra del estado adaptado a la oscuridad al estado adaptado a la luz, como cambios en el gradiente de pH transtilacoidal, inactivación de centros de reacción (fotoinhibición) y cambios conformacionales dentro de los complejos de pigmentos en la membrana tilacoide, desconexión de complejos cosechadores de luz móviles del PSII y formación de zeaxantina. El parámetro más usado en la emisión de la fluorescencia es el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria cuando todos los centros de reacción del PSII están oxidados o "abiertos" (F_v/F_m) (9).

$$Fv/Fm = (Fm-Fo/Fm)$$

Es importante señalar que mientras Φ_{PSII} está relacionado con la eficiencia cuántica alcanzada por el PSII, qP y Fv/Fm proveen información sobre los procesos que pueden modificar esta eficiencia. Por lo tanto, una disminución en qP está dada por la reducción o "cierre" de los centros de reacción, como resultado de una saturación lumínica o de una inhibición del transporte electrónico. Por otro, lado una disminución en Fv/Fm está dada por un aumento en qNP (1).

Aplicaciones del análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila a

Por el análisis de la cinética de emisión de fluorescencia directa y los parámetros registrados y calculados, podemos saber si determinado factor de estrés tiene efecto en los eventos fotoquímicos del PSII o en eventos no dependientes de luz. Cuando los eventos fotoquímicos son los afectados por un factor de estrés de manera directa o indirecta, podemos conocer si la alteración se produjo en alguno de los siguientes componentes o reacciones: a) el complejo antena (LHC), por ejemplo, reduciéndose la captación de energía o incrementándose la disipación de la energía captada; b) la transferencia de energía de la antena al centro de reacción (RC), la cual podría ser reducida o disipada al momento de transferirse por desconexión con el centro de reacción; c) el centro de reacción, que no "atrape" la energía transferida y ésta sea disipada; d) la velocidad de reducción de Q_A o alteración de los niveles de Q_A , la velocidad de reducción de Q_B o la alteración de los niveles de Q_B ; e) el bloqueo de la transferencia de electrones entre Q_A y Q_B ; f) disminución de la velocidad de reducción de PQ; g) el complejo liberador de oxígeno, disminuyendo su actividad y como con-



	Control	DCMU	Cu ²⁺
Producto cuántico			
Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria (ϕ_{po})	0.710	0.495	0.616
Eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón después de Q_A (ψ_o)	0.521	0.042	0.517
Probabilidad de que un fotón absorbido mueva un electrón después de Q_A^- (ϕ_{Eo})	0.369	0.020	0.318

Figura 5. (A) Efecto del DCMU [3-(3,4-Diclorofenil)-dimetilurea] y del cobre (Cu^{2+}) en la emisión de la fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II y (B) los rendimientos cuánticos operacionales de *Scenedesmus incrustatus*. Los datos mostrados fueron obtenidos en el laboratorio para ilustrar este caso.

secuencia limitando el aporte de electrones al centro de reacción del PSII. Por el análisis de la fluorescencia modulada podemos conocer si determinado factor ambiental tuvo efectos en la fotoquímica del PSII y en la disipación no fotoquímica, como calor y el gradiente de pH. Estas técnicas tienen aplicación en las prueba de pro-

ductividad agrícola en función de tratamientos con fertilizantes, hormonas, pesticidas y herbicidas; en ensayos de selección de cultivos tolerantes a diferentes factores de estrés (incluyendo cultivos transgénicos); en experimentación sobre respuesta a cambios de intensidad y calidad de luz, temperatura etc., y a la combinación de

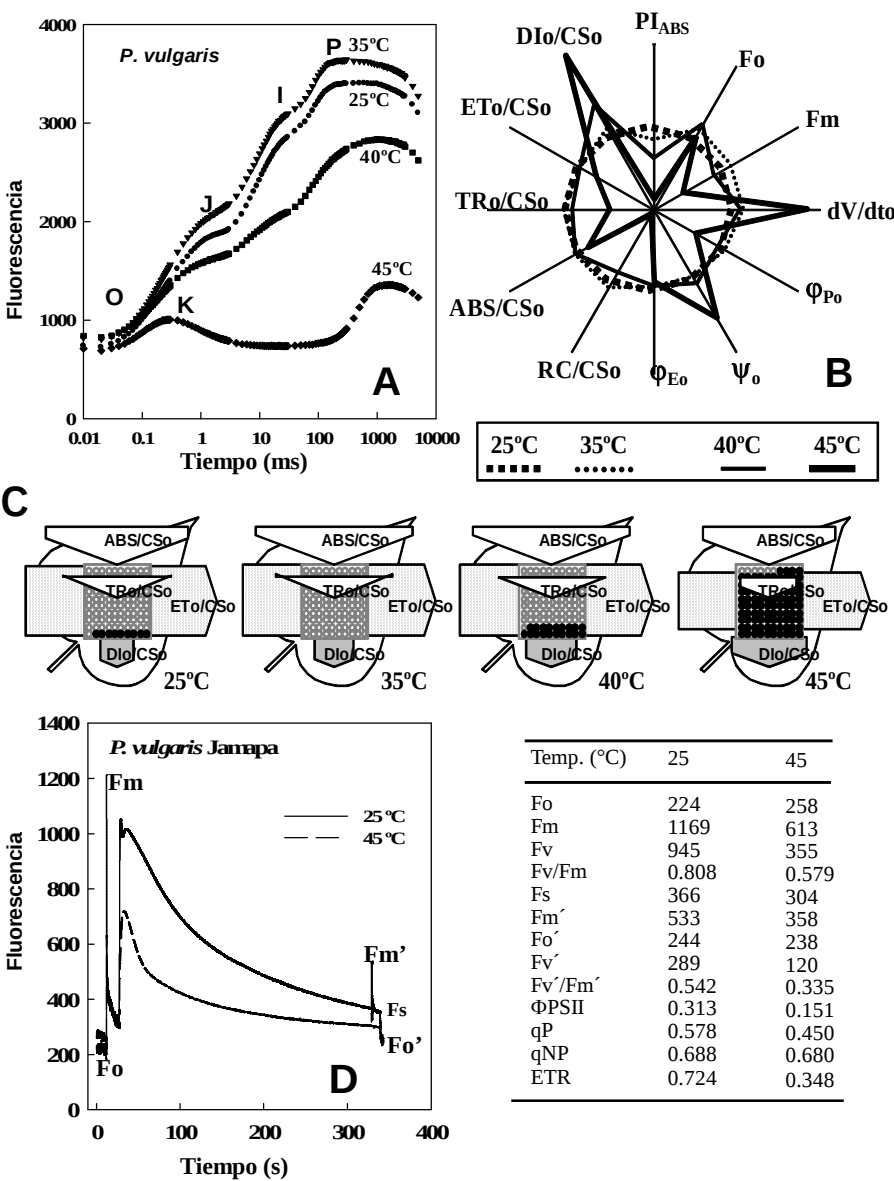


Figura 6. (A) Efecto de la temperatura en la cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del PSII de plantas de *P. vulgaris* (obtenida con el fluorómetro Handy PEA, Hansatech); (B) "Gráfica de araña" que muestra los efectos de la temperatura en las actividades aparentes ABS/CS, TR_o/CS, ET_o/CS, DI_o/CS; eficiencias cuánticas Φ_{Po} , Ψ_o , Φ_{Eo} e índice de vitalidad PI_{ABS} en plantas de *P. vulgaris*. Los datos presentados fueron calculados usando las ecuaciones indicadas en la tabla 1 y los valores de fluorescencia registrados con el fluorómetro Handy PEA, mediante el programa "Biolyzer", diseñado específicamente para éste propósito por el grupo de Strasser en la Universidad de Ginebra). Los valores fueron normalizados sobre el control (25°C). (C) Modelo de hoja obtenido con el programa Biolyzer, que ilustra los efectos de la temperatura en los flujos de energía (por área de absorción de la hoja, (CS)) del PSII de *P. vulgaris*. Las flechas indican los flujos de absorción de luz (ABS), energía de excitación atrapada (TR_o), energía de disipación (DI_o), y transporte de electrones (ET_o) mas allá de Q_A⁻. El ancho de cada flecha representa la intensidad de flujo de energía respectivo. Cada círculo blanco indica centro de reacción activo y cada círculo negro representa centro de reacción inactivo. (D) Efecto de la temperatura en la actividad del fotosistema II de *P. vulgaris* medida por emisión de fluorescencia modulada. (Los registros se obtuvieron utilizando un medidor de fluorescencia modulada FMS2, Hansatech). Todos los datos presentados fueron obtenidos por los autores para ilustrar este caso específico.

factores de estreses físicos y químicos; en la optimización del establecimiento de condiciones de luz, temperatura, humedad en invernaderos, así como en los estudios de productos comercializados como flores y frutos en relación a condiciones de almacenamiento y factores que retardan o aceleran la maduración o senescencia. Las mencionadas técnicas del estudio de la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* también tienen aplicación en el estudio de la conducta de ecosistemas ante cambios globales, en la ecodinámica de sistemas hortícolas y forestales y en la utilización de algas y plantas como biorremediadores de aguas y suelos contaminados con metales pesados.

Algunos ejemplos de la utilización del análisis JIP en el estudio de los efectos de varios tipos de estrés en la fotosíntesis de plantas y microalgas se presentan en las figuras 5-6

La figura 5A muestra el efecto del DCMU y del cobre (Cu²⁺) en la cinética de emisión de fluorescencia del alga verde *Scenedesmus incrassatulus*. El DCMU es un conocido herbicida cuyo efecto es bloquear el flujo de electrones entre Q_A y Q_B, lo que se puede evidenciar en la gráfica como un incremento rápido de la fluorescencia hasta alcanzar un valor máximo (F_m) en la fase J, la cual está relacionada con la reducción de Q_A⁻. Por otro lado, se puede observar en la misma figura que la exposición durante 168 h a 3.14 µM de Cu²⁺ disminuye los valores de fluorescencia máxima y mínima. La figura 5B muestra los valores de fluorescencia graficados como fluorescencia relativa en el tiempo [V_t = (F_t-F_o)/(F_m-F_o)]. Esta expresión experimental permite visualizar de manera dinámica la reducción de Q_A → Q_A⁻. Se puede observar en esta figura que la incubación con DCMU o Cu²⁺ incrementa la velocidad inicial de la fluorescencia (M_o), lo que se explica

como un incremento en la velocidad de reducción de los centros de reacción del PSII. Esto se explica debido a que en caso de la inhibición completa del PSII con DCMU, los centros de reacción son reducidos con la entrada de un sólo electrón. El efecto del cobre podría ser similar, es decir inhibiendo el paso de electrones entre Q_A y Q_B , sin embargo, es posible que algunos centros de reacción no puedan llevar a cabo la separación de cargas, lo cual aumentaría la velocidad del cierre de total de los centros de reacción. Por otro lado, el valor de fluorescencia después de la fase "J" es el máximo para el caso de la incubación con DCMU, sin embargo, comparado con el control, la exposición a cobre no modifica la dinámica de reducción de Q_A entre las fases de J a P. Cuando se analiza la cinética de la figura 4A y la tabla anexa (4B) con base en el modelo de la prueba OJIP para obtener los productos o eficiencias cuánticas, se puede observar que la eficiencia con la cual se mueven los electrones a través del PSII (ϕ_{E0}) disminuye en un 94% y 14% por efecto del DCMU y Cu^{2+} respectivamente comparado con el control. Esta disminución, en caso del DCMU, se debe principalmente a la disminución del flujo de electrones después de Q_A (ψ_o), fase térmica y en menor proporción a la fase lumínica (ϕ_{p0}). Por otro lado, en el caso del Cu^{2+} a concentraciones no letales para este organismo (0.2 ppm), el efecto aparentemente está más relacionado con la salida de electrones del centro de reacción del PSII, es decir a la fase lumínica (ϕ_{p0}), ya que el movimiento de electrones después de Q_A (ψ_o),

prácticamente no es afectado.

La figura 6 muestra los efectos de la temperatura en la cinética de emisión de fluorescencia y en algunos parámetros de fluorescencia de plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) obtenidos por la medición de fluorescencia directa y fluorescencia modulada respectivamente. En la figura 6A se observa que el incremento de la temperatura hasta 40°C disminuye gradualmente la intensidad de fluorescencia mientras que a 45 °C se produce una disminución abrupta y la cinética de emisión de fluorescencia muestra una fase (K) entre Fo y J (alrededor de los 300 μ s), lo que refleja una limitación de la donación de electrones por el complejo liberador de oxígeno y cambios en la arquitectura de la antena del PSII con la consecuente alteración de la distribución de energía. Después del incremento rápido inicial de fluorescencia debido a la reducción de Q_A , la reoxidación de Q_A^- continúa, transfiriéndose los electrones a Q_B , pero debido a la carencia de electrones procedentes del complejo liberador de oxígeno, la intensidad de la fluorescencia decrece formándose el pico K. La figura 6B muestra el efecto de la temperatura en diversos parámetros de fluorescencia entre los cuales destacan el fuerte decremento en el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica del PSII (ϕ_{p0}), y el índice de funcionamiento PI_{ABS} . La figura 6C muestra el efecto de la temperatura en los flujos de energía por área de emisión, en hojas de frijol común, visualizado en un modelo de hoja en donde la magnitud del cambio está ajustada al ancho de la flecha corres-

pondiente y los centros de reacción activos están indicados por círculos claros y los inactivos por círculos oscuros. Se observan: a) disminución en el transporte de electrones debido a la inactivación de los centros de reacción (causado por una inactivación del complejo liberador de oxígeno); b) disminución en la densidad de los centros de reacción activos; c) incremento en la disipación de energía por área de emisión y d) disminución en la energía absorbida por área de emisión. La figura 6D ilustra el efecto de la temperatura alta en el fotosistema II, registrado mediante la medición de fluorescencia modulada. Destaca la disminución en los valores del rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria (Fv/Fm), en el rendimiento fotoquímico operacional del PSII (Φ_{PSII}), en el decaimiento fotoquímico de la fluorescencia (qP) y en la tasa de transporte electrónico (ETR). Estos resultados son congruentes con los observados por el análisis basado en la medición directa de fluorescencia.

En resumen, ya que la fotosíntesis es una función esencial en los organismos fotoautotróficos, resulta evidente que la evaluación de su funcionamiento es de la mayor importancia en un gran número de situaciones de interés práctico. La determinación cuantitativa de la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a*, su análisis y la obtención de los parámetros correspondientes, constituyen una forma precisa, confiable y rápida, de obtener información molecular que tiene una expresión fisiológica y que puede tener múltiples aplicaciones prácticas.

REFERENCIAS

1. Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence. A practical guide. *J Exp Bot* 51: 659-668.
2. Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. En: *Probing Photosynthesis, Mechanism, Regulation, Adaptation*. Editores: Yunus M, Pathre U, Mohanty P. Taylor & Francis. pp 445-483.
3. Brack W, Frank H (1998) Chlorophyll *a* fluorescence: A tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus. *Ecotoxicol Environ Saf.* 40:34-41.
4. Appenroth KJ, Stöckel J, Srivastava A, Strasser RJ (2001) Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll *a* fluorescence measurements. *Environ Pollut* 115:49-64.
5. Bolhàr-Nordenkampf HR, Öquist G (1993) Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: *Photosynthesis and Production in a Changing Environment: A field and Laboratory Manual*. Editores: Hall DO, Scurlock JMO, Bolhàr-Nordenkampf HR, Leegood RC, Long SP. Chapman & Hall pp 193-206
6. Strasser BJ, Strasser RJ (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: En *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Vol 5: Editor: Mathis P Kluwer Academic pp 977-980.
7. Roháček K, Barták M (1999) Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* 37:339-363.
8. Müller P, Li Xiao-Ping, Niyogi, KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125:1558-1566.
9. Krause GH, Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:313-349.