



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de ingeniería

Doctorado en Ingeniería

"Desarrollo de un sistema no invasivo de medición de fotosíntesis en *Capsicum annum* L."

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

"Doctor en Ingeniería"

Presenta:

M.I. Alejandro Espinosa Calderón

Dirigido por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Presidente

Dr. Irineo Torres Pacheco

Secretario

Dr. José Alfredo Padilla Medina

Vocal

Dr. Roque Alfredo Osornio Ríos

Suplente

Dra. Rosario Guzmán Cruz

Suplente

Dr. Aurelio Domínguez González

Director de la Facultad

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco

Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

La fotosíntesis es un importante proceso fisiológico realizado, principalmente, por las plantas. A través de este proceso las plantas transforman la energía luminosa en energía química con el fin de generar materia orgánica (carbohidratos o glucosas) que utilizan como sus propios nutrientes, y oxígeno (O₂) como residuo.

Los métodos de medición de fotosíntesis que existen actualmente son invasivos, de laboratorio o incluso destructivos. El lograr desarrollar un método no invasivo de medición de fotosíntesis no alteraría o sometería a estrés a la planta, por lo que ésta trabajaría de forma ordinaria. Un método con estas características no solamente sería innovador, sino que también sería sumamente útil para la automatización de los invernaderos y la investigación biológica *in situ*.

Las principales variables involucradas en la fotosíntesis son: Luz, CO₂, O₂ y la Temperatura generada por la planta. Esta temperatura se refiere a la originada por la hoja durante la conversión de energía lumínica en química. Estas variables pueden medirse por principios ópticos. El utilizar principios ópticos de medición permite evitar el contacto físico con la planta, es decir, constituyen una forma no intrusiva de medición.

Dentro de los diferentes tipos de plantas, dependiendo de la forma en que realizan la fotosíntesis, existen las C₃, C₄ y CAM (del acrónimo en inglés *Crassulacean Acid Metabolism*). Siendo las tipo C₃ las más comunes. El *Capsicum annuum* L., planta tipo C₃, es la variedad de Chile más importante en el mundo. Esta variedad tiene diversas aplicaciones gastronómicas, químicas, farmacéuticas, militares, etc.

Este trabajo presenta una metodología de medición que correlaciona la temperatura foliar en plantas *Capsicum annuum* L., la temperatura ambiente, la humedad relativa y la radiación incidente con su fotosíntesis. Esta metodología está basada en un modelo matemático original. Se plantea, a su vez, la implementación de este modelo en un Fiel Programmable Gate Array (FPGAs).

La metodología propuesta representa una nueva forma para inferir fotosíntesis. Además, el modelo desarrollado es susceptible de ser enriquecido, en el futuro, al aumentarle otras variables, como por ejemplo humedad del suelo. Este modelo podrá ser integrado a modelos fisiológicos para el control y fitomonitorio en invernaderos, así como para el desarrollo de dispositivos electrónicos no invasivos para la medición de este importante proceso fisiológico.

Palabras clave: instrumentación electrónica, biosistemas, algoritmos genéticos, Fiel Programmable Gate Array (FPGAs), opto-electrónica, temperatura por infrarrojo.

ABSTRACT

Photosynthesis is a very important physiological process made, principally, by plants. Through this process, plants transform luminous energy into chemical energy, with the purpose of generating biomass (carbohydrates and glucoses) used as their own nutrients, and oxygen (O₂) as residuum.

The photosynthesis measurement methods that already exist are invasive, exclusively of laboratory, or even destructive. A non invasive method for measuring photosynthesis would not alter or stress the plant, thus it would work in an ordinary way. A method with such characteristics would be innovative, but also useful for the automation of greenhouses and biological research *in situ*.

The principal variables involved with photosynthesis are: light, CO₂, O₂, and the temperature generated by the plant during the conversion of luminous energy into chemical energy. Such variables are measurable through optical principles. Optics avoids physical contact with the plant, constituting a non invasive way of measuring.

Among the different kind of plants, depending on the way they make photosynthesis, there are the C₃, C₄ and CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*). Among these, the C₃ are the most common. *Capsicum annuum* L., a C₃ plant, is the most important variety of chili in the world. This variety has different gastronomical, chemical, pharmaceutical, and military applications.

This document shows a measuring methodology which correlates leaf temperature of *Capsicum annuum* L. plants, air temperature, relative humidity, and incident radiation with photosynthesis. Such methodology is based on an original mathematical model. It is also proposed the implementation of such model in a Field Programmable Gate Array (FPGA).

The proposed methodology is a new for inferring photosynthesis. Furthermore, the presented model is susceptible to be enriched in the future by adding other related variables, for example soil humidity. This model might be used in physiological models for controlling and phytomonitoring of greenhouses. Another possible use of the model is the developing of non invasive electronic instruments for measuring this important physiological process.

Keywords: electronic instrumentation, biosystems, genetic algorithms, Field Programmable Gate Array (FPGAs), opto-electronics, infrared temperature.

“En la sociedad humana, todo el mundo tiene que trabajar para mantener su existencia, ya sea un obrero, comerciante, administrador o agricultor, o incluso si uno pertenece a la clase más alta y es un hombre de letras, un científico o un teólogo. Por lo tanto, el señor le dice a Arjuna que no tiene que abandonar su ocupación, pero que, mientras esté dedicado a ella, debe recordar a Krsna (mâm anusmara).” A.C. Bhaktivendanta Swami Prabhupâda, *El Bhagavad-Gitâ, tal como es*. Edit. The Bhactivedanta Book Trust, 2000.

“Los hechos que registra nuestro conocimiento están ya interpretados de alguna forma y son, por lo tanto, esencialmente teóricos. Siendo esto así, la historia de la ciencia será tan compleja, caótica y llena de errores como las ideas que contiene, y a su vez estas ideas serán tan complejas caóticas, llenas de errores y divertidas como las mentes que las han inventado.” Paul Feyerabend, *Contra el método*, 1970.

“La luz no es causa, es efecto.” Rodolfo Benavides, *Levantando la cortina*, 1971.

A Dios, por ser.

A A. por no callar.

A Ana, por amar.

A Demián, por llegar.

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre, por siempre apoyar. A mi Padre, por aún estar. A Paco, por ser ejemplo a seguir. A Ana Rocío, por enseñar.

A los investigadores Dr. Ramón Gerardo Guevara González (UAQ) y Dr. José Alfredo Padilla Medina (ITC), por sus valiosos consejos, y su incondicional apoyo y guía. Por no solamente ser profesionales, sino también humanos.

Al Dr. Irineo Torres Pacheco (UAQ), por su liderazgo manifiesto en el grupo de biosistemas.

A la Dra. Rosario Guzmán Cruz (UAQ), por su importante asesoría en el área de modelado matemático.

A la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), por permitirme estudiar en ella para lograr este título. Gracias también por instruirme no solamente en aspectos técnicos, sino también administrativos del área de investigación.

A todos los compañeros, profesores y alumnos del Cuerpo Académico de Ingeniería en Biosistemas (CAIB-UAQ), por su constante apoyo técnico y moral en todo este proceso de investigación.

A los investigadores Dra. Beatriz Xoconostle Cazares, Dr. Roberto Ruiz Medrano y QBP Lidia Gómez Silva, todos del Dpto. de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), unidad Zacatenco, México, D.F. Gracias por prestar sus instalaciones e instrumentos de laboratorio para la experimentación de este proyecto.

Al Dr. Mario González Chavira, por permitirnos utilizar las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en experimentos relacionados a este proyecto.

Al Instituto Tecnológico de Celaya (ITC) por apoyarnos, a través del Dr. José Alfredo Padilla Medina, en diversos aspectos para la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado a través de la Beca 239421.

Al Fondo de Investigación de la Facultad de Ingeniería de la UAQ (FIFI-UAQ), por el financiamiento FIN201116, el cual fue muy útil para la realización de este proyecto.

A la Optical Society of America (OSA), por los apoyos económicos y la proyección a eventos internacionales que sirvieron de escenario para presentaciones de mi trabajo de tesis.

A todos mis amigos, que por suerte son muchos como para enumerarlos, disculpen por no hacerlo. Por recordarme que “No sólo de ciencia vive el hombre”.

INDICE DE CONTENIDO

Tema	Página
Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	vii
Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Justificación	2
1.2 Planteamiento del problema	4
1.3 Hipótesis y Objetivos	5
Capítulos 2: Revisión de literatura	6
2.1 Métodos generales de fotosíntesis	6
2.2 Métodos de medición de fotosíntesis relacionados con técnicas ópticas	9
Capítulo 3: Materiales y metodología	16
3.1 Marco teórico	16
3.2 Materiales	17
3.3 Metodología	24
Capítulo 4: Resultados y discusión	31
4.1 Análisis de alcances comerciales de sensores	31
4.2 Analizadores de espectro	31
4.3 Termografía óptica	36
4.4 Analizador de gases	37

4.5 Expresión de rubisco	43
4.6 Generación de Modelo Matemático	44
4.7 Programación de drivers de sensores	50
4.8 Implementación del algoritmo matemático	55
Capítulo 5: Conclusiones	57
5.1 Trabajo a futuro	59
Bibliografía	60

INDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
4.1	Valores calibrados de los parámetros del modelo de fotosíntesis	47
4.2	Variables a medir y sensores propuestos a utilizar	50

INDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
3.1	Conexión típica del sensor SHT71	21
3.2	Trama de comunicación del sensor SHT71	21
3.3	Bloque funcional del Convertidor Programable de Luz a Frecuencia TSL230RD, TAOS	22
3.4	Vista superior del integrado TSL230RD	22
3.5	Salida de Frecuencia Vs Irradiancia del TSL230RD	22
3.6	Diagrama a bloques interno del Sensor Termopila Infrarrojo TMP006, Texas Instruments.	23
3.7	Estructura interna del Sensor Termopila Infrarrojo TMP006, Texas Instruments	23
3.8	Protocolo de comunicación del Sensor Termopila Infrarrojo TMP006, Texas Instruments	24
3.9	Formas de construcción de un modelo matemático	28
4.1	Espectro de absorción de plantas C3 (frijol y rábano), C4 (Maíz) y CAM (Nopal)	33

	generado por Analizador Perkin Elmer Instruments, LAMBDA 900, UV/Vis/NIR Spectrometer	
4.2	Espectro de absorción del agua, generado por Analizador Perkin Elmer Instruments, LAMBDA 900, UV/Vis/NIR Spectrometer	34
	Espectro de absorción del agua, generado por Analizador Perkin Elmer Instruments, LAMBDA 900, UV/Vis/NIR Spectrometer	
4.3	Espectro IR de absorción de plantas C3 (Chile), C4 (Maíz) con muestras limpiadas con pañuelo húmedo. Espectro generado por Analizador Perkin Elmer, Spectrum BX, FTIR System	34
4.4	Espectro IR de absorción de plantas C3 (Chile), C4 (Maíz) y CAM (Nopal) con muestras NO limpiadas con pañuelo húmedo. Espectro generado por Analizador Perkin Elmer, Spectrum BX, FTIR System	35
4.5	Espectro NIR y MIR de absorción de plantas C3 (Chile), C4 (Maíz) y CAM (Nopal). Espectro generado por Analizador Perkin Elmer, Spectrum BX, FTIR System	36
4.6	Comportamiento térmico dinámico de las plantas C3 de luz hacia oscuridad	36
4.7	Comportamiento térmico dinámico de las plantas C3 de oscuridad hacia luz	36
4.8	Estabilización de Fotosíntesis	37
4.9	Incrementos de Radiación	38
4.10	Recta de conversión PAR a Lux	38
4.11	Curvas de luz a diferentes niveles de temperatura	39
4.12	Diferencias entre temperatura de aire y de hoja a diferentes temperaturas del ambiente	41

4.13	Curva de luz sin hoja	42
4.14	Diferencias entre la temperatura de aire y sensor de hoja, pero sin hoja	43
4.15	Diferencias entre la temperatura del aire y la de la hoja de una planta con herbicida	43
4.16	Masa de rubisco expresada en <i>Capsicum annuum</i> L. a dos temperaturas de aire	44
4.17	Diagrama de flujo de los algoritmos genéticos	45
4.18	Comparación de Modelos propuestos contra mediciones	47
4.19	Comparación de método determinista (línea punteada) contra valores medidos (línea continua)	49
4.20	Entradas y salidas generales de un módulo de comunicación I2C	51
4.21	Simulación del protocolo I2C	53
4.22	Tarjeta para termopila	54
4.23	Entradas y salidas generales de un módulo de frecuencímetro	54
4.24	4.24 Simulación del frecuencímetro	55
4.25	Diagrama a bloques sugerido para el módulo del algoritmo de caja negra	56

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN

Las plantas son el primer eslabón en la cadena trófica. Ellas son denominadas organismos autótrofos, puesto que son capaces de producir sus propios alimentos. Las plantas realizan dicha producción por el proceso denominado fotosíntesis.

En la fotosíntesis, la planta usa energía solar para oxidar agua, de donde libera oxígeno, y para reducir dióxido de carbono, de donde forma azúcares y otros compuestos de carbón (Taiz y Zeiger, 2010). Para llevar a cabo este proceso las plantas requieren Luz, Dióxido de Carbono (CO₂), Agua y Minerales. Según diversos autores (Nobel, 1991; Long y Hallgren, 1987; Bidwell, 1990) la fotosíntesis se refiere, entonces, a la transformación de la energía luminosa en energía química, ésta última corresponde a la fijación de CO₂ atmosférico, el cual se transformará en materia orgánica, como carbohidratos o glucosas que utilizan como sus propios nutrientes, y en O₂ como residuo.

El proceso de fotosíntesis consiste principalmente en dos fases. La fase luminosa es la primera parte de la fotosíntesis y corresponde a la absorción de la energía lumínica por parte de los cloroplastos, esta fase es básicamente equivalente para todas las plantas. La fase oscura corresponde a la fijación del CO₂ atmosférico para transformarlo en carbohidratos y O₂. La segunda etapa utiliza la energía lumínica captada durante la fase luminosa. Dependiendo de la forma en que las plantas realizan la fase oscura, pueden dividirse en 3 tipos: C₃, C₄ y CAM (del acrónimo en inglés *Crassulacean Acid Metabolism*).

Para la fijación del CO₂, todas las plantas realizan el llamado Ciclo Calvin, el cual consta de 3 procesos principales: Carboxilación, Reducción y Regeneración. La diferencia principal entre los tipos de plantas mencionados anteriormente es que, durante la carboxilación, las C₃ sintetizan el CO₂ en compuestos de 3 carbonos, mientras que las C₄ lo hacen en compuestos de 4 carbonos. Por otra parte, las CAM tienen la característica de que la recepción y fijación del CO₂ se llevan a cabo durante la noche, mientras que la decarboxilación y refijación del CO₂ liberado internamente ocurren durante el día (Taiz y Zeiger, 2010). De los tres tipos de plantas según su

fotosíntesis, las C_3 son las más comunes en la naturaleza (West-Eberhard *et al.*, 2011). Ejemplos de plantas C_3 son jitomate, pepino y acelga; de C_4 , caña de azúcar, maíz y sorgo; y de CAM, los diferentes cactus.

La evolución de las sociedades sedentarias ha implicado un crecimiento y perfeccionamiento de las técnicas relacionadas con la agricultura, esto hizo que surgiera la agronomía, ciencia encargada del estudio de la agricultura. Con el paso del tiempo se han ido perfeccionando y aportando diversas técnicas agrícolas. Debido al aumento exponencial en la población, cada vez se requieren mayores volúmenes de producción de alimentos en las sociedades (Torres-Lopes, 2012), por lo tanto, la medición del impacto del medio ambiente en la fotosíntesis es de interés para la agronomía ya que se relaciona con la productividad de la planta, y también con la de los cultivos que dependen fuertemente de los rangos fotosintéticos en el entorno (Taiz y Zeiger, 2010). De forma paralela, el estudio sobre la forma en que responde fotosintéticamente la planta a factores climáticos, como la temperatura, la luz o el CO_2 , es de gran interés para ciencias como la fisiología, la botánica y la biología en general.

La producción en las plantas depende del nivel de nutrientes con que se les cultive y la capacidad de éstas de procesarlos a través de la fotosíntesis. De igual manera, cualquier factor ambiental que afecte el crecimiento y desarrollo de los cultivos incidirá en la productividad de los mismos y por ende en su rendimiento (Scurlock *et al.*, 1987).

1.1 Justificación

La medición del impacto del medio ambiente en la fotosíntesis es de interés para la agronomía debido a que la productividad de la planta, y por consiguiente la productividad de los cultivos, depende fuertemente de los rangos fotosintéticos en el entorno. De forma paralela, el estudio sobre la forma en que responde fotosintéticamente la planta a factores climáticos como la temperatura, la luz o el CO_2 es de gran interés para ciencias como la fisiología, la botánica y la biología en general.

Para toda medición es necesario interactuar con el sujeto y tomar una parte de la energía involucrada en el proceso a medir. Al hacer esto se está interfiriendo con dicho sujeto, modificándolo y alterándolo en cierto porcentaje. Ya existen diferentes métodos para la medición de fotosíntesis (Millán-Almaraz *et al.*, 2009; Espinosa-Calderon *et al.*, 2011) son intrusivos, de

laboratorio, o incluso destructivos. Los métodos no intrusivos no alteran o someten a estrés a la planta, por lo que ésta trabajará de forma ordinaria. El lograr desarrollar un método no intrusivo de medición de fotosíntesis de alta resolución no solamente sería innovador, sino que también sería sumamente útil para la automatización de los invernaderos y la investigación biológica en campo.

Taiz y Zeiger (2010) comentan que las principales variables involucradas en la fotosíntesis son: Luz, CO₂, O₂ y la temperatura generada. Esta temperatura se refiere a la originada por la hoja durante la conversión de energía lumínica en química. Si se pudiesen medir estas variables de una forma no intrusiva se permitiría a la planta trabajar libremente, y así los resultados de la medición de fotosíntesis serían más confiables. Si se correlacionasen las mediciones de las variables antes mencionadas, se podría obtener una estimación general de la fotosíntesis total. Incluso, como reporta Hunt (2003) se podría llegar a omitir la medición de O₂ en el ambiente, puesto que esto implica el uso de sensores con muy alta precisión, lo cual encarecería al sistema.

En general, todas las variables principales, según Taiz y Zeiger (2010), involucradas en la fotosíntesis pueden medirse por principios ópticos. El utilizar variables ópticas permite evitar el contacto físico con la planta, es decir, constituyen una forma no intrusiva de medición (Espinosa-Calderon *et al.*, 2011).

Todas las tecnologías de medición mencionadas por Millán-Almaraz *et al.* (2009) y Espinosa-Calderon *et al.* (2011) son extranjeras. México, al no contar con tecnología de medición de fotosíntesis propia, debe de abastecerse con equipos e instrumentos importados desde diversos países, generando así una dependencia tecnológica que requiere el desarrollo de un sistema de bajo costo y capacidades superiores a los sistemas comerciales, que cubra las nuevas necesidades de investigación, desarrollo y producción de su campo eficientemente. Existe también una fuerte necesidad de tecnificación para el campo mexicano que permita competir con los productos básicos producidos en otros países que cuentan directamente con tecnología avanzada en automatización agrícola soportada sobre medición eficiente de las variables relacionadas.

El *Capsicum annum* L., fue seleccionado para este proyecto por: ser una planta C3, el tipo más común de fotosíntesis; ser pequeño y de fácil portabilidad; producirse todo el año; y ser

una de las especies más cultivadas de Chile en el mundo (González-Pérez *et al.*, 2011; Montes-Hernández *et al.*, 2004).

1.2 Planteamiento del problema

1.2.1 Desventajas de Sistemas Actuales de Medición de Fotosíntesis.

Todos los métodos de medición de fotosíntesis mencionados por Millán-Almaraz *et al.* (2009) y Espinosa-Calderon *et al.* (2011) son destructivos, invasivos, exclusivos para laboratorio, o a gran escala, lo que coloca a la planta en situaciones anormales de trabajo, inhibiendo así el curso natural del proceso de fotosíntesis. Las repercusiones derivadas de estas desventajas son:

- Estrés mecánico a la planta, ocasionado por encerrar a las plantas, o a partes de ellas, en cámaras plásticas que las someten a presiones y pesos no habituales.
- Daños o destrucción de las plantas o de las muestras al tener que cortarles muestras o secciones para analizarlas en laboratorio.
- Obstrucciones morfológicas referentes a la heterogeneidad de formas y tamaños de las plantas y de sus hojas. Esta desventaja impide que se use la misma cámara para diferentes tipos o edades de las plantas, requiriendo diferentes cámaras con distintas morfologías, encareciendo así los sensores.
- Necesidad de equipo sofisticado de laboratorio que encarece los sistemas de medición e implica el designar un espacio físico para la realización de mediciones.
- Lenta obtención de datos al tener que tomar muestras y llevarlas hasta el laboratorio para su análisis. En caso del método de materia seca (Hodson *et al.*, 2005; Long y Hallgren, 1987), el tener que esperar a que se deshidrate la hoja, lo que arroja resultados que apuntan hacia el pasado, y no al presente.

1.2.2 Dependencia Tecnológica.

La existencia de una dependencia tecnológica hacia otros países para la medición de la fotosíntesis genera repercusiones como:

- Altos costos de transporte relacionados con fletes, aduanas, impuestos, etc.

- Altos costos de mantenimiento correctivo y preventivo debido a los gastos de envío y remisión del equipo a los centros de soporte técnico, o de viaje y viáticos del técnico especializado;
- Largos tiempos de entrega resultantes de la transportación desde diferentes países y retención en aduanas;
- Rezago en desarrollos del campo nacional al no poder contar con tecnología de punta de primera mano, y tener que esperar hasta que otros países la liberen internacionalmente.
- Baja competitividad de producción a nivel internacional al no estar en condiciones equivalentes con los productores de países con mayor desarrollo tecnológico.

1.3 Hipótesis y objetivos

1.3.1 Hipótesis general

“Es posible estimar la fotosíntesis en *Capsicum annuum* L. basándose en mediciones no invasivas de variables como temperatura de hoja, temperatura ambiente, humedad relativa y radiación”.

1.3.2 Objetivo general

“Desarrollar una metodología para estimar la fotosíntesis basada en principios ópticos que permitan medir de una manera no invasiva variables relacionadas con dicho proceso”.

1.3.3 Objetivos específicos

- Determinar alcances de sensores comerciales de fotosíntesis.
- Caracterizar el fenómeno de fotosíntesis en diferentes condiciones ambientales con respecto a las variables: temperatura de hoja, humedad relativa del ambiente y radiación, en la planta *Capsicum annuum* L.
- Generar un algoritmo que correlacione las variables; temperatura de hoja, humedad relativa del ambiente y radiación con la fotosíntesis.
- Evaluar la eficacia del modelo desarrollado.
- Implementar el algoritmo en un FPGA (Field Programmable Gate Array).

CAPÍTULO 2:

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Métodos generales de medición de fotosíntesis.

Existen diferentes métodos para medir la fotosíntesis a niveles de hoja, planta o grupo de plantas. Millán-Almaraz *et al.*, 2009, reporta que los métodos modernos utilizados para la estimación de la fotosíntesis son los siguientes:

2.1.1 DESTRUCTIVOS

O también denominados de materia seca, consisten en la estimación de la actividad fotosintética acumulada durante la vida de la planta, basada en la acumulación de materia seca de una planta desde su punto de germinación, hasta que es cortada (Hodson *et al.*, 2005). Este método comprende el cortar una porción de la planta, deshidratarla y pesar su materia seca. Los métodos destructivos son adecuados para evaluar cambios a largo plazo, pero son inapropiados cuando el interés se concentra en los incrementos de materia seca a corto plazo como en intervalos de días, horas o minutos, o en las contribuciones que hacen los órganos individuales (Long y Hallgren, 1987).

2.1.2 MANOMÉTRICOS

Consisten en la medición directa de los cambios de presión de O₂ o CO₂ en una cámara aislada con organismos fotosintéticos. (Warburg, 1969). Las principales razones por las cuales este método no es utilizado para monitorear rápidos cambios en la fotosíntesis, conciernen principalmente a la precisión que es afectada por perturbaciones en la temperatura, composición del aire, cambios de presión abióticos en los recipientes y diferenciales de presión muy pequeños en los gases a medir (Hunt, 2003).

2.1.3 ELECTROQUÍMICOS

Método utilizado en soluciones acuosas donde se mide O₂ o CO₂ por medio de electrodos electroquímicos. Es un método muy útil debido a su simplicidad y bajo precio (Tank and Musson, 1993; Deleiu and Walker, 1972; Takahashi *et al.*, 2001). Algunas de sus limitantes son que los sensores consumen oxígeno de la muestra, y que después de largos periodos de muestreo se pueden producir mediciones no confiables; también la muestra tiene que ser agitada constantemente para asegurar mediciones homogéneas; intercambio continuo de partes del sensor para mantener una máxima precisión; son útiles únicamente en medios acuosos que no contengan burbujas, puesto que éstas interfieren con la medición (Hunt 2003). Este método tiene su alternativa para gases, donde la medición se hace por medio de dos electrodos de O₂ en forma de disco, los cuales se conectan a una cámara que cubre la hoja (Delieu and Walker 1981). Aunque este método tiene la ventaja de poder medir en hojas de plantas terrestres, sufre la mayoría de las desventajas de la versión para sustancias acuosas. Estos dispositivos pierden sensibilidad a muy bajas concentraciones de CO₂.

2.1.4 INTERCAMBIO DE GASES

Este es el método más comúnmente usado actualmente en equipos comerciales y experimentales para la medición de fotosíntesis en hojas individuales (Delieu and Walker, 1981). Consiste en aislar la muestra en una cámara y medir el O₂ o CO₂ antes y después del proceso fotosintético. Dependiendo de esta relación se infiere el grado de fotosíntesis ejecutada por la planta (Schulze, 1972; Takahashi *et al.*, 2001).

El gas más comúnmente tomado como parámetro es el CO₂, para su detección se utilizan los sensores Infrarrojos de Gas (también llamados IRGA por sus siglas en Inglés *Infra Red gas Analysis Sensors*). Los IRGA sirven para medir la concentración de moléculas de CO₂ en el aire, las cuales absorben luz infrarroja a longitudes de onda de 4.25, 2.66, 2.77 y 14.99 μm (Hill and Powell, 1968). Estos sistemas de medición pueden consistir en cámaras cerradas o abiertas. Los sistemas de cámara abierta permiten el muestreo a mayores frecuencias que los de cámara cerrada lo que resulta en una mayor velocidad de respuesta. Esto permite cambiar la cámara a diferentes hojas. Un aspecto que causa algunas complicaciones es el sellado de la cámara, el que no sea transparente oscurece una porción de la hoja, no solo inhibiendo la fotosíntesis en esa área, sino produciendo CO₂ por su misma respiración oscura. Dicho CO₂ repercute en un error en

la medición del rango de fotosíntesis calculado por el dispositivo (Long and Bernacchi, 2003). Otro aspecto a tomar en cuenta es que la forma física de la cámara elegida se debe de adecuar al tamaño y forma de la hoja a estudiar.

Análogo al sistema de intercambio de gases basado en CO₂, existe el de O₂, el cual tiene ciertas características a tomar en cuenta. La diferencia entre el O₂ antes y después de la fotosíntesis es mucho menor que la de CO₂, además, el primero es mucho más inestable que el segundo. Esto implica la utilización de sensores con muy alta precisión, lo cual encarece al sistema (Hunt, 2003).

2.1.5 MÉTODO DE ISÓTOPOS DE CO₂

Método destructivo utilizado en cámaras aisladas. Se basan en el uso de Isótopos de Carbón para marcar la producción de CO₂, después la muestra se somete a un sistema que cuente las partículas beta a través de la radiación del isótopo (Hunt, 2003; Kawachi *et al.*, 2006). La fotosíntesis se estima a partir de la cantidad de partículas beta contadas.

2.1.6 MODELACIÓN MATEMÁTICA

Dado que la fotosíntesis no es una variable que se pueda medir directamente, se vuelve necesario calcularla con base en otras variables y algunas ecuaciones específicas. Este método en específico consiste en el desarrollo de modelos matemáticos que permitan la estimación de fotosíntesis basado en el comportamiento de patrones obtenidos al monitorear otras variables comúnmente climáticas. Esta técnica es difícil de usar debido a la complejidad de la mayoría de los modelos, sin embargo, es una herramienta poderosa para la generación de modelos que predigan la fotosíntesis con alta precisión (Olioso *et al.*, 1998).

2.1.7 ONDAS ACÚSTICAS

Este método consiste en la emisión de una onda sonora en una muestra acuosa con algas. Se mide la distorsión de la onda después de pasar por el medio, ésta refleja la cantidad burbujas de O₂ producidas por la fotosíntesis de las algas y de ahí se calcula el nivel de fotosíntesis generado por las algas (Hermand *et al.*, 1998).

2.2 Métodos de medición de fotosíntesis relacionados con técnicas ópticas.

La mayoría de los métodos de medición de fotosíntesis enumerados por Millán-Almaraz *et al.* (2009) son intrusivos, exclusivos para laboratorio o incluso destructivos. El que un método sea invasivo significa que interfiere, contamina o reacciona, ya sea física o químicamente, con la muestra. Esto no es deseable debido a que interfiere con el comportamiento normal de la planta.

Los métodos no intrusivos no alteran o someten a estrés a la planta, por lo que ésta trabajará de forma ordinaria. El utilizar variables ópticas permite evitar el contacto físico con la planta, es decir, constituyen una forma no intrusiva de medición. A continuación se expone información general sobre los diferentes métodos de medición de fotosíntesis que involucran técnicas ópticas. Para mayor información referirse al documento de Espinosa-Calderon *et al.* (2011).

2.2.1 ESPECTROSCOPIA

La espectroscopia óptica consiste en el monitoreo de las interacciones entre la materia y la radiación electromagnética en los rangos de ultravioleta (UV, 100-400nm), visible (VIS, 400-760nm) e infrarrojo (IR, 760nm-1000µm) (Waynant and Ediger, 1994). Existen diversos tipos de espectroscopía, los cuales se explicarán a continuación. Para más información referirse a Schlodder (2009).

2.2.1.1 Espectroscopia por absorción: La absorción de luz induce transiciones electrónicas y de vibración de moléculas dependiendo de la longitud de onda de la fuente (Schlodder, 2009). El espectro de absorción provee una “huella” espectroscópica de la muestra. El análisis del espectro de absorción de una muestra genera información sobre su comportamiento en estado excitado. Las limitantes de esta técnica son: la auto-sombra entre plantas y entre el mismo dosel, la altura de la vegetación, y cambios naturales en la orientación de las hojas (Rascher and Pieruschka, 2008; Zimmerman, 2006). Dentro de la espectroscopia por absorción existen: el Dicroísmo Circular (CD) y el Dicroísmo Lineal (LD), que usan luz polarizada. (Schlodder, 2009). El primero brinda información sobre la estructura secundaria de macromoléculas biológicas (Cantor and Schimmel,

1980). El segundo se usa para obtener información relativa a la orientación de pigmentos en plantas (Rodger and Nordén, 1997).

2.2.1.2 Espectroscopia por diferencia de absorción: Esta detección resulta de diferencias de luz menos oscuridad de espectros de absorción. Es capaz de detectar pigmentos específicos involucrados con procesos específicos (Schloder, 2009).

2.2.1.3 Espectroscopia de absorción ultra rápida: También es llamada UTRAS por su acrónimo en inglés *Ultrafast time-resolved absorption spectroscopy*. Consiste en la aplicación de un tren continuo de flashes de luz cortos y de gran intensidad que generen reacciones fotoquímicas. Los cambios en absorción inducidos por estos flashes se monitorean en función del tiempo y de la longitud de onda. (Leahy-Hoppa and Spicer, 2010).

2.2.1.4 Espectroscopias Infrarroja (IR) y Raman: La espectroscopia IR se basa en la absorción de radiaciones electromagnéticas con longitudes de onda en el rango del infrarrojo (Asakawa and Tonokura, 2010). Su espectro es usualmente medido con un espectrómetro IR de transformada de Fourier (Kumar and Barth, 2010). La espectroscopia Raman se basa en la dispersión inelástica de la radiación electromagnética a frecuencias diferentes a la de la fuente de luz. Las espectroscopias Raman e IR pueden utilizarse para observar la vibración de moléculas (Asakawa and Tonokura, 2010).

2.2.2 FLUORESCENCIA

Cuando una molécula ha sido excitada a un estado mayor de energía, emite radiación al decaer al estado inicial. A esta emisión se le llama fosforescencia si la transición ocurre entre estados energéticos de diferente spin, y fluorescencia, si son de igual spin. La fosforescencia dura entre 1 y 10 segundos, mientras que la fluorescencia dura solamente algunos nanosegundos. (Schloder, 2009). Cuando la clorofila es excitada por luz, fluoresce en longitudes de onda de 685nm y 740nm (Taiz and Zeiger, 1998; Rascher and Pieruschka, 2008). La intensidad de la fluorescencia está correlacionada a la energía utilizada en la fotosíntesis.

La fluorescencia retardada consiste en la medición de fotones cuya intensidad depende de la actividad del fotosistema II de las plantas (Zhang *et al.*, 2007). Este método es usado para obtener información sobre la tasa de fotosíntesis neta (P_N).

Es posible la medición de fluorescencia a través de cámaras digitales. Esto permite, entre otras cosas, hacer mediciones en vivo de áreas foliares y crecimiento, y reconocimiento indirecto de fenómenos fisiológicos que interfieren con la fotosíntesis (Baker, 2008).

Las técnicas de medición de fluorescencia suelen estar muy ligadas a la espectroscopia. Esto ha permitido la generación de mapas de distribución global de estrés en plantas y eficiencia fotosintética. Estos mapas se han obtenido desde plataformas colocadas en campo, aire o, incluso, en el espacio (Rascher and Pieruschka, 2008; Rascher *et al.*, 2009).

Dada la disponibilidad de instrumentos comerciales, la fluorescencia se ha convertido en una de las técnicas espectroscópicas más utilizadas para investigaciones fisiológicas en plantas (Rascher and Pieruschka, 2008).

2.2.3 ANALIZADORES DE GASES

El análisis de gases es la técnica de medición de fotosíntesis más utilizada tanto para aplicaciones científicas como comerciales (Millan-Almaraz *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2007). Estos sistemas miden el intercambio de los gases O_2 o CO_2 , ya sea en medios acuosos o gaseosos.

2.2.3.1 Medios gaseosos: La molécula de CO_2 absorbe luz IR de longitud de onda de 2.66, 2.77, 4.26 and 14.99 μm (Millan-Almaraz *et al.*, 2009). Los analizadores Infrarrojos de Gas (llamados IRGA por su acrónimo en inglés *Infrared Gas Analyzer*) utilizan esta absorción para hacer una medición cuantitativa del cambio de CO_2 durante el proceso de fotosíntesis (Gansert and Blossfeld, 2008).

Los IRGAs consisten, esencialmente, en: una cámara transparente que encierra a la muestra iluminada (hoja o planta completa); 2 tubos para flujo de aire (uno para la muestra y el otro para la referencia); una bomba que haga circular el aire; un módulo para análisis óptico; una fuente de luz IR; choppers, fuentes de alimentación, amplificadores, filtros y detectores de fase (Williams *et al.*, 1982; Gürtner *et al.*, 2005).

Durante la fotosíntesis, el diferencial de O₂ es mucho menor que el de CO₂. Además, el O₂ es más inestable. Esto provoca que los sensores necesarios para la medición de este gas tengan que ser más precisos y, por lo tanto, más caros. Es por esto que no es común hacer mediciones de fotosíntesis en medios gaseosos con analizadores de O₂ (Hunt, 2003).

2.2.3.2 Medios acuosos: Las mediciones de O₂ y CO₂ en medios acuosos generalmente se realizan a través de electrodos electroquímicos tipo Clark. Estos electrodos son invasivos porque compiten con la muestra por dichos gases (Gansert and Blossfeld, 2008).

Los sensores de O₂ de fibra óptica dependen de la extinción de la luminiscencia (fosforescencia o fluorescencia) producida por el O₂. Esta luminiscencia es generada por compuestos organometálicos embebidos en una matriz de polímero permeable al O₂. Dicha matriz se coloca en la punta de la fibra óptica. Esta técnica permite la medición simultánea de la fluorescencia de clorofila al estimular con luz modulada y separar ambas señales por su espectro (Hunt, 2003).

2.2.4 OPTODOS

Los óptodos son sensores opto-químicos capaces de registrar de manera continua parámetros físicos o compuestos químicos, basados en las propiedades de fluorescencia de algunos tintes específicos (Wolfbeis, 2005). Los óptodos pueden medir en ambos medios, gaseosos (Neurauter *et al.*, 1999) o acuosos (Tengberg *et al.*, 2006), sin restringir el rendimiento del elemento específico de detección (Gansert and Blossfeld, 2008).

En los óptodos, micropartículas luminiscentes (luminóforos) son incorporadas en una matriz de polímero específicamente diseñada. Esta matriz define la forma de la mancha del sensor y ajusta las propiedades del sensor (tiempos de la sensibilidad, la sensibilidad cruzada y respuesta) para otras muestras a analizar (Gansert and Blossfeld, 2008).

2.2.5 FOTOACÚSTICA

En la técnica de fotoacústica, una hoja es encerrada en una celda y expuesta a un haz de luz modulado. La absorción de luz de la hoja genera tanto un cambio de volumen molecular, como un cambio en la entalpía de la fotorreacción. Estos cambios producen señales de presión de calor

y de oxígeno a la misma frecuencia del haz de luz, y son censadas por un transductor piezoeléctrico (Hou and Sakmar, 2010). Esta señal contiene información de propiedades ópticas y térmicas de la muestra, difusión de O₂ y de CO₂, y rendimiento de espectros de cuantos de luz (Barja *et al.*, 2001). En general, los sistemas fotoacústicos miden parámetros termodinámicos como volumen, entalpía y entropía.

2.2.6 IRRADIANCIA

La fotosíntesis es un fenómeno que responde a cuantos de luz. Entonces, es el número de fotones disponibles, en lugar de la cantidad de energía radiante, lo que le es relevante para las reacciones químicas. Por ejemplo, si un fotón de 700 nm es absorbido, éste induce el mismo cambio químico que uno de 350 nm, sin importar que el primero tenga el doble de energía que el segundo. La parte más importante para la medición de irradiancia (I) es la disponibilidad de radiación fotosintética (PAR por su acrónimo en inglés *Photosynthetically Available Radiation*). La PAR está formada por el rango de longitudes de onda de 400 a 700nm (Bass *et al.*, 1995).

Existen diferentes modelos que expresan la relación entre I y P_N : funciones exponenciales (Smith and Houpis, 2004), función tangencial (Kurano and Miyachi, 2005), modelo hiperbólico no rectangular (Yufeng *et al.*, 2005), método hiperbólico rectangular (Kurano and Miyachi, 2005), método de regresión binomial (Wei-guo, 2006), y el modelo de Ye (Ye, 2007). De éstos los más utilizados son el método hiperbólico no rectangular y el de regresión lineal (Ye, 2007).

Aparte de la irradiancia, estos modelos necesitan los valores de condiciones ambientales como concentraciones de CO₂ y O₂, temperatura y humedad para calcular una curva de respuesta de P_N . El procesamiento de promedios temporales de dichas variables usualmente genera resultados sobrevalorados, por lo tanto, son preferibles los valores instantáneos (Berninger, 1994).

2.2.7 CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO INTRACELULAR

Las plantas, a diferencia de los animales, no poseen un sistema de distribución de O₂ para sus tejidos. Entonces, si la concentración de O₂ es reducida, como lo es durante la fotosíntesis, las plantas reducen sus procesos metabólicos para disminuir su consumo de energía (Van Dongen *et al.*, 2004). Así, las plantas alcanzan un uso más eficiente de O₂ (Bologa *et al.*, 2003), induciendo la formación de lenticelas y aerénquima para incrementar la permeabilidad de los tejidos al

oxígeno (Evans, 2004). Entonces, la medición de concentración de oxígeno interno en los tejidos de la planta muestra ser un cuantificador directo de su actividad fotosintética (Schmälzlin *et al.*, 2005).

El oxígeno intracelular en plantas puede ser medido con un electrode tipo Clark, pero su continuo consumo de O₂ podría afectar la concentración interna de la célula (Buerk, 2004). La técnica óptica para medir concentraciones intracelulares de O₂ en plantas consiste en la inyección de células de Pt(II)-tetra-pentafluorofenilporfirin (PtPFPP) encapsuladas en microcápsulas de polistireno, las cuales son fosforescentes ante la presencia de oxígeno (Papkovsky, 2004). Así, al excitar con alguna técnica óptica de multifrecuencia con modulación en fase, se logra una determinación precisa de los cambios de fosforescencia debidos a la presencia de oxígeno (Schmälzlin *et al.*, 2005).

2.2.8 MICROSCOPIA ÓPTICA

Los microscopios a lo largo de su historia han tenido una amplia gama de aplicaciones biológicas. En la actualidad han surgido tecnologías modernas de microscopios electrónicos, atómicos y ópticos. Aunque los dos primeros cuentan con una alta resolución, solamente los microscopios ópticos permiten analizar muestras biológicas a nivel unicelular, y permite el estudio en vivo de éstas por largos periodos de tiempo (Cisek *et al.*, 2009). La formación de imágenes en los microscopios ópticos se basa en variaciones espaciales de intensidades de luz almacenadas por un detector. Debido a que esta técnica tiene una muy amplia gama de ramificaciones, en este documento solamente se comentarán los métodos más populares de cada tipo de microscopía.

2.2.8.1 Microscopía lineal de campo: Este tipo de microscopios forman la imagen del objeto directamente de las lentes de éste. Esta imagen es proyectada en un detector bidimensional (ya sea la retina del ojo humano o una cámara electrónica). Propiedades de la luz como la fase o la polarización, que se utilizan en estos microscopios como mecanismos de contraste, son convertidas a cambios de intensidad de luz para que sean cuantificables por el detector (Bradbury and Evennett, 1996).

La microscopía de fluorescencia es uno de los métodos más utilizados en microscopía. Ésta ofrece ventajas como alta sensibilidad y especificidad (Haugland *et al.*, 2005). Sin embargo, su resolución axial es relativamente baja (Cisek *et al.*, 2009).

2.8.8.2 Microscopía lineal de escaneo: Los microscopios de escaneo enfocan un haz de luz en un pequeño punto en la muestra. Después se mueve la plataforma de la muestra, o el haz de luz, para escanear toda la muestra y lograr una medición completa de ésta (Cisek *et al.*, 2009). Aunque esta técnica ha alcanzado rangos nanométricos, algunas restricciones de estos microscopios son: la falta de transmisión de luz en el arreglo, la interferencia entre pixeles vecinos y su limitada velocidad (Pawley and Masters, 2008).

2.8.8.3 Microscopía no lineal de escaneo: En los niveles microscópicos, la aplicación de pulsos ultra cortos de laser a bajas potencias induce una polarización no lineal en la muestra. Esta técnica permite obtener imágenes de especímenes vivos sin hacerles daño, mientras permite seccionarlo ópticamente (Denk *et al.*, 1990). Cada contraste de los diferentes tipos de microscopía no lineal contiene información específica sobre la estructura de la muestra, presentando numerosas ventajas sobre las técnicas de microscopía lineal. Algunas de estas ventajas son: la obtención de imágenes de tejido profundo, sección óptica, imágenes en vivo de muestras sin teñir, y la inducción simultánea de varios procesos no lineales en la muestra. Sin embargo, la microscopía no lineal de escaneo no es muy popular aún, ni tiene muchas aplicaciones (Cisek *et al.*, 2009).

La fluorescencia por excitación multifotónica es el mecanismo de contraste lineal más utilizado en investigaciones microscópicas debido a la disponibilidad comercial de microscopios lineales de escaneo con excitación laser de dos fotones (Cisek *et al.*, 2009). Ésta puede excitar moléculas de pequeño volumen debido a la no linealidad del proceso de excitación. Este tipo de excitación permite seccionado óptico y reduce el blanqueo producido por desenfoque (Denk *et al.*, 1990).

CAPÍTULO 3:

MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 Marco teórico

3.1.1 Medición de Radiación Incidente en la Planta

Taiz y Zeiger (2010) reportan el rendimiento de los *cuantos* que absorbe la planta y la proporción de fotosíntesis que puede llevar a cabo ésta con dicha energía. Esto se traduce en que existe cierta Eficiencia de *Cuanto*, la cual puede explicarse como medida de los fotones que participan en el proceso fotoquímico. Entonces, también aparece el concepto de Eficiencia de Energía, que es la medición de la cantidad de energía de los fotones que es posteriormente almacenada como productos químicos.

La fotosíntesis está limitada por luz. Más luz implica mayor proporción de *cuantos* de energía. Pero esta proporción no es infinita. Existe un punto de foto-saturación lumínica. El trabajo de caracterización consistirá entonces en revisar a qué rangos de luz comienza a saturarse la hoja. Taiz y Zeiger (2010) también informan que en cloroplastos funcionales mantenidos en baja luz, la proporción de absorción de luz transformada en O₂ es del 95%, tomando en cuenta este alto porcentaje, se visualiza factible la medición de luz como parámetro indicador para estimar la fotosíntesis.

La fotosíntesis no utiliza todo el espectro de la luz. Ésta usa principalmente las longitudes de onda de 400 y 700 nm. Es espectro conformado principalmente por estas longitudes de onda es llamado rango de Radiación que Activa la Fotosíntesis (Photosynthesis Active Radiation, PAR), y este rango fue utilizado para algunos experimentos.

3.1.2 Medición de Temperatura por Emisión Infrarroja:

Cuando la clorofila se encuentra en estado excitado tiene 4 alternativas para disponer de su energía antes de regresar a su estado normal, las cuales compiten entre sí:

-
- Re-emitar fotones. A este proceso se le conoce como Fluorescencia. La clorofila fluoresce en la región del rojo.
 - Transferir su energía a otra molécula.
 - Realizar procesos fotoquímicos referentes a la fotosíntesis.
 - Convertir directamente su energía en calor. Del total de energía que la planta capta de la luz, se utiliza aproximadamente el 25% para el proceso fotoquímico, mientras que el 75% se irradia en forma de calor. Este proceso es muy rápido.

Todos los objetos a temperatura por encima del cero absoluto emiten radiación electromagnética en función de su temperatura. El inferir la temperatura de un cuerpo con base en la cantidad de luz infrarroja que irradia permite que no haya contacto físico con éste. Algunos puntos a tomar en cuenta para utilizar este principio de medición son que se debe de conocer el grado de irradiancia del cuerpo a estudiar; se debe de conocer la distancia fija a la que se debe de colocar el sensor de cuerpo; se debe de compensar con una medición de referencia de la temperatura ambiente.

Una de las ventajas de la medición de temperatura por emisión infrarroja consiste en su velocidad. Sin embargo, es necesario conocer el tiempo durante el cual la planta aumenta su temperatura al momento de la fotosíntesis y compararlos con los tiempos de respuesta del sensor. Una vez que el sensor se ajuste a la velocidad del proceso de fotosíntesis, se podrán estudiar las siguientes opciones:

- Que el aumento en la temperatura indique el tiempo de trabajo de fotosíntesis de la planta, determinando así, el tiempo que se debe tomar en cuenta la medición de luz incidente en la planta.
- Que la magnitud del diferencial de temperatura de la planta durante el proceso de fotosíntesis esté ligado al nivel de fotosíntesis logrado.

3.2 Materiales

3.2.1 El organismo experimental:

El organismo experimental seleccionado fue el *Capsicum annuum* L. cultivar “Don Benito”, más comúnmente llamado “Chile Jalapeño”. De entre las cinco especies cultivada de Chile, *Capsicum annuum* L. es la más conocida y la más importante económicamente, porque es distribuída en

todo el mundo (González-Pérez *et al.*, 2011; Montes-Hernández *et al.*, 2004). Éste es un ingrediente indispensable en empleado para preparación de comida en el mundo, así como una importante materia prima para las industrias farmacéuticas y cosmética (Jin *et al.*, 2009). Aunque es originario de Norteamérica, más específicamente de México y Guatemala, hoy en día sus principales productores son China, Mexico, Turquía y los Estados Unidos (González-Pérez *et al.*, 2011). El *Capsicum annuum* L. se cultiva en diferentes regiones, desde el nivel del mar hasta los 2500 metros sobre el nivel del mar. Es por esto que se encuentra todo el año en el mercado.

La capacidad de producción de esta especie es, aproximadamente, de 40 toneladas por hectárea, y le son más propicios los climas tropicales húmedas y subtropicales (Ramírez-Meraz, 2010).

Las plantas seleccionadas fueron cultivadas en substrato Sunshine adicionado con perlita. Para mantener similitudes entre los analitos, el experimento utilizó hojas seleccionadas de diferentes plantas de Chile con, aproximadamente, el mismo tamaño, edad, altura, y nutrición.

Algunas de las plantas involucradas con los experimentos serán tratadas con un herbicida que inhiba su proceso fotosintético. Se propone que este herbicida sea el SENCOR 480 SC (Bayer CropScience, Monheim, Alemania). Este herbicida, cuya sustancia activa es la Metribuzina, ataca principalmente al fotosistema II. El que algunos individuos sean tratados con este herbicida permitirá confirmar si realmente la temperatura foliar está relacionada con su fotosíntesis.

3.2.2 Analizadores de Espectro

El utilizar variables ópticas permite evitar el contacto físico con la planta, es decir, constituyen una forma no intrusiva de medición. El monitoreo óptico remoto de tejidos biológicos, por ejemplo las hojas de las plantas, permite una medición no invasiva porque no hay contacto físico entre el sensor y la hoja, por lo que no interfiere con el comportamiento normal de la planta (Espinosa-Calderon *et al.*, 2011). Previo a este monitoreo, es necesaria la caracterización de los analitos para seleccionar las longitudes de onda donde el tejido muestra la respuesta más cuantificable. Una de las principales variables ópticas a medir, es la absorción. La absorción óptica se define como la capacidad de un material de captar luz (Wolfbeis, 2005). Todos los materiales absorben determinadas longitudes de onda dependiendo de las resonancias vibratorias y electrónicas asociadas a las moléculas específicas que lo conforman (Agrawal, 2002). La

espectroscopía se encarga de dividir un espectro en sus diferentes longitudes de onda, y estudiar las respuestas de la materia a la incidencia de éstas (Schlodder, 2009).

Esta parte del experimento buscaba encontrar los espectros de absorción óptica de las plantas tipo C3, C4 y CAM en los rangos de Ultra Violeta (UV, 100-400nm), Visible (VIS, 400-760nm), Infrarrojo Cercano (NIR, 760 nm a 4 μm), Infrarrojo Mediano (MIR, 4 a 14 μm), e Infrarrojo Lejano (FIR, 14 a 1000 μm) (Waynant y Ediger, 2000).

Puesto que se planean hacer mediciones térmicas por infrarrojo (IR), es necesario el conocer las longitudes de onda en que las plantas absorben más radiación. Para esta parte del experimento se utilizaron 2 analizadores de espectro: un Perkin Elmer Instruments, LAMBDA 900, UV/Vis/NIR Spectrometer (PerkinElmer Instruments LLC, 2001); y un Perkin Elmer, Spectrum BX, FTIR System (PerkinElmer Instruments LLC, 2008). Se utilizaron estos 2 analizadores por ser complementarios en sus espectros. Se colocaron, una por una, las muestras de plantas tipo C₃, C₄ y CAM dentro de los analizadores y se obtuvieron sus espectros.

Las plantas caracterizadas ópticamente fueron: como C₃, frijol (*Phaseolus vulgaris*), rábano (*Raphanus sativus*), chile (*Capsicum annum L.*); como C₄, maíz (*Zea mays*); y como CAM, nopal (*Opuntia spp*). Todas éstas son vegetales importantes en la dieta a nivel mundial (Torres-Lopes, 2012).

3.2.3 Termografía óptica

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

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

Este experimento se realizó sobre ejemplares tipo C3, de *Euphorbia pulcherrima* c.v. Freedom. Se utilizó una cámara para termografía infrarroja (ThermaCAM FLIR E25), con rango 7 a 13.5 μm .

3.2.4 Analizador de gases

El intercambio de gases es la técnica más utilizada para aplicaciones, tanto comerciales como de investigación en procesos biológicos. Esta técnica está basada en el hecho de que la molécula de CO₂ absorbe IR en las longitudes de onda de 2.66, 2.77, 4.26 and 14.99 μm (Espinosa-Calderon *et al.*, 2011). Los analizadores infrarrojos de gas (Infrared gas analyzer, IRGAs) utilizan las características de absorción de luz de las moléculas de CO₂ para medir la disminución de la densidad de flujo de cuantos IR como una medición cuantitativa de este gas. La producción de este gas es una precisa forma de medir fotosíntesis. Los IRGAs succionan aire de las cámaras y de la atmósfera de referencia, comparándolas en el sensor de gas. El tiempo necesario para que la concentración de CO₂ decrezca cierto porcentaje (típicamente 30ppm) es inversamente proporcional a la proporción de cambio por fotosíntesis generada por la hoja (Millan-Almaraz *et al.*, 2009).

El dispositivo utilizado en estos experimentos fue el Li-6400XT (LI-COR, 2004). Este analizador por intercambio de gases fue elegido por características como: exactitud de 1.5%, precisión de ± 0.09% a CO₂ 350 ppm, rápida respuesta, eliminación de retrasos de tiempo y portabilidad. Además, éste es el sistema de medición de fotosíntesis más referenciado en publicaciones científicas alrededor del mundo (Singh *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010).

3.2.5 Sensor de temperatura y humedad relativa, SHT71, Sensirion

Este sensor provee una salida digital procesada y precalibrada. Está basado en un sensor capacitivo para la medición de humedad relativa, mientras que para la medición de temperatura utiliza un sensor band-gap. Su circuitería interna está desarrollada sobre circuitos CMOS, los cuales garantizan una excelente confiabilidad y gran estabilidad a largo plazo. Tiene salida serial de dos hilos con una resolución de 14 bits, lo que resulta en ventajas como una señal de alta calidad, rápida respuesta, fácil integración a sistemas electrónicos, bajo consumo de energía, tamaño pequeño e insensibilidad a perturbaciones externas.

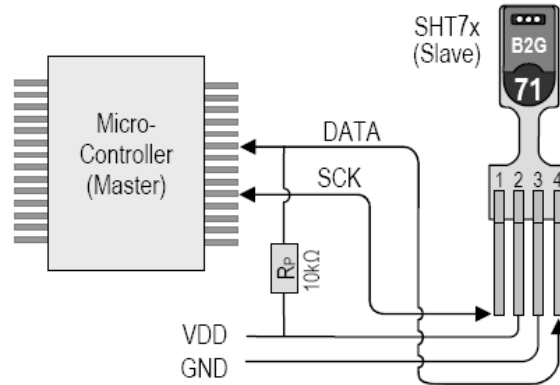


Figura 3.1 Conexión típica del sensor SHT71

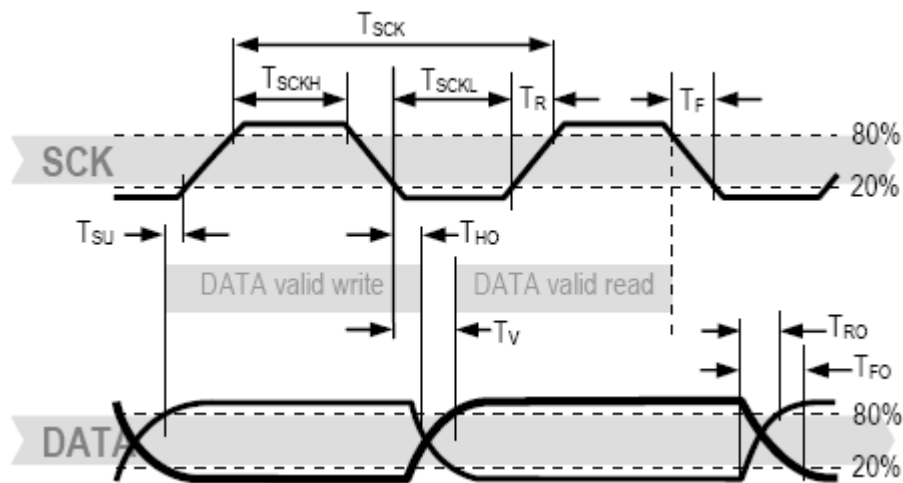


Figura 3.2 Traza de comunicación del sensor SHT71.

3.2.6 Convertidor Programable de Luz a Frecuencia TSL230RD, TAOS.

Para la medición de radiación de luz se propone utilizar un sensor Convertidor de Luz a Frecuencia modelo TSL230RD, TAOS.

Este convertidor combina un fotodiodo configurable de silicio y un convertidor de corriente a frecuencia en un solo circuito integrado CMOS. La salida puede ser un tren de pulsos o una onda cuadrada (50% de ciclo de trabajo) con frecuencia directamente proporcional a la intensidad de luz. La sensibilidad del dispositivo es elegible en tres rangos, permitiendo dos décadas de ajuste. La salida de frecuencia a máxima escala puede ser escalada por uno de cuatro valores preajustados. Todas las entradas y la salida son compatibles con circuitos TTL,

permitiendo una comunicación directa en dos sentidos a través de un micro-controlador programable y una salida de interface.

Este dispositivo cuenta con una salida con tolerancias de frecuencia de $\pm 15\%$. También está compensado en temperatura para los rangos de luz del Ultravioleta (UV) al Visible (Vis), 320 a 700 nm, y responde sobre el rango de luz de 320 a 1050 nm. Este dispositivo viene caracterizado de fábrica sobre temperaturas en el rango de -25 a 70 °C.

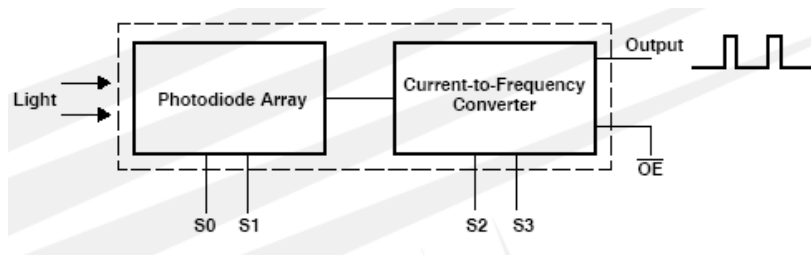


Figura 3.3 Bloque funcional del Convertidor Programable de Luz a Frecuencia TSL230RD, TAOS

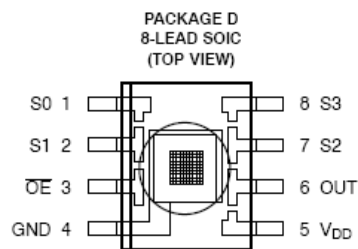


Figura 3.4 Vista superior del integrado TSL230RD.

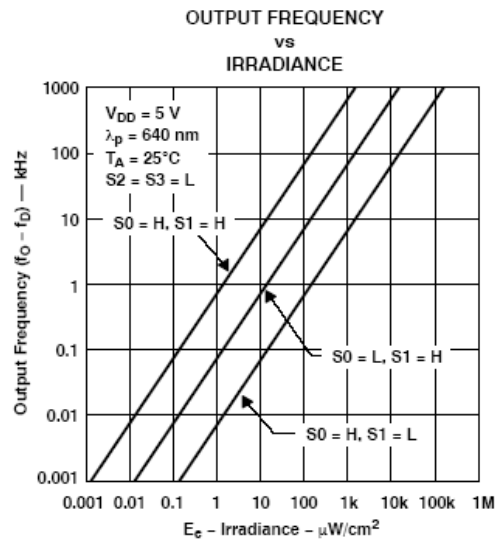


Figura 3.5 Salida de Frecuencia Vs Irradiancia del TSL230RD.

3.2.7 Sensor Termopila Infrarrojo TMP006, Texas Instruments.

Este sensor puede medir la temperatura de un objeto sin necesidad de hacer contacto con el objeto. Este dispositivo utiliza una termopila para absorber la energía infrarroja emitida por el objeto medido y usa el correspondiente cambio en el voltaje de la termopila para determinar la temperatura del objeto.

El rango de medición del sensor infrarrojo está especificado desde -40 a +125 °C, lo cual permite un amplio rango de aplicaciones. Trabaja en el espectro de 4 a 8 μm . Este sensor tiene un bajo consumo de potencia durante su operación, poco peso y tamaño pequeño, estas características lo hacen útil para aplicaciones portátiles.

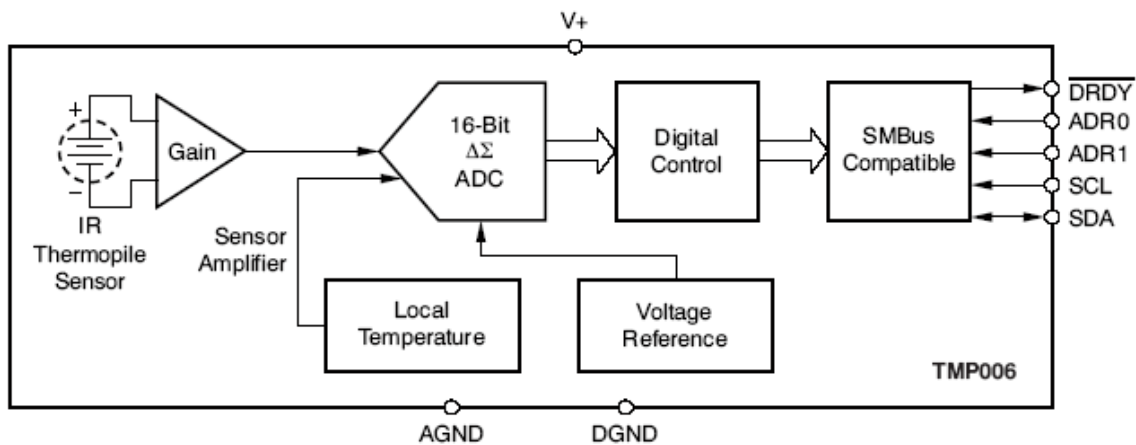


Figura 3.6 Diagrama a bloques interno del Sensor Termopila Infrarrojo TMP006, Texas Instruments.

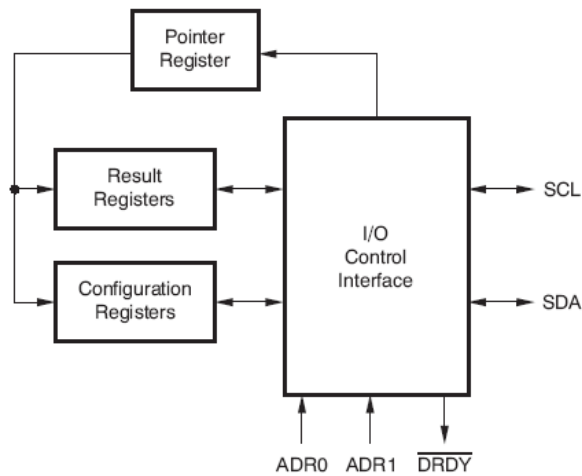


Figura 3.7 Estructura interna del Sensor Termopila Infrarrojo TMP006, Texas Instruments.

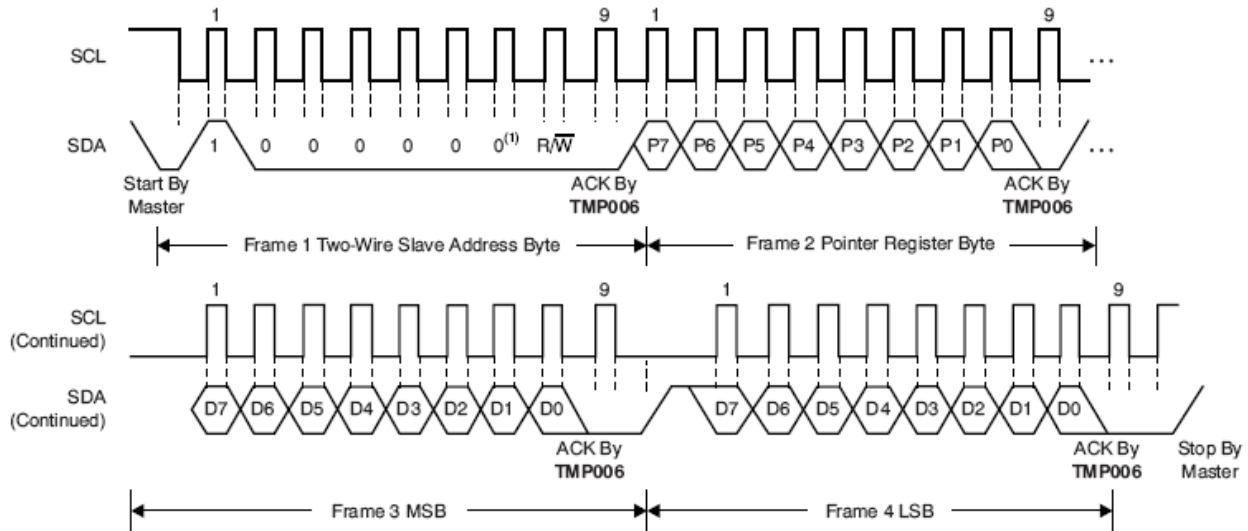


Figura 3.8 Protocolo de comunicación del Sensor Termopila Infrarrojo TMP006, Texas Instruments.

3.3 Metodología

3.3.1 Análisis de alcances de sensores comerciales:

- Análisis de capacidades y deficiencias de los sensores de fotosíntesis comerciales disponibles.
- Experimentación con los sensores de fotosíntesis que presenten mejores características.
- Análisis y Experimentación de alcances de sensores de temperatura IR, humedad ambiente, temperatura ambiente y radiación solar, disponibles en el mercado.

3.3.2 Analizadores de espectro

Se tomaron dos muestras de hojas de las diferentes plantas de este experimento (C₃, C₄ y CAM). Una se limpió y la otra no. Todas las muestras se colocaron, una a una, dentro de los espectrómetros. A cada muestra se le revisó su espectro en todo el rango que manejaba cada instrumento.

3.2.3 Termografía óptica

Este experimento se realizó sobre ejemplares tipo C₃, de *Euphorbia pulcherrima* c.v. Freedom. Se utilizó una cámara para termografía infrarroja (ThermaCAM FLIR E25, con rango 7 a 13.5 μm) posada sobre un tripié a una distancia de 70 cm de las plantas.

Uno por uno, se colocaron los ejemplares debajo de la cámara y se fotografiaron con el nivel natural de luz. Inmediatamente después se cubrió el ejemplar para que estuviera en total oscuridad y se fotografió cada minuto durante 10 minutos. De esta forma se mapeó el comportamiento térmico dinámico de las plantas de luz hacia oscuridad.

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

3.3.4 Analizador de gases

El propósito de este experimento fue el estudiar los cambios en la temperatura de hoja y correlacionarlos con su fotosíntesis. La fotosíntesis y la temperatura de hoja fueron medidas en plantas a diferentes niveles de radiación y temperatura ambiente.

3.3.4.1 Detección del periodo de estabilización de la fotosíntesis

El periodo de estabilización es el tiempo requerido por la planta para estabilizar su fotosíntesis a diferentes niveles de radiación. Dos temperaturas fueron utilizadas para esta prueba, 23 and 33 °C.

Antes de realizar las mediciones en cada tratamiento, las plantas fueron sometidas a un proceso de estabilización. Durante este proceso, las plantas se colocaron en cámaras completamente oscuras a la temperatura correspondiente al tratamiento durante 30 minutos.

Las plantas fueron sometidas a seis niveles de radiación (0 - 500 PAR en incrementos de 100 PAR) por 15 minutos cada una. La fotosíntesis fue monitoreada cada minute para detectar el punto de estabilización.

3.3.4.2 Curvas de Luz

Esta parte del experimento fue desarrollada para obtener las tendencias de la temperatura de hoja a diferentes niveles de radiación y, consecuentemente, a diferentes niveles fotosintéticos.

Se utilizaron tres plantas, con tres repeticiones cada una, cinco niveles de temperatura (11, 23, 33, 39 and 45 °C) y once niveles de radiación (de 0 a 1000 PAR en incrementos de 100 PAR).

Después de proceso de estabilización, las plantas fueron sujetas a los niveles de radiación por un periodo igual al periodo de estabilización obtenido (5 minutos). Después de la exposición a la radiación se tomaron las mediciones de fotosíntesis y temperatura de hoja.

3.3.4.2 Curvas de Luz de Referencia

Para establecer mediciones de referencia, el procedimiento de las mediciones de curvas de luz fue repetido con dos diferencias.

La primera diferencia fue repetir una curva de luz sin la planta. Esto mediría el efecto del aparato en sí mismo sobre el punto de medición.

La otra diferencia fue la de repetir una curva de luz con una planta afectada con un herbicida. Este herbicida evitaría que ocurriera la fotosíntesis. Esto mediría el efecto de la radiación sobre la hoja, pero sin la fotosíntesis. El herbicida utilizado fue SENCOR 480 SC (Bayer CropScience, Monheim, Alemania). SENCOR está basado en Metribuzin. Esta sustancia inhibe al fotosistema II. Éste es un herbicida sistémico selectivo que controla hierbas malas a través de sus hojas y raíces. La mezcla utilizada constó de 126 μl de SENCOR disueltos en 40 ml de agua destilada. Esta mezcla fue aplicada a la planta 24 horas antes del procedimiento normal de una curva de luz.

3.3.5 Expresión de rubisco

Todas las eucariotas fotosintéticas reducen CO_2 a carbohidratos por el mismo mecanismo básico: el ciclo Calvin. Este ciclo tiene 3 estaciones: (1) carboxylación, durante la cual el CO_2 es unido covalentemente a un esqueleto de carbón; (2) reducción, donde se forman los carbohidratos a partir del derivado fotoquímico denominado Adenosina TriFosfato (ATP) y donde se reducen equivalentes en la forma de Nicotinamidas Adenina Dinucleotida Fosfato (NADPH); y (3) regeneración, durante la cual, el fijador de CO_2 ribulosa-1,5-bifosfato se reforma². La fijación del CO_2 es el mecanismo central de producción primaria en casi todos los ecosistemas, y es el mayor proceso bioquímico en el ciclo Calvin. La enzima clave en este proceso es la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco). La rubisco es una enzima bifuncional que controla la reducción de CO_2 y la oxigenólisis de ribulosa-1,5-bifosfato. La rubisco existe en múltiples formas, que difieren en estructura, propiedades catalíticas, y sensibilidad al O_2 . De cualquier forma, el tipo de rubisco más distribuido es el de forma I el cual ocurre en plantas y en algunas bacterias. La rubisco I está compuesta por ocho subunidades grandes y ocho subunidades pequeñas (L8S8) (Selesi *et al.*, 2007). Las subunidades pequeñas de rubisco son sintetizadas en el citoplasma y transportadas hacia el cloroplasto, donde es ensamblada la enzima (Taiz y Zeiger, 2010).

La expresión de rubisco fue seleccionada como método de referencia porque ésta es la enzima clave del ciclo Calvin, y porque es un indicador bioquímico de la actividad del proceso fotosintético (Selesi *et al.*, 2007; Flexas *et al.*, 2006). Además, ésta es la enzima más abundante en el mundo, representando hasta el 40% del total de proteínas soluble en la mayoría de las hojas. La expresión de rubisco fue medida por el método RT-PCR (Reverse Transcriptase of Polymerase Chain Reaction).

3.3.5.1 RT-PCR (Reverse transcriptase of polymerase chain reaction)

La PCR Transcriptasa Reversa (RT-PCR) es una variación extremadamente útil de la PCR convencional la cual permite la amplificación de transcritos específicos de mRNA a partir de pequeñas muestras de material biológico sin la necesidad de procedimientos rigurosos de extracción asociados con la purificación de mRNA para propósitos convencionales de purificación. Convenientemente, los dNTP's, el buffer, la *Taq* polymerase, los primers, la transcriptasa reversa (RT) y el templado de RNA son añadidos en conjunto en el tubo de reacción. La reacción es calentada a 37 °C lo que permite trabajar a la RT y permite la producción de una copia de cDNA a partir de las cadenas de RNA que se alinean con alguno de los primers de la mezcla. Después de la “síntesis de la primer cadena” una PCR normal se lleva a cabo para amplificar el cDNA, resultando en la “síntesis de la segunda cadena”, subsecuentemente el DNA de doble cadena es amplificado como se hace usualmente (Walker, 2009).

Procedimiento:

- a) A partir de una muestra que en este caso fue solamente una hoja (de chile o de maíz) se extrajo el mRNA con la técnica del trizol. Se trituró la hoja con nitrógeno líquido y se colocó en un tubo eppendorf. Se adicionó un ml de trizol y se homogeneizó. Se centrifugó para separar en dos fases. Se separó el sobrenadante y se le agregó cloroformo, se centrifugó una vez más y se le agregó isopropanol para que de nuevo se formaran dos fases, la fase cristalina contenía el RNA. A ésta fase cristalina se le agregó etanol con el propósito de precipitar el RNA, se formó una pastilla que contenía el RNA y se dejó secar para después resuspenderla en agua estéril con DEPC.
- b) Para obtener el cDNA se realizó la “síntesis de la primer cadena”. Una vez obtenida la primer cadena, se realizó una PCR convencional para cada una de las muestras, utilizando los oligos para la enzima RuBisCo dependiendo de la muestra tratada (chile o maíz).
- c) Los productos de PCR obtenidos, que correspondían a los transcritos de RuBisCo fueron cargados en un gel de agarosa con bromuro de etidio y la masa en ng del transcrito fue calculada.

3.3.5 Generación de Modelo Matemático

Los modelos deterministas (también llamados de caja blanca o de modelado físico) son explicativos de un sistema. Los modelos de caja negra (de identificación) son descripciones directas de los datos, pero tienen la desventaja de que no dan una explicación de los mecanismos subyacentes. Una combinación de estos dos tipos de modelo resulta en los modelos caja gris.

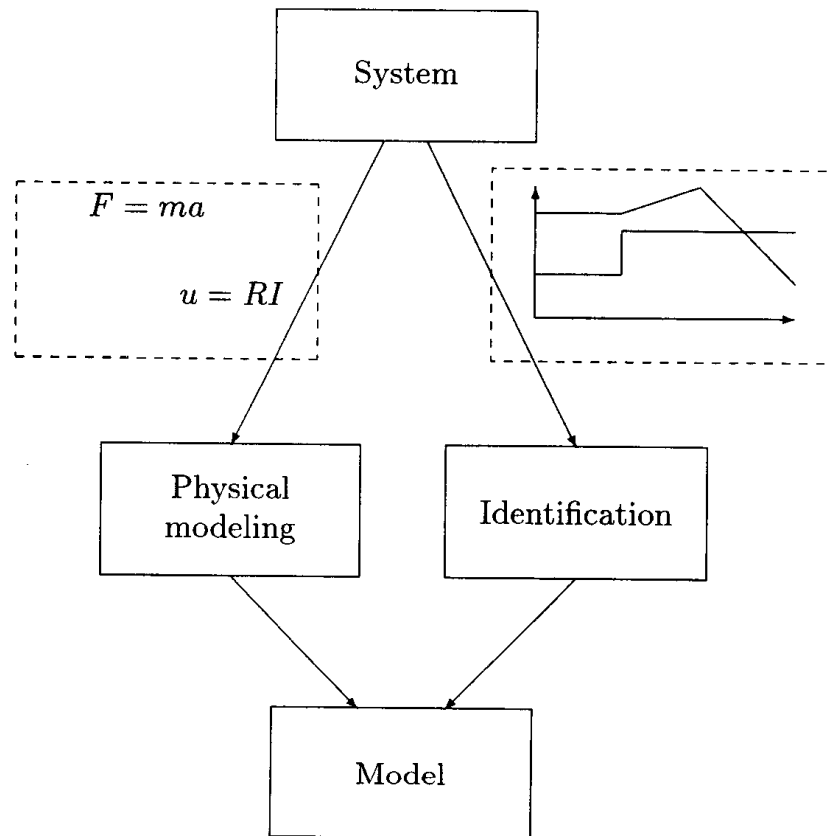


Figura 3.9 Formas de construcción de un modelo matemático.

Para la generación del modelo matemático se utilizaron las mediciones arrojadas por el Li-6400XT. El mismo grupo de mediciones se utilizó para la generación de dos modelos, el primero de caja negra, calibrado por algoritmos genéticos; y el segundo de caja blanca, o determinista.

3.3.6.1 Modelo caja negra, calibrado por algoritmos genéticos

Para la calibración del algoritmo matemático pueden utilizarse algoritmos evolutivos (Evolutionary Algorithms, EAs). Este tipo de algoritmos son métodos utilizados para ajustar, u optimizar, modelos con estructuras específicas (Hoffman *et al.*, 2004). Los EAs tienen una subdivisión denominada Algoritmos Genéticos (Genetic Algorithms, GAs). Los GAs tienen la facultad de ajustar un modelo a un problema específico, mientras se resuelven por medio de retroalimentación (Guzmán-Cruz *et al.*, 2009). Se ha seleccionado a los GAs para calibrar el modelo porque éstos han sido aplicados antes en sistemas tecnológicos aplicados a plantas, control de invernaderos y otros modelos ecológicos; y por su considerable nivel de simplicidad (Guzmán-Cruz, 2010; Guzmán-Cruz *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 2004).

El proceso fotosintético se puede describir de la siguiente forma:

$$y = f(x, y, a, t) \quad (1)$$

donde $x \in \mathfrak{R}^3$ son las variables de entrada, $a \in \mathfrak{R}^5$ son los parámetros invariantes en el tiempo y t denota tiempo. Este modelo involucra 3 entradas: temperatura de hoja (T_l), humedad relativa (RH_l) y el PAR incidente (R). Entonces, el modelo propuesto para describir el proceso fotosintético debe de seguir la forma:

$$p(t) = a_1 p(t-1) + a_2 T_l + a_3 RH_l + a_4 \ln|R| + a_5 \quad (2)$$

donde $a=(a_1, a_2, a_3, a_4, a_5)$ es el grupo de parámetros invariantes en el tiempo a estimar. Para el proceso de calibración del modelo, el cual consistió en alternar parámetros para obtener un mejor ajuste entre los datos medidos y los simulados, se minimiza la suma de errores al cuadrado (E):

$$E(a) = \sum_{i=1}^n (\bar{y}(t_i, a) - \bar{y}(t_i))^2 \quad (3)$$

$$a^* = \arg \min E(a)$$

donde $\bar{y}(t_i, a)$ es la salida estimulada en el tiempo t_i , n es el número de mediciones, a es el grupo de parámetros a calibrar y a^* es el grupo de parámetros que reducen $E(a)$ al mínimo. En este proyecto, la minimización de la ecuación 3 se resolvió usando GAs.

La estructura fundamental de los GAs involucra el tipo de selección, la mutación, y operadores de apareamiento, aplicados a la búsqueda del valor óptimo de los parámetros a calibrar. Los tipos de operadores usados en los GAs para calibrar el modelo matemático aplicado a este documento fueron hechos siguiendo los pasos expuestos por Guzmán-Cruz *et al.* (2009, 2010). Aquí, el grupo de parámetros a está representado por una cadena de valores reales la cual

es necesaria para presentar una solución candidata a un problema. La selección de Padres es determinada a través de un torneo (Coello, 2007), el cual consiste de:

- a) Sortear los individuos de una población.
- b) Seleccionar 2 individuos y compararlos en base a su ajuste.
- c) El individuo con el mejor ajuste es el ganador del “torneo”.
- d) La población debe acortarse 2 veces para seleccionar a μ padres (donde μ es el tamaño de la población).

La recombinación se maneja en dos puntos, donde dos padres se consideran para generar dos hijos, cuyos puntos de cruce se escogen aleatoriamente (Coello, 2007). La mutación es no uniforme y aleatoria, de acuerdo con Michalewicz (1996). La selección de supervivencia es generacional y se usa para remplazar a la población base en edad. Los hijos vuelven a competir entre sí para generar nuevos padres, y así sucesivamente, hasta ajustar el modelo.

Para saber si el modelo era útil, la mitad de las mediciones fueron usadas para calibrar y el resto para validar el modelo.

3.3.6.2 Modelo determinista, o de caja blanca

La modelación matemática del proceso de fotosíntesis puede ser descrita mediante

$$y' = f(x, y, a, t) \quad (4)$$

Donde $x \in \mathcal{R}^3$ es el vector de variables de entrada, $a \in \mathcal{R}^5$ es el conjunto de parámetros invariantes en el tiempo y t denota el tiempo.

Debido a la estrecha relación que hay entre la humedad relativa (H_r) y la transpiración (T_r) de la planta se analizaron las tasas de cambio de ambas variables respecto a la radiación (r).

3.3.7 Programación del Dispositivo Electrónico:

Se generaron descripciones en lenguaje VHDL de los protocolos de comunicación con cada uno de los sensores seleccionados (Sensor de temperatura y humedad relativa, SHT71, Sensirion; Convertidor Programable de Luz a Frecuencia TSL230RD, TAOS; y Sensor Termopila Infrarrojo TMP006, Texas Instruments), según sus respectivas hojas de datos.

Se planteó el esquema general de la implementación del modelo matemático propuesto en un FPGA.

CAPÍTULO 4:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de alcances comerciales de los sensores.

- Del estudio de las capacidades y deficiencias de los sensores de fotosíntesis comerciales disponibles, se generó el artículo Espinosa-Calderon *et al.* (2011). En este artículo se da una descripción y se hace una comparación sobre los diferentes métodos para medir fotosíntesis que estén involucrados con principios ópticos de medición. De esta forma se comprobó que, aunque sí existían métodos que manejan el infrarrojo (IR), como por ejemplo la espectroscopía infrarroja y Raman (Asakawa and Tonokura, 2010), no había ninguno que utilizara termometría infrarroja, tal y como se propone en esta tesis. Después de revisar los métodos reportados por Millan-Almaraz *et al.* (2009), tampoco se detectó ningún método que tuviera como variable principal la temperatura de hoja, y que además fuese no invasivo. De esa manera se comprobó que este proyecto de tesis era viable y tendría un aporte científico.
- Sobre la experimentación con los sensores de fotosíntesis que presenten mejores características, se decidió utilizar los analizadores de gas, en este caso el Li-6400XT (LI-COR, 2004) por ser los más utilizados en el mercado, tanto comercial como científico (Millan-Almaraz *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010). Como método de comprobación del fenómeno que estábamos monitoreando, se seleccionó el de medición de rubisco por su certeza en la detección de fotosíntesis (Espinosa-Calderon *et al.*, 2012).
- Se desarrollaron drivers de comunicación entre los sensores de humedad relativa, temperatura ambiente, temperatura de hoja por IR y radiación solar, seleccionados.

4.2 Analizadores de espectro

Las gráficas arrojadas por cada uno de los analizadores se muestran en las figuras 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4. Los picos de absorción indican longitudes de onda que pueden ser significativas para alguna

medición no invasiva. La figura 4.1 muestra picos de absorción alrededor de las longitudes de onda de 400, 600, 1500 y 2000 nm. Los picos cercanos a los 400 y 600 nm (colores rojo y azul, respectivamente) reflejan la ya conocida absorción de las plantas en estas longitudes de onda (Taiz y Zeiger, 2010). Por otra parte, los picos cercanos a los 1500 y 2000 nm se deben a la presencia de agua en las muestras. Esto se puede comprobar en la figura 4.2, la cual muestra el espectro de absorción de agua simple. Incluso, esta gráfica muestra algunos valores de saturación en las mismas longitudes de onda antes mencionadas. Las mediciones de la figura 4.1 mayores a 2500 nm muestran saturación, muy probablemente por trabajar este equipo muy en el extremo de su rango.

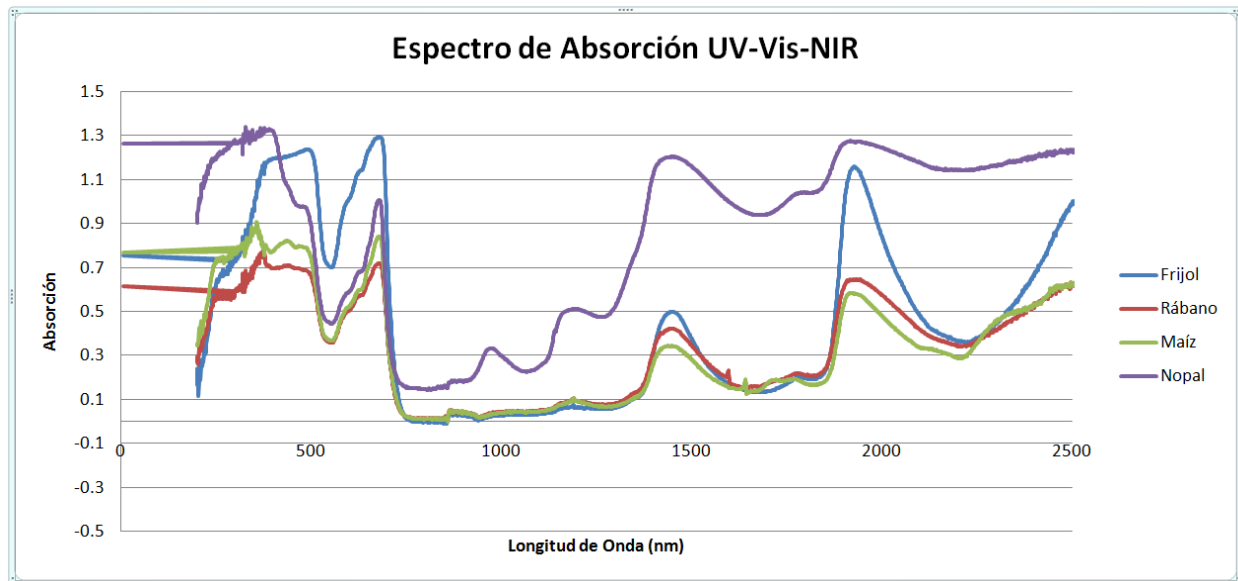


Figura 4.1 Espectro de absorción de plantas C3 (frijol y rábano), C4 (Maíz) y CAM (Nopal) generado por Analizador Perkin Elmer Instruments, LAMBDA 900, UV/Vis/NIR Spectrometer

El espectro IR mostrado en la gráfica 4.3 muestra algunos picos cercanos a 2400, 4400 y alrededor de 6400 nm. Los picos cercanos a 2400 nm son debidos a la presencia de agua en la muestra, de nuevo comprobado por la figura 4.2. También se puede comprobar al comparar las figuras 4.3 y 4.4, donde la diferencia fue el limpiar, o no, las muestras con un pañuelo húmedo. Los picos en longitudes de onda mayores a 1600 nm pueden también deberse a que se trabajó este equipo muy cerca del límite de su rango.

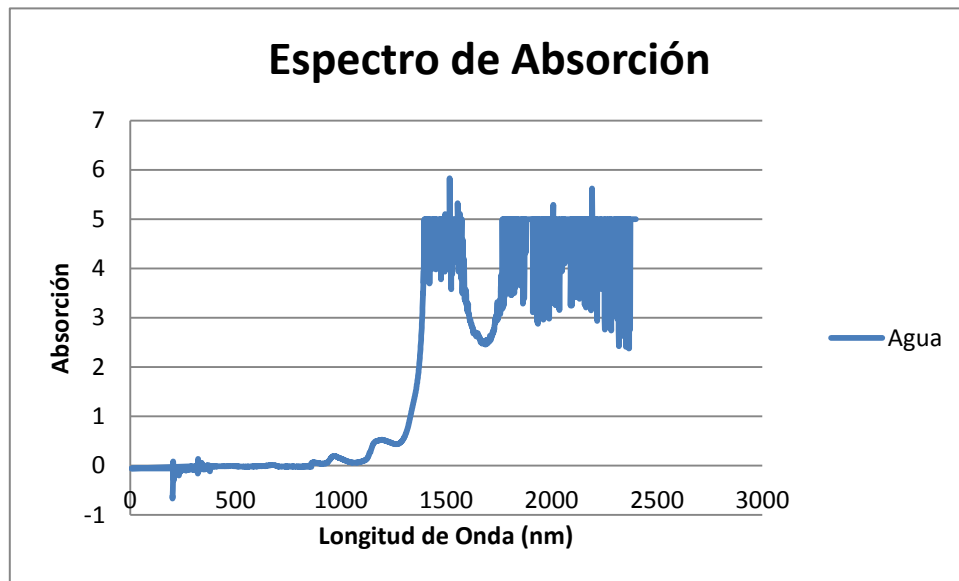


Figura 4.2 Espectro de absorción del agua, generado por Analizador Perkin Elmer Instruments, LAMBDA 900, UV/Vis/NIR Spectrometer

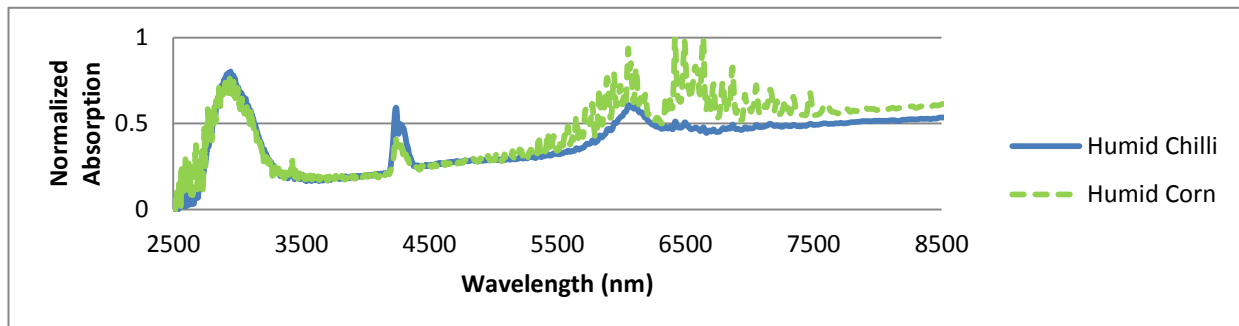


Figura 4.3 Espectro IR de absorción de plantas C3 (Chile), C4 (Maíz) con muestras limpiadas con pañuelo húmedo. Espectro generado por Analizador Perkin Elmer, Spectrum BX, FTIR System

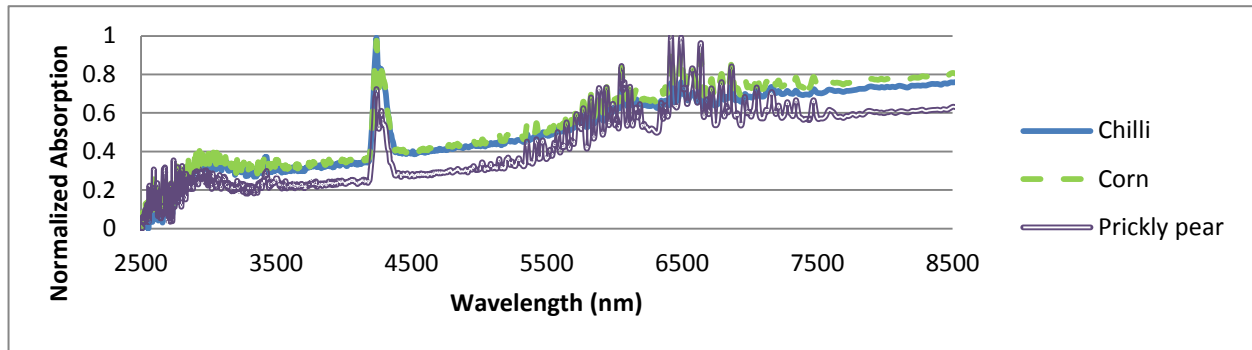


Figura 4.4 Espectro IR de absorción de plantas C3 (Chile), C4 (Maíz) y CAM (Nopal) con muestras NO limpiadas con pañuelo húmedo. Espectro generado por Analizador Perkin Elmer, Spectrum BX, FTIR System

Las absorciones entre 400 y 750nm mostradas en la figura 4.1 confirman que las plantas utilizan los colores azul y rojo (respectivamente) para la fotosíntesis. Los picos cercanos a los 1500 y 2400 nm, en las figuras 4.1 y 4.3, se deben al agua dentro de las muestras. El pico cerca de los 4200 nm, mostrado en la figura 4.3, parece ser un buen punto de referencia para mediciones IR en plantas, puesto que presenta una absorción distintiva con respecto a las otras longitudes de onda que lo rodean.

El pico cercano a los 2400 nm, mostrado en la figura 4.2, apareció solamente en muestras húmedas. Por esta razón se piensa que puede ser una buena referencia para medir humedad en planta de forma no invasiva.

La figura 4.5 no muestra picos de absorción en la zona entre 7 y 13.5 μm (espectro de trabajo de la cámara termográfica ThermoCAM FLIR). Esto confirma que la absorción de la planta no interferirá con las mediciones térmicas por IR de esta cámara.

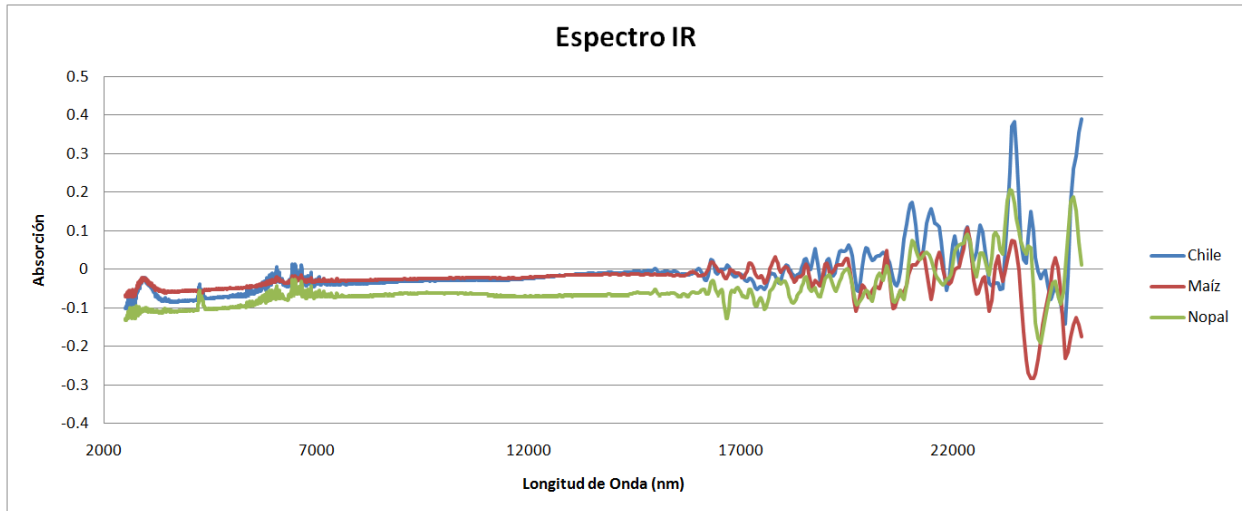


Figura 4.5 Espectro NIR y MIR de absorción de plantas C3 (Chile), C4 (Maíz) y CAM (Nopal).

Espectro generado por Analizador Perkin Elmer, Spectrum BX, FTIR System

4.3 Termografía óptica

En cada una de las fotos se analizaron las temperaturas de hojas jóvenes (llamadas hoja chica) y de hojas maduras (llamadas hoja grande). Del mapeo del comportamiento térmico dinámico de las plantas de luz hacia oscuridad, se obtuvo la figura 4.6 donde se observa la tendencia a aumentar su temperatura. Del mapeo del comportamiento térmico dinámico de las plantas de oscuridad hacia luz, se obtuvo la figura 4.7, donde se puede observar su tendencia a disminuir la temperatura de la planta.

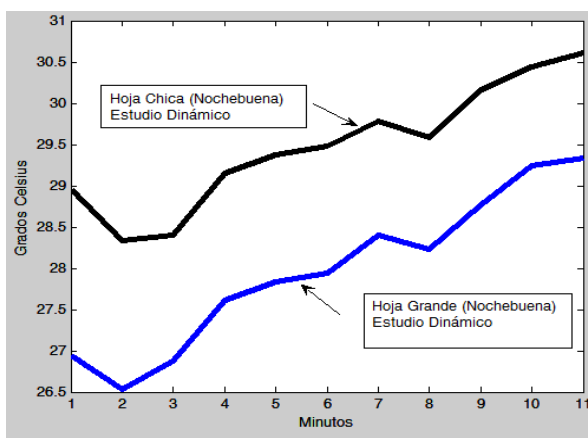


Figura 4.6 Comportamiento térmico dinámico de las plantas C3 de luz hacia oscuridad.

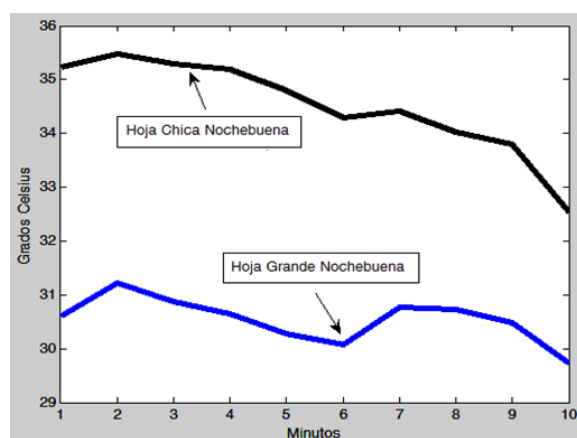


Figura 4.7 Comportamiento térmico dinámico de las plantas C3 de oscuridad hacia luz.

Las mediciones obtenidas en este experimento muestran una diferencia promedio entre las hojas jóvenes y maduras de 1.27°C durante la presencia de luz, y una diferencia promedio de 0.12°C entre las diferentes edades de hojas después de 10 minutos de oscuridad.

Los cambios de temperatura en las plantas debidos a la cantidad de luz a la que se encuentran éstas sometidas confirman lo reportado por Taiz y Zeiger (2010). También demuestran que el cambio térmico de la hoja dependiendo si está haciendo fotosíntesis o no, es medible por termometría infrarroja.

4.4 Analizador de Gases

Se utilizó un sensor de fotosíntesis comercial que trabajaba por el método de intercambio de gases. El dispositivo fue modelo Li-600 de la marca Licor.

4.4.1 Tiempo de estabilización de Fotosíntesis

Las observaciones durante esta parte del experimento indicaron que 5 minutos eran suficientes para que una planta se estabilizara su fotosíntesis para los incrementos de luz aplicados de 100 PAR. Este periodo de tiempo se mantuvo para las temperaturas de 23 y 33 °C. Este periodo de estabilización de 5 minutos fue utilizado para los experimentos de curvas de luz.

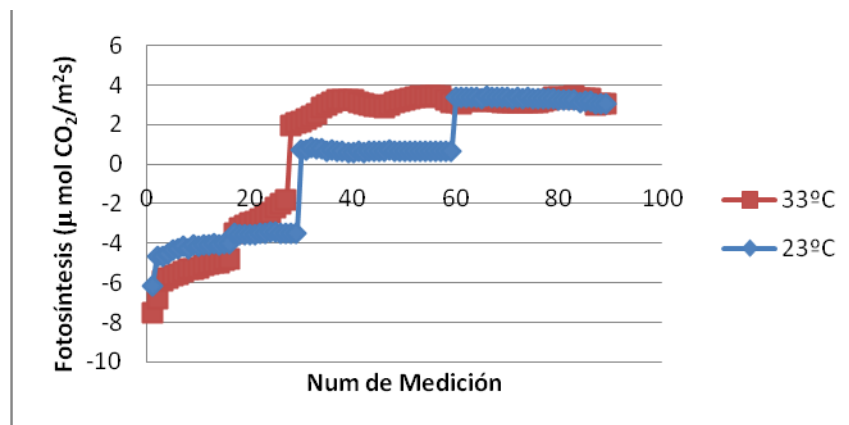


Figura 4.8 Estabilización de Fotosíntesis.

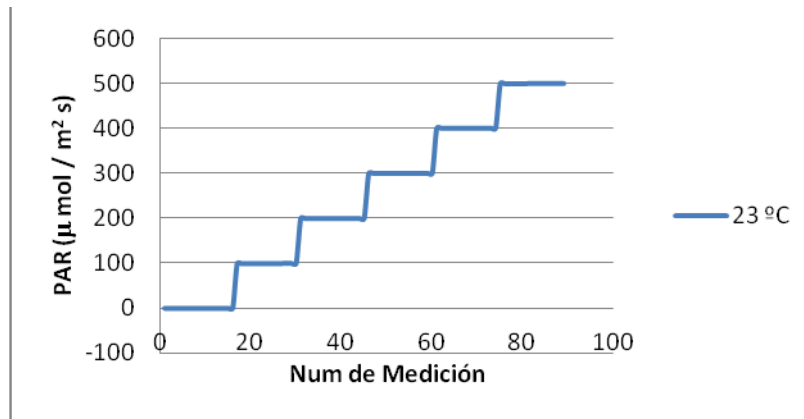
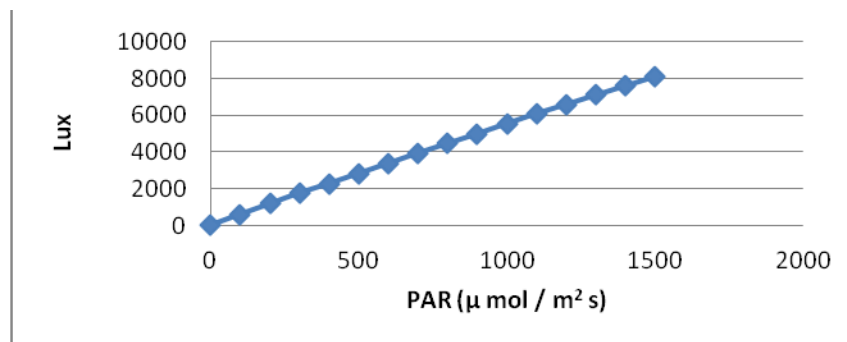


Figura 4.9 Incrementos de Radiación

4.4.2 Relación PAR – Lux

Puesto que el Licor emite PAR, es necesario saber a cuántos luxes equivales los PARES aplicados. Se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- Hacer una curva de luz sin hoja y con la cámara abierta.
- Colocar el luxómetro cerca de la lámpara del Licor.
- Comparar las mediciones de PAR con las del luxómetro.



4.10 Recta de conversión PAR a Lux.

Se encontró la siguiente relación entre Lux y PAR para esta particular fuente de radiación.

$$\text{Lux} = \text{PAR} * 5.642 \tag{4}$$

Hay que recordar que la luz PAR comprende longitudes de onda de 400 a 700 nm, y puede que su pico principal no coincida con el del luxómetro. La luz PAR emitida es de un color parecido al violeta, no blanca.

4.4.3 Curvas de Luz

¿Qué es una Curva de luz? Es un programa que cambia automáticamente los niveles de radiación de la lámpara y mide la fotosíntesis de la hoja a esos niveles.

La figura 4.11 muestra que, a bajas temperaturas (11°C) no hay fotosíntesis. Esta figura también muestra que a las temperaturas de 23 y 33 °C, el *Capsicum annuum* L. tiene los valores más altos de fotosíntesis. Este comportamiento confirma que estas plantas se desarrollan mayormente en áreas tropicales y subtropicales húmedas. Esta figura también muestra que a temperaturas ambiente muy altas (45°C) disminuye la fotosíntesis. Incluso las hojas se veían notablemente más flácidas. Entre 500 y 600 PAR las planta se foto-saturaron, es por esto que aunque no aumente la radiación, ya no lo hace la fotosíntesis.

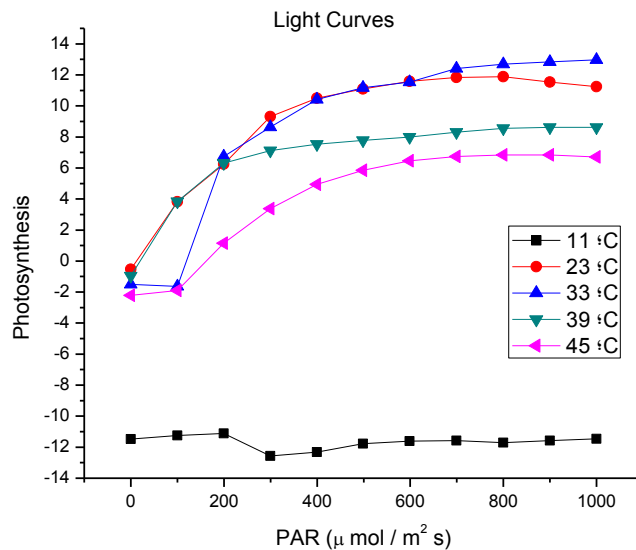
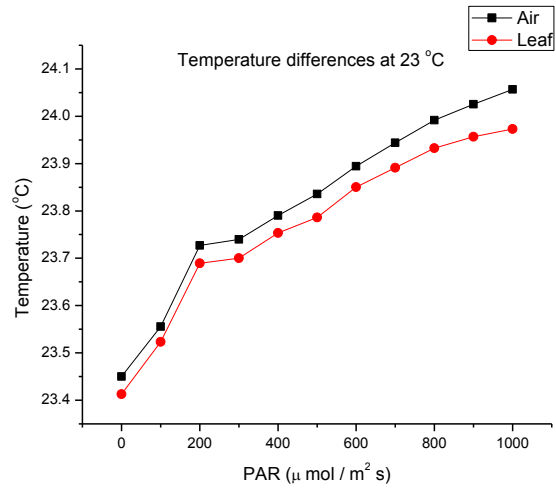
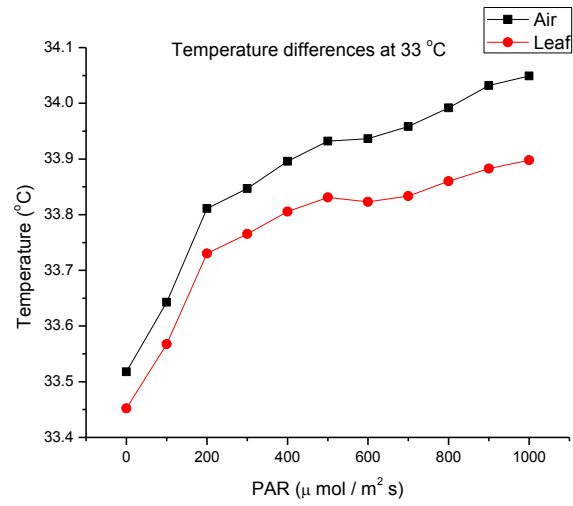


Figura 4.11 Curvas de luz a diferentes niveles de temperatura.

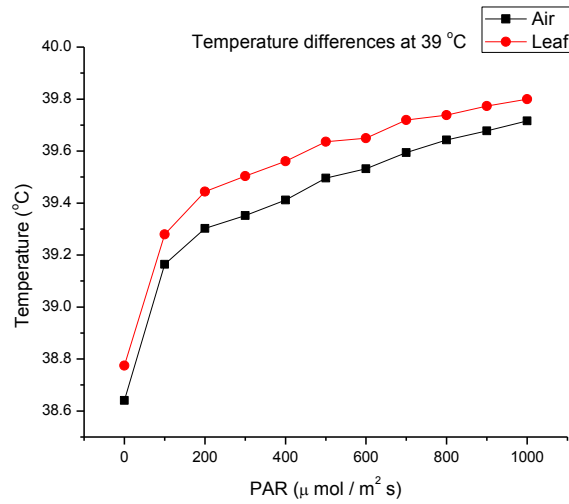
La figura 4.12 muestra que, a temperaturas de 23 and 33 °C (Figuras 4.12a y 4.12b, respectivamente), la temperatura del aire es mayor que la de hoja, mientras que a temperaturas de 39 y 45 °C (Figuras 4.12c y 4.12d, respectivamente) se observa el comportamiento opuesto.



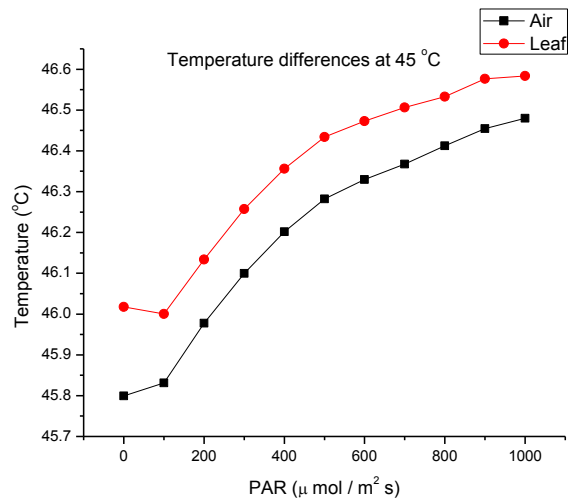
a) 23°C



b) 33°C



c) 39°C



d) 45°C

Figura 4.12. Diferencias entre temperatura de aire y de hoja a diferentes temperaturas del ambiente.

En la figura 4.11, la fotosíntesis dejaba de crecer alrededor de los 600 PAR, esto se debe a que la planta se fotosaturó. Sin embargo, la temperatura de la hoja sí continua aumentando con el aumento de radiación. Esto significa que la temperatura de hoja y la radiación no pueden ser las únicas variables relacionadas a la fotosíntesis. Es por esta razón que se decidió agregar la variable de humedad relativa.

4.4.4 Curvas de Referencia

La figura 4.11 muestra que los valores más altos de fotosíntesis son a las temperaturas ambiente de 23 y 33 °C. Entonces, la temperatura elegida para los experimentos de referencia fue 23°C.

Esta parte del experimento fue relajada para estudiar los efectos del dispositivo y la radiación en la muestra. La figura 4.13 confirma que no hay fotosíntesis en la ausencia de hoja. La figura 4.14 muestra que la lámpara del Li-6400XT no tiene efecto sobre la muestra. Las variaciones de temperatura en el punto de medición no están relacionadas con la cantidad de radiación aplicada.

Las figuras 4.13 y 4.14 confirman que no hay efecto de calentamiento de la lámpara del Li-6400XT en el punto de medición. La figura 5 muestra que la radiación por sí misma no tiene efecto sobre la muestra.

La figura 4.15 muestra que las plantas tratadas con SENCOR no tienen un comportamiento similar al de la figura 4.11. Esta diferencia entre comportamientos se debe a que el SENCOR está inhibiendo la fotosíntesis. Así se puede entender que sí existe una diferencia clara entre las curvas de temperatura de una hoja que está fotosintetizando y otra que no.

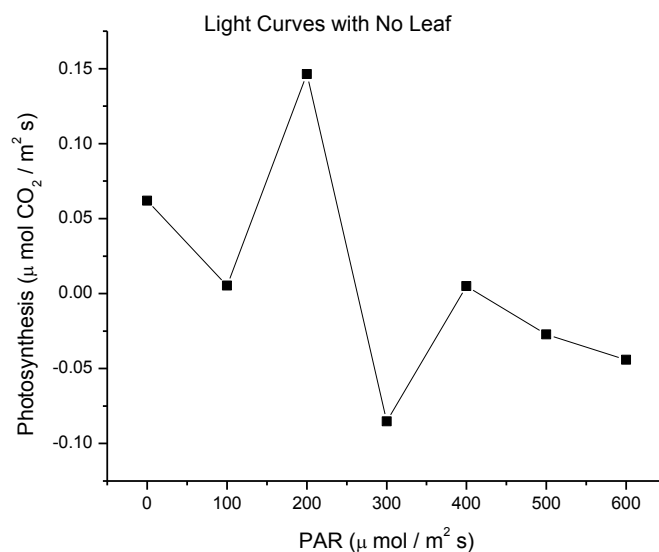


Figura 4.13. Curva de luz sin hoja.

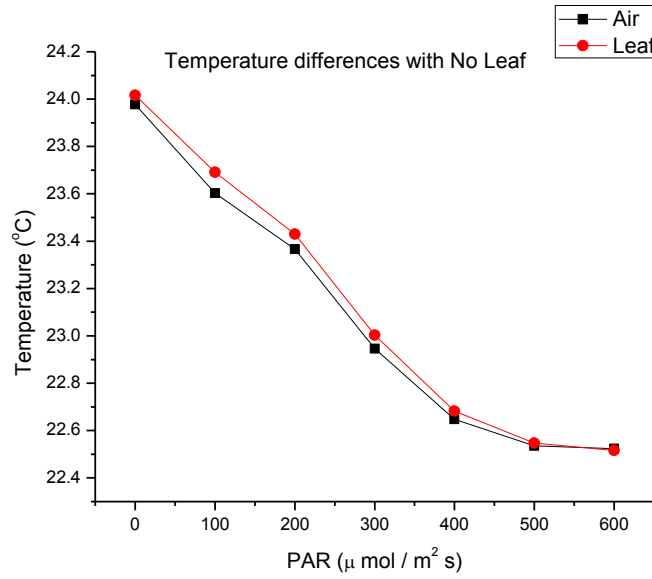


Figura 4.14. Diferencias entre la temperatura de aire y sensor de hoja, pero sin hoja.

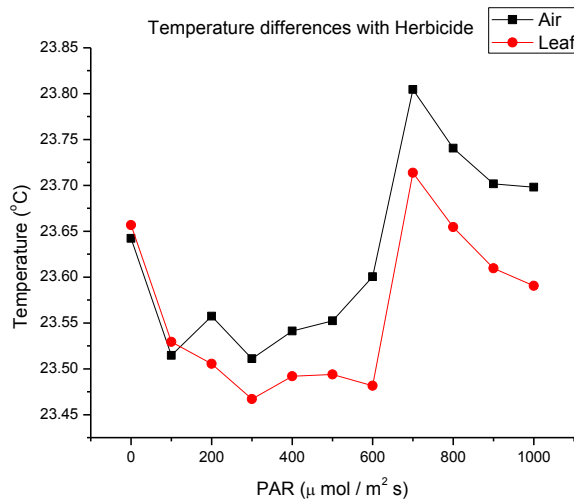


Figura 4.15. Diferencias entre la temperatura del aire y la de la hoja de una planta con herbicida.

4.5 Expresión de rubisco

La figura 4.16 muestra la masa de la rubisco expresada en el *Capsicum annuum* L. a dos diferentes temperaturas de aire y a tres diferentes niveles de radiación. La rubisco es la enzima clave del ciclo Calvin, y es un indicador bioquímico de la actividad del proceso fotosintético (Selesi *et al.*, 2007; Flexas *et al.*, 2006).

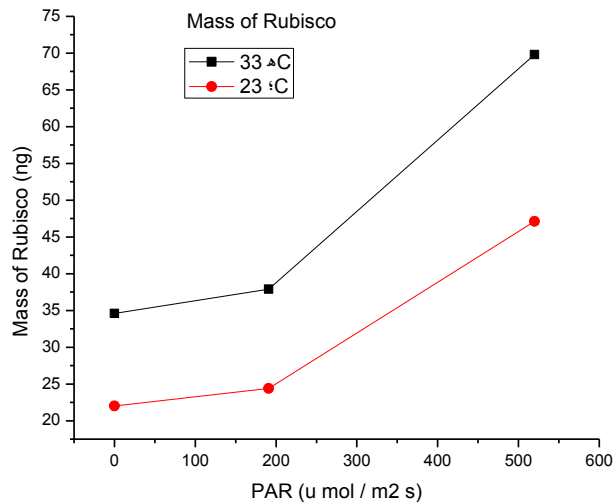


Figura 4.16. Masa de rubisco expresada en *Capsicum annum* L. a dos temperaturas de aire.

Entonces, el aumento en rubisco significa un aumento en fotosíntesis. De esta forma se comprueba lo que se observó en la figura 4.11, que al aumentar la radiación también lo hace la masa de rubisco, y por lo tanto la fotosíntesis. Otra similitud es que a 33°C hay una mayor expresión de rubisco, tal y como lo muestra la figura 4.11. Con este experimento se demuestra que a mayor radiación, hay mayor fotosíntesis (hasta el punto de foto-saturación); y a mayor fotosíntesis (hasta el punto de foto-saturación) hay mayor temperatura de hoja.

4.6 Generación del Modelo Matemático

4.6.1 Modelo caja negra, calibrado por algoritmos genéticos

Se propuso utilizar algoritmos genéticos para ajustar el modelo porque usan retroalimentación y tienen un considerable nivel de simplicidad (Guzmán-Cruz, 2010). Estos algoritmos siguen el siguiente algoritmo de la figura 4.17.

Un ajuste al modelo propuesto fue obtenido siguiendo la estructura de la ecuación 2 en combinación con el procedimiento de GAs mostrado por Guzman-Cruz *et al.* (2009, 2010). Este ajuste sí seguía la tendencia de las mediciones, sin embargo había una diferencia considerable entre los valores medidos y los calculados (figuras 4.18 a y b). Es por esta razón que se decidió añadir un valor más al modelo, un valor de ajuste de offset (Oa). Este Oa no afecta a los

coeficientes calibrados por los algoritmos genéticos, debido a que es un valor constante. La estructura propuesta del modelo matemático ajustado se muestra en la ecuación 5.

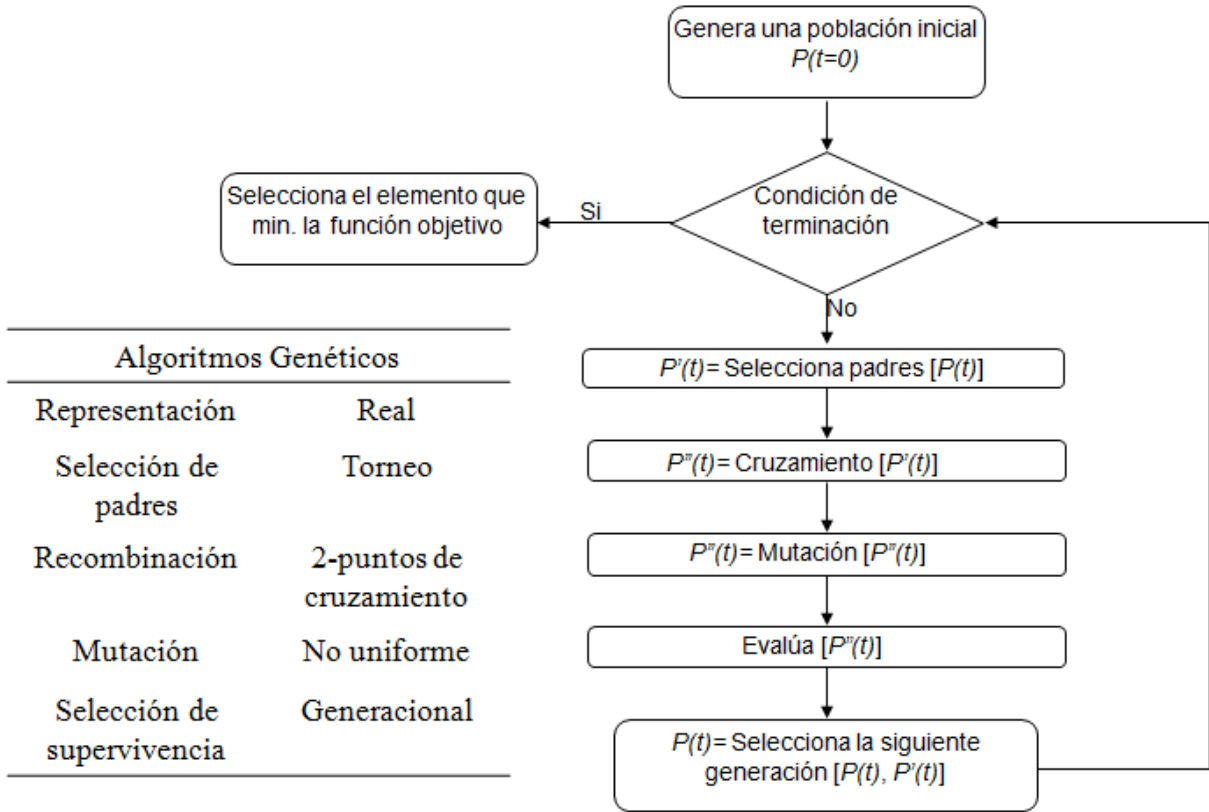


Figura 4.17 Diagrama de flujo de los algoritmos genéticos.

$$p(t) = a_1 p(t - 1) + a_2 T_l + a_3 RH_l + a_4 \ln|R| + a_5 + Oa \quad (5)$$

Donde:

ax : Grupo de parámetros a calibrar

p : Fotosíntesis

Tl : Temperatura de hoja

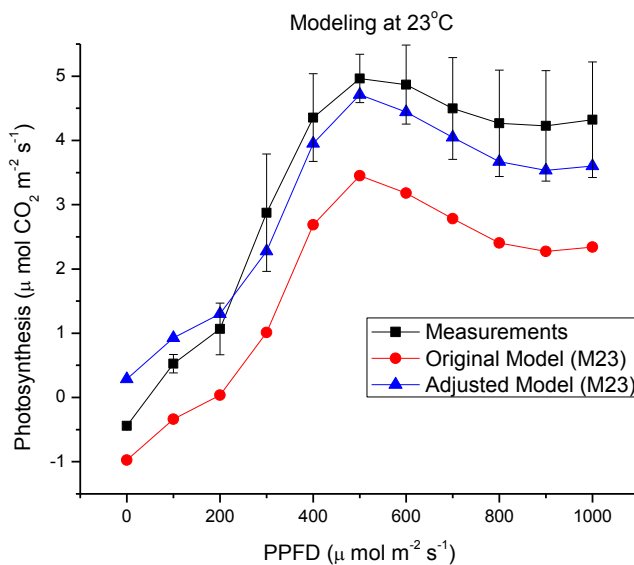
RHl : Humedad Relativa de hoja

R : Radiación PAR

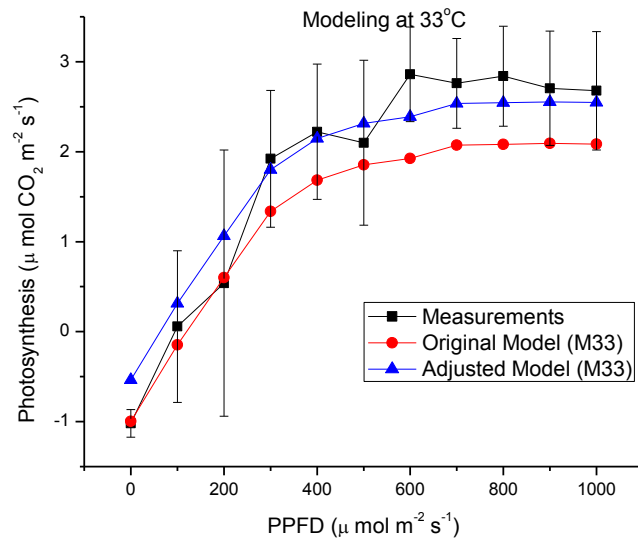
Oa : Ajuste de Offset

Las figuras 4.18.a y 4.18.b muestran la comparación entre los valores medidos, modelo original (ecuación 2) y el modelo ajustado (ecuación 5). Se observa cómo en ambos casos hay error conforme a los datos medidos, sin embargo, el error en la fotosíntesis calculada con el modelo ajustado llega a ser hasta 70% menor que el error con el modelo original.

Dada la propuesta del modelo matemático, los valores calibrados de éste a través de algoritmos genéticos se muestran en la Tabla 1. El grupo de parámetros a fue calibrado solamente para las temperaturas de 23 y 33 °C (M23 para 23°C y M33 para 33°C).



a)



b)

Figura 4.18 Comparación de Modelos propuestos contra mediciones.

Tabla 4.1 Valores calibrados de los parámetros del modelo de fotosíntesis.		
Parameter	M23	M33
a1	0.2059	0.2059
a2	-0.5065	-0.08284
a3	0.45091	0.17126
a4	0.3028	0.3028
a5	-0.1182	-0.1182
Oa	1.516988	0.46231

4.6.2 Modelo determinista, o de caja blanca

De forma paralela al modelo matemático de la ecuación 5, se generó un modelo determinista.

Debido a la estrecha relación que hay entre la humedad relativa (H_r) y la transpiración (T_r) de la planta se analizaron las tasas de cambio de ambas variables respecto a la radiación (r).

Para $T=23^\circ\text{C}$

$$\frac{dT_r(r)}{dr} \approx \alpha \frac{dT_h(r)}{dr} + \beta \frac{dH_r(r)}{dr}$$

donde $\alpha = -1.866 \times 10^{-5}$ $\beta = -1.046 \times 10^{-4}$

De tal manera que la transpiración puede ser descrita por

$$T_r(r) \approx \alpha T_h(r) + \beta H_r(r) + c_T = f_T(r)$$

Donde $c_T = 7.011 \times 10^{-4} - 8.948 \times 10^{-5} H_r(r_0)$

Además, se observó que la tasa de cambio de la fotosíntesis respecto a la radiación se relaciona con la temperatura del aire (T_a) y la transpiración (T_r) como sigue

$$\frac{dFot}{dr} \approx \phi \frac{dT_a}{dr} + \gamma \frac{d \ln|r|}{dr} + \lambda \frac{dT_r}{dr}$$

donde $\phi = 1.9456$, $\gamma = 0.1229$ y $\lambda = 5078.9463$

Así que, la fotosíntesis puede ser descrita por

$$Fot \approx \phi T_a(r) + \gamma \ln|r| + \lambda T_r(r) + c_F = f_p(r)$$

donde $c_F = 1.0101 - 1.9815 T_a(r_0)$

Análogamente, para $T=33^\circ\text{C}$

$$T_r(r) \approx \alpha T_h(r) + \beta H_r(r) + c_T = f_T(r)$$

donde $\alpha = 1.738 \times 10^{-5}$, $\beta = 1.686 \times 10^{-4}$ y $c_T = -9.768 \times 10^{-4} - 8.647 \times 10^{-5} H_r(r_0)$

$$Fot \approx \phi T_a(r) + \gamma \ln|r| + \lambda Trans(r) + c_F = f_p(r)$$

donde $\phi = 4.3856$, $\gamma = 0.1511$, $\lambda = 1769.3025$ y $c_F = -19.6193 - 3.7941 T_a(r_0)$

Finalmente, un modelo para describir el proceso de fotosíntesis puede ser planteado como sigue:

$$f_P(r) = \phi T_a(r) + \gamma \ln|r| + \lambda f_T(r) + c_F \quad (6)$$

$$f_T(r) = \alpha T_h(r) + \beta H_r(r) + c_T \quad (7)$$

donde

$$\phi = 0.244T_a(r_0) - 3.9104$$

$$\gamma = 2.8 \times 10^{-3}T_a(r_0) + 0.0552$$

$$\lambda = -330.9644T_a(r_0) + 13022.0914$$

$$c_F = \begin{cases} 1.0101 - 1.9815T_a(r_0), & T_a = 23 \\ -19.6196 - 3.7941T_a(r_0), & T_a = 33 \end{cases}$$

$$\alpha = 3.604 \times 10^{-6}T_a(r_0) + 1.051 \times 10^{-4}$$

$$\beta = 6.4 \times 10^{-6}T_a(r_0) - 4.9 \times 10^{-5}$$

$$c_T = \begin{cases} 7.011 \times 10^{-4} - 8.948 \times 10^{-5}T_a(r_0), & T_a = 23 \\ -9.768 \times 10^{-4} - 8.647 \times 10^{-5}T_a(r_0), & T_a = 33 \end{cases}$$

La figura 4.19 muestra que el modelo determinista sí sigue la tendencia marcada por los datos medidos.

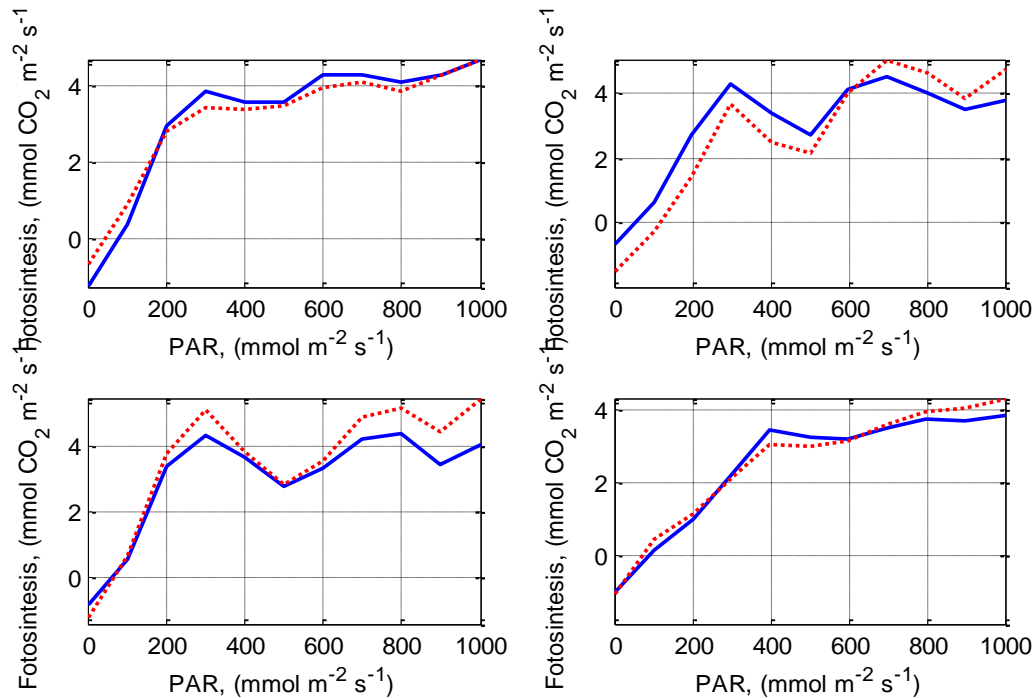


Figura 4.19 Comparación de método determinista (línea punteada) contra valores medidos (línea continua).

4.7 Programación de Drivers de sensores

La tabla 2 muestra las variables a medir y los sensores seleccionados para medirlas. Estos sensores fueron seleccionados por sus características técnicas y sus salidas digitales. Los protocolos de comunicación para tomar las lecturas de cada sensor fueron descritos en el lenguaje de programación VHDL para, posteriormente, ser interpretados por el FPGA.

Tabla 4.2 Variables a medir y sensores propuestos a utilizar	
Variable	Sensor
Temperatura ambiente	SHT71, Sensirion
Humedad Relativa	SHT71, Sensirion
Radiación Solar	Convertidor de Luz a Frecuencia TSL230RD, TAOS
Temperatura de hoja	Termopila Infrarroja TMP006, Texas Instruments

4.7.1 Protocolo I2C

Debido a sus tablas de datos, el sensor de temperatura y humedad relativa sensirión SHT71, y la termopila infrarroja TMP006, tienen protocolos de comunicación muy similares (I2C), por lo que ambos comparten esta explicación.

El Bus I2C (Inter- Integrated Circuits) fue desarrollado por Philips al principio de los 80's. Es un bus bidireccional basado en dos hilos por el que se trasmiten los datos vía serie y lo llamó.

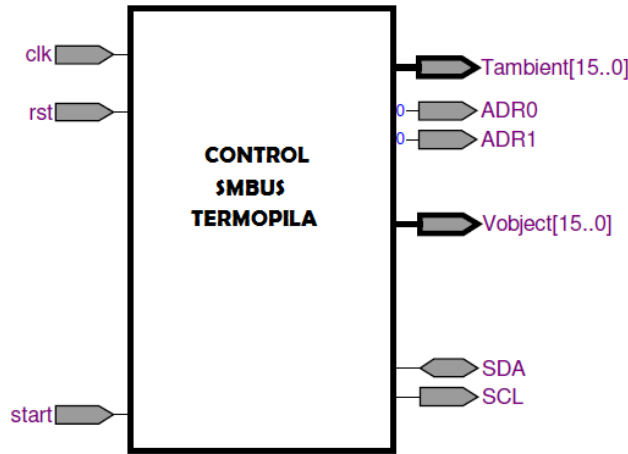


Figura 4.20 Entradas y salidas generales de un módulo de comunicación I2C

Este protocolo cuenta con una base de tiempo, la cual cuenta los pulsos que recibe en la variable clk y al llegar al valor de la variable K manda un pulso a la velocidad deseada.

El contador que utiliza es módulo 10, ya que, como la máquina de estados sólo envía un byte de datos y un bit de acknowledge por cada vez que se ejecuta, se tiene que repetir este proceso varias veces. Para esto se cuenta cuántas veces se ha ejecutado el proceso. Para este dispositivo se necesita repetir 10 veces el proceso para la dirección del dispositivo y 10 para el registro a leer.

La máquina de estados para el control de comunicación de I2C se encarga de controlar la señal de reloj con el protocolo de la comunicación con el sensor. Así como el bit que se envía cada cierto tiempo, también lleva la entrada de las cuentas para saber cuándo se tiene que detener al recibir las cuentas del contador módulo 10. Además controla el corrimiento del registro serial-paralelo.

Según el estado del contador modulo 10, el multiplexor selecciona la trama que se va a mandar siguiendo los siguientes pasos:

- Dirección del esclavo en forma de escritura
- Registro a leer
- Dirección del esclavo
- Dirección de esclavo en forma de lectura
- Alta impedancia (recibir primeros 4 bits del reg1)
- Alta impedancia (recibir segundos 4 bits del reg1)
- Manda la dirección del registro a leer
- Configura al esclavo en modo leer
- Alta impedancia (recibir primeros 4 bits del reg2)
- Alta impedancia (recibir segundos 4 bits del reg 2)

Mientras tanto, un comparador hace uso de la señal de la cuenta, para habilitar los diferentes registros según la cuenta:

- Registro 0 y 1: Parte más y menos significativa de la primer lectura
- Registro 2 y 3: Parte más y menos significativa de la segunda lectura

La máquina de estados le indica a un multiplexor 8 a 1 qué bit tiene que mandar al puerto de SDA para el protocolo de comunicación

Otro multiplexor, ahora de 2 a 1 se encarga de mandar un “0” o alta impedancia por el puerto SDA tomando en cuenta la señal dada del multiplexor 8_1

El registro de corrimiento toma los datos de forma serial y los coloca en arreglos de 8 bits. En este registro, la variable SH1 es la encargada de controlar el corrimiento de bits por medio de la máquina de estados.

En el caso de la termopila, también está otro registro que almacena los valores de las lectura del sensor. Los registros 0 y 1 almacenan el primer registro (temperatura del objeto) y los segundos, 2 y 3, el segundo registro (temperatura ambiente), controlados por el las cuentas del comparador para escribir en los registros correspondientes. Al final los concatena para entregar ambas lecturas en variables de 16 bits.

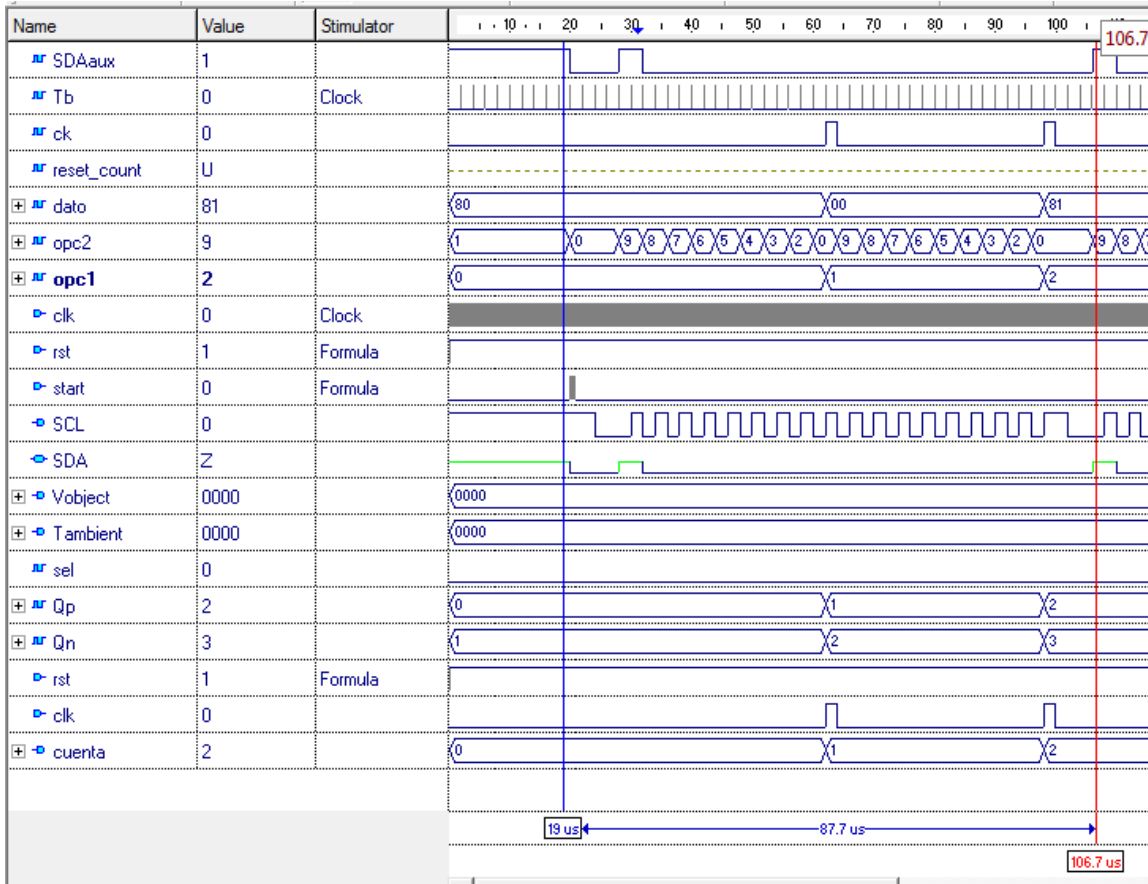


Figura 4.21 Simulación del protocolo I2C.

En la figura 4.21, a partir de la señal de inicio se manda la condición de inicio de comunicación con el dispositivo seguido de la dirección del esclavo en modo escritura, la cual para el caso es “10000000”, siendo el bit menos significativo lo que define que es el modo escritura “0”. Después de enviar la trama de datos anterior se esperaría una señal de reconocimiento del sensor la cual nos indica que la comunicación se realizó de forma exitosa. Después de esta señal se procede a enviar la dirección del registro que va a ser leído, para este caso es el registro “00h”, y se repite 10 veces, hasta obtener todos los datos de los registros leídos.

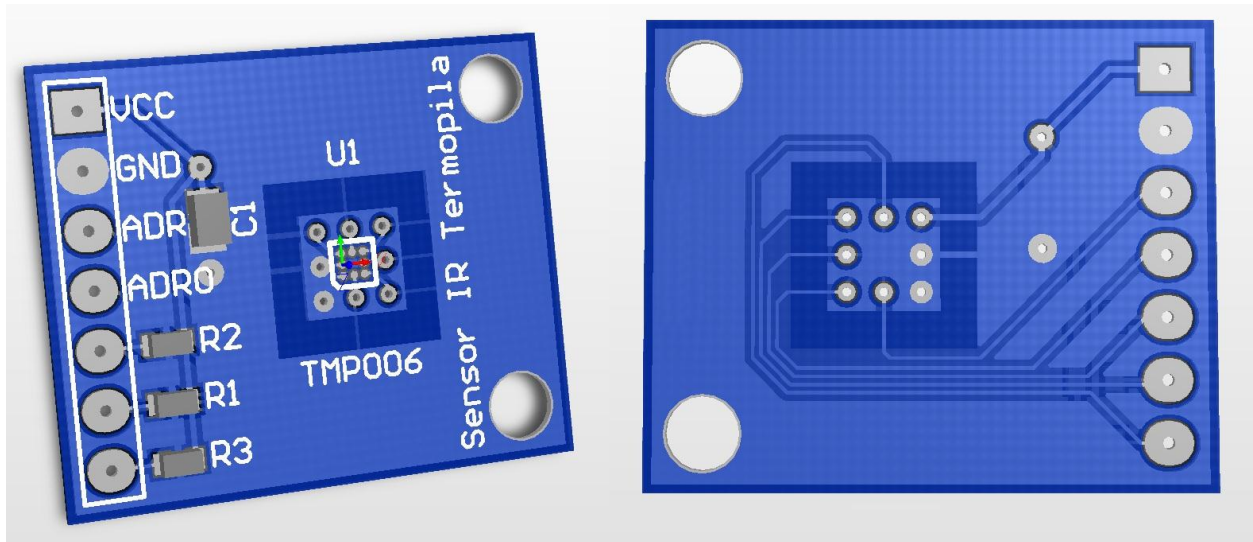


Figura 4.22 Tarjeta para termopila.

4.7.2 Frecuencímetro

Puesto que el TAOS TSL230RD es un Convertidor de Luz a Frecuencia, fue necesario diseñar un frecuencímetro para calcular la radiación incidente.

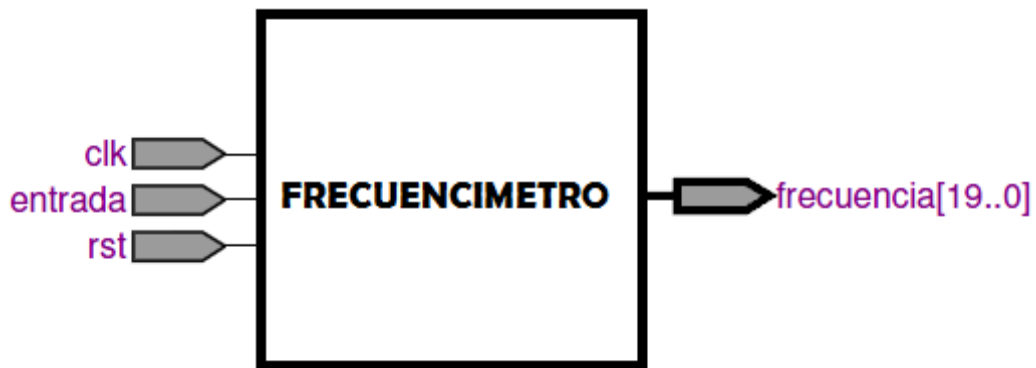


Figura 4.23 Entradas y salidas generales de un módulo de frecuencímetro.

Este módulo recibe una señal cuadrada proveniente del sensor y cuenta el número de pulsos de un reloj de 50 MHz, mientras la señal del sensor está en alto.

Una máquina de estados controla el almacenamiento de los datos de la frecuencia en el registro, después limpia el registro y reinicia el contador, para poder obtener una nueva lectura.

Un contador módulo 10 cuenta cuando está en estado alto la entrada del sensor y se limpia cuando la entrada se encuentra en estado bajo.

Un registro simple, a base de un flip –flop tipo D, controlado por la máquina de estados almacena el valor del contador.

Finalmente, un módulo divisor recibe las cuentas de pulsos y hace la operación aritmética necesaria para obtener una salida en Hz.

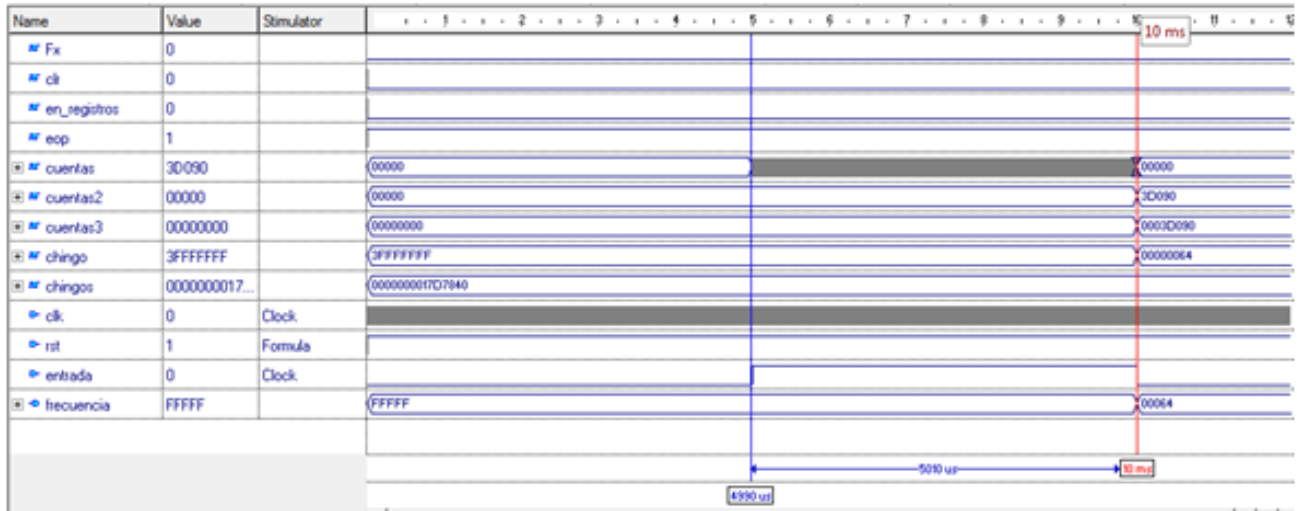


Figura 4.24 Simulación del frecuencímetro.

En la salida se puede observar cómo, mientras la entrada está en alto, el contador comienza a contar el tiempo que ésta permanece en alto, hasta que se encuentra con el flanco de bajada. Una vez encontrado el flanco de bajada se activa la máquina de estados, se activa el registro y se reinicia el contador. Al tiempo que limpia los registros comienza el proceso de la división.

4.8 Implementación del algoritmo matemático.

Una vez obtenidas las diferentes mediciones, tuvieron que procesarse siguiendo el algoritmo matemático obtenido. El diagrama a bloques que se sugiere para este algoritmo se muestra a continuación:

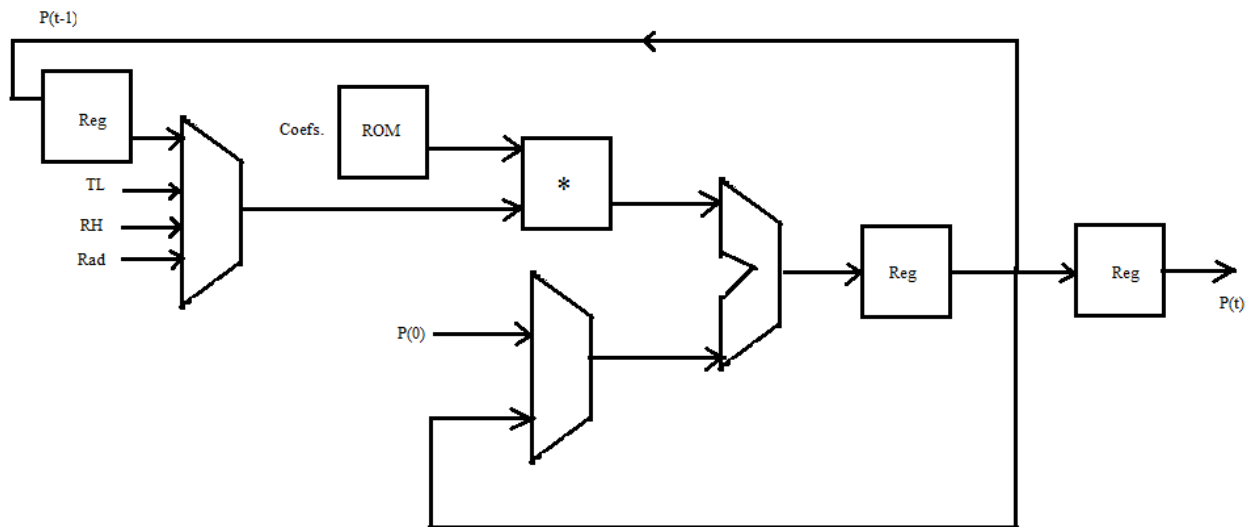


Figura 4.25 Diagrama a bloques sugerido para el módulo del algoritmo de caja negra.

Este módulo toma todas las mediciones provenientes de los sensores. Una máquina de estados selecciona una a una las variables a través de un multiplexor, para que se procesen y se guarden en un registro. Puesto que este modelo contempla una fotosíntesis anterior $P(t-1)$, entonces el módulo tiene un registro para ir guardando las fotosíntesis anteriores en cada caso. Así mismo, el módulo también cuenta con una fotosíntesis anterior fija para la primera medición que se haga. Se propone que esta fotosíntesis anterior fija inicial sea igual a cero.

Este módulo tiene la ventaja de que se puede variar muy sencillamente el tiempo de muestreo, para ajustarlo al óptimo, a través de una base de tiempo. También permite las mediciones iterativas para amortiguar valores singulares erróneos.

CAPÍTULO 5:

CONCLUSIONES

- La revisión del estado del arte muestra que todos los métodos de medición de fotosíntesis que existen tienen dentro de sus desventajas el ser invasivos, destructivos, exclusivos para laboratorio, o dependientes de sofisticados sistemas satelitales. Además ninguno está basado en la medición infrarroja de temperatura de hoja, como una de las variables principales relacionadas al proceso fotosintético.
- La caracterización óptica por analizadores de espectro muestra que hay rangos de longitudes de onda donde los picos de absorción de las hojas se superponen para los diferentes tipos de plantas C_3 , C_4 y CAM. Esta superposición abre la posibilidad de que hojas de diferentes plantas tengan respuestas similares ante las mismas señales ópticas de excitación. Estos picos pueden ser útiles para la detección de: nivel de nutrición, propiedades bioquímicas, estudios fisiológicos, salud del cultivo, detección de enfermedades, y predicción de la producción. Además, muestra que la absorción óptica de las hojas sólo coincide con el infrarrojo mediano (MIR, 4 a 14 μm) (Waynant y Ediger, 2000) en el rango de 4 a 7 μm , aproximadamente. Esto quiere decir que no interfiere demasiado con el espectro de medición de temperatura por infrarrojo (IR), usualmente en el MIR. Ver figura 4.5.
- Los cambios de temperatura de hoja en las plantas debidos a la cantidad de luz a la que se encuentran éstas sometidas (figuras 4.6 y 4.7) confirman lo reportado por Taiz y Zeiger (2010). Ellos exponen que luz y temperatura de hoja son algunos de los principales factores a considerar para medir la fotosíntesis. Son el primer indicio de que la fotosíntesis y la temperatura de hoja están relacionadas, y sus diferenciales son detectables a través de termometría óptica.
- Los experimentos realizados a través del analizador de gases confirman que hay una relación directa entre temperatura de hoja, humedad relativa de hoja, radiación incidente

- y fotosíntesis, hasta que se alcanza el punto de foto-saturación. Esta relación ha sido confirmada por dos métodos: análisis de gases, el principio más utilizado para la medición de fotosíntesis en producción comercial e investigación (Espinosa-Calderon *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2007); y expresión de rubisco, el indicador bioquímico más importante de actividad fotosintética (Zhang *et al.*, 2007; Taiz and Zeiger, 2010; Selesi *et al.*, 2007; Flexas *et al.*, 2006). Puesto que todas estas variables pueden medirse sin tener contacto físico con la planta, se concluye que sí posible estimar la fotosíntesis en *Capsicum annuum* L. basándose en mediciones no invasivas de variables como temperatura de hoja, temperatura ambiente, humedad relativa y radiación.
- Se ha demostrado que los algoritmos genéticos son técnicas efectivas, eficientes y útiles para la calibración de parámetros en modelos matemáticos, en este caso el de caja negra. Y, que además el modelo ajustado propuesto tienen una precisión suficiente para aplicaciones en biosistemas.
 - También se ha generado un modelo matemático determinista que es más exacto que el modelo matemático de caja negra. Esta aseveración se basa en que el modelo de caja negra requirió de un ajuste de offset (Oa) para disminuir su error, y no así el modelo determinista.
 - Ambos modelos reportados en este documento están basados en temperatura de hoja, humedad relativa de hoja y radiación incidente. Estos modelos representan nuevos métodos para inferir fotosíntesis, así como una nueva oportunidad para el diseño y desarrollo de algoritmos de control. Además, ambos modelos son susceptibles de ser enriquecidos al aumentarles otras variables, como por ejemplo humedad del suelo.
 - Se generaron drivers de comunicación entre el FPGA y los sensores de variables como: temperatura de hoja, humedad, temperatura ambiente y radiación. También se propuso una forma de implementar el modelo matemático de caja negra en el mismo FPGA. Esto podrá ser utilizado como un sistema no invasivo de medición de fotosíntesis.

- Los experimentos reportados en esta tesis siguen una metodología para estimar la fotosíntesis basada en principios ópticos que permitan medir de una manera no invasiva variables relacionadas con dicho proceso.
- Los resultados generados por esta tesis demuestran que las plantas no están a cargo, únicamente, de la producción de oxígeno, alimentos, medicamentos, bebidas, textiles, fibras, tintes, etc.; sino que también sirven como termostatos del mundo, los cuales ayudan a regular el clima del planeta. Entonces, se vuelve un importante reto el descubrir cuántas más variables y cómo se relacionan éstas con estos complejos seres vivos.

5.1 Trabajo a futuro

- Se propone la realización de experimentos a temperaturas ambientes entre 23 y 33°C para analizar las aportaciones de variables como temperatura de hoja, humedad relativa de hoja, radiación incidente y respuesta fotosintética. De esta forma se podrá intentar generar un modelo de fotosíntesis más completo.
- Hasta el momento sólo se han realizado mediciones en *Capsicum annuum* L., pero debido a otras mediciones preliminares que se han hecho, se espera que otras plantas tipo C₃ presenten resultados similares. Además, puesto que la temperatura óptica de cada planta puede variar según la especie, el ecotipo, las condiciones de crecimiento, factores genéticos, lugar de estudio, etapa del año, etc. (Bernacchi et al., 2009); es necesario hacer más estudios similares a este para generar nuevos modelos matemáticos.
- Estos modelos podrán ser integrados a modelos fisiológicos para el control y fitomonitorio en invernaderos, así como para el desarrollo de dispositivos electrónicos no invasivos para la medición de este importante proceso fisiológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Ageev B., Ponomarev Y. and Sapozhnikova V., Laser Photoacoustic Detection of CO₂ in Old Disc Tree-Rings, *Sensors*, **10**, 3305-3313, 2010.
- Agrawal, G.P., 2002, Fiber-optic communication systems. Editorial Wiley New York. Estados Unidos de América. 1, 56-57.
- Asakawa, T., K. N. and Tonokura, K. (2010). Diode Laser Detection of Greenhouse Gases in the Near Infrared Region by Wavelength Modulation Spectroscopy: Pressure Dependence of the Detection Sensitivity. *Sensors*, 10:4686–4699.
- Bayer CropScience, Sencor 480 SC, Hoja de datos de seguridad. Monheim, Alemania, 2008.
- Bernacchi, C., Rosenthal, D., Pimentel, C., Long, S., and Farquhar, G. (2009). Modeling the temperature dependence of C₃ photosynthesis. *Photosynthesis in silico*, pages 231–246.
- Bidwell, R.G.S. 1990. Fisiología vegetal. A.G.T. Editor, S.A. México. 784 p.
- Blackman F.F. and Matthaei G.L.C., Experimental Researches in Vegetable Assimilation and Respiration. IV.--A Quantitative Study of Carbon-Dioxide Assimilation and Leaf-Temperature in Natural Illumination. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, **76** (511), 402-460, 1905.
- Chung W. and Chen Ch., Evaluation of Performance and Uncertainty of Infrared Tympanic Thermometers, *Sensors*, **10**, 3073-3089, 2010.
- Coello, C. (2003). Introducción a la computación evolutiva. Ediciones CINVESTAV-IPN. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Damm A., Elber J., Erler A., Giolis B., Hamdi K., Hutjes R., Kosvancova M., Meroni M., Miglietta F., Moersch A., Moreno J., Schickling A., Sonnenschein R., Udelhoven T., Van der Linden S., Hostert P. and Rascher U., Remote sensing of sun-induced fluorescence to improve modeling of diurnal courses of gross primary production (GPP), *Global Change Biology*, **16**, 171–186, 2010.
- Delieu, T., and Walker D.A.: An improved cathode for the measurements of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. – *New Phytologist*. **89**: 165–175, 1972.
- Delieu, T. and Walker D.A.: Polarographic Measurement of Photosynthetic Oxygen Evolution by Leaf Discs. *New Phytol.* **89**, 165-178, 1981.
- Espinosa-Calderon A, Torres-Pacheco I, Padilla-Medina J A, Osornio-Rios R A, Romero-Troncoso R J, Villaseñor-Mora C, Rico-Garcia E, and Guevara-Gonzalez R G, Description of

- photosynthesis measurement methods in green plants involving optical techniques, advantages and limitations. *African Journal of Agricultural Research*, **6** (2011) 2638–2647.
- Espinosa-Calderon A., Torres-Pacheco I., Padilla-Medina J.A., Chavaro-Ortiz R.M., Xoconostle-Cazares B., Gomez-Silva L., Ruiz-Medrano R., Guevara-Gonzalez R.G., Relationship between leaf temperature and photosynthetic carbon in *Capsicum annuum* L. in controlled climates, *Journal of Scientific and Industrial Research*, **71** (2012), pp. 528-533.
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Bota J, Galmés J, Henkle M, Martínez-Cañellas S, and Medrano H, Decreased rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist*, **172** (2006) 73–82.
- Guzmán-Cruz, R. (2010). Algoritmos Evolutivos para la estimación de parámetros del modelo climático de un invernadero. PhD thesis, Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- Guzmán-Cruz, R., Castañeda-Miranda, R., García-Escalante, J., López-Cruz, I., Lara-Herrera, A., and de la Rosa, J. (2009). Calibration of a greenhouse climate model using evolutionary algorithms. *Biosystems Engineering*, **104**(1), 135–142.
- Hodson, M.J., White, P.J., Mead, A., Broadley, M.R.: Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. - *Annals of Bot.* **96**(6): 1027, 2005.
- Hoffmann, J., Ellingwood, C., Bonsu, O., and Bentil, D. (2004). Ecological model selection via evolutionary computation and information theory. *Genetic Programming and Evolvable Machines*, **5**(2), 229–241.
- González-Pérez J L, Espino-Gudiño M C, Torres-Pacheco I, Guevara-González R G, Herrera-Ruiz G, and Rodríguez-Hernández V, Quantification of virus syndrome in chili peppers. *African Journal of Biotechnology*, **10** (2011) 5236–5250.
- Gruner, K.: Principles of Non-Contact Temperature Measurement. RAYTEK. Santa Cruz, CA, USA. 2003.
- Hermant, J.P., Nascetti, P., Cinelli, F.: Inversion of acoustic waveguide propagation features to measure oxygen synthesis by *Posidonia oceanica*. - OCEANS '98 Conf. Proc. **2**: 919-926, 1998.
- Hill, D.W., Powell, T.: Non-dispersive infrared gas analysis in science, medicine and industry. - Adam Hilger Ltd, London. 1968.
- Hoon S., Thomas A. and Linton P., The Design and Development of a Closed Chamber for the *in-situ* Quantification of Dryland Soil Carbon Dioxide Fluxes, *Geographical Research*, **47**(1):71–82, March 2009.

- Hunt, S.: Measurements of photosynthesis and respiration in plants. - *Physiologia Plantarum*. **117**: 314–325, 2003.
- Jin R, Pan J, Xie H, Zhou B, and Xia X, Separation and quantitative analysis of capsaicinoids in chili peppers by reversed-phase argentation Ic. *Chromatographia*, **70** (2009) 1011–1013.
- Kawachi, N., Sakamoto, K., Ishii, S., Fujimaki, S., Suzui, N., Ishioka, N.S., Matsushashi, S.: Kinetic analysis of carbon-11-labeled carbon dioxide for studying photosynthesis in a leaf using positron emitting tracer imaging system. - *IEEE Trans. on Nucl. Sci.* **53**(5): 2991-2997, 2006.
- Lambda 800/900 *User's Guide* (PerkinElmer Instruments LLC, 2001).
- Li M, Hou G, Yang D, Deng G, and Li W, Photosynthetic traits of carex cinerascens in flooded and nonflooded conditions. *Photosynthetica*, **48** (2010) 370–376.
- LI-COR. Using the LI-6400, Portable Photosynthesis System, 2004. Technical Information.
- Long, S.P., Bernacchi, C.J.: Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. - *Journal of Experimental Botany*. **54**(392):2393-2401, 2003.
- Long, S.P. y Hallgren J.-E., 1987. Medición de la asimilación de CO₂ por las plantas en el campo y el Laboratorio. En técnicas en Fotosíntesis y Bioproduktividad (eds. Coombs, J., Hall, D., Long, S. y J. Scurlock). Editorial Futura. México. 2a edición.
- Michalewicz, Z. (1996). Genetic algorithms+ data structures. Springer.
- Millán-Almaráz, J.R., Guevara-González R.G., Romero-Troncoso R.J. and Torres-Pacheco I., Photosynthesis measurement techniques: A way to phytomonitoring, *En Revisión por el African Journal of Biotechnology*, 2009.
- Montes-Hernández S, Heredia-García E, and Aguirre-Gómez J, Fenología del cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.). Mejoramiento y Recursos Genéticos, *Breeding and Genetic Resources*, (2004) 43-48 pp.
- Nobel, P. 1991. *Physiochemical and enviromental plant physiology*. Academic Press, Inc.
- Oliosio, A., Chauki, H., Wignerón, J.-P., Bergaoui, K., Bertuzzi, P., Chanzy, A., Bessemoulin, P., Clavet, J.C.: Estimation of energy fluxes from thermal infrared, spectral reflectances, microwave data and SVAT modeling. – *Phys. and Chem. of the Earth, Part B*. **24**(7): 829-836, 1999.
- Ramírez-Meraz M, Descripción de variedades e híbridos de Chile Desarrolladas por el INIFAP en el Campo Experimental Sur de Tamaulipas. *Catálogo de Variedades*, (2010).

- Romero-Troncoso, R. de J. 2007. *Electrónica Digital y Lógica Programable*. 1ra. edición. Ed. Universidad de Guanajuato. ISBN: 968-864-449-8.
- Salisbury, F. y Ross C., 1994. *Fisiología vegetal* (ed. Salisbury, F. y C. Ross). Grupo Editorial Iberoamericano. 759 p. Scholander, P.F., Hammel, H., Bradstreet, E. y H. Hemmingsen. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science*. 148: 339-346.
- Schlodder E., Introduction to optical methods in photosynthesis. *Photosynthesis research*, 101(2009), pp. 93–104.
- Schulze, E.-D.: A new type of climatized gas exchange chamber for net photosynthesis and transpiration measurements in the field. – *Oecologia*. **10**(3): 243-251, 1972.
- Scurlock, J., Long, S., Hall, D. y Coombs, J., 1987. Introducción a las técnicas en fotosíntesis y bioproductividad. En *técnicas en Fotosíntesis y Bioproductividad* (eds. Coombs, J., Hall, D. Long, S. y J. Scurlock). Editorial Futura. México. 2a edición.
- Selesi D, Pattis I, Schmid M, Kandeler E, and Hartmann A, Quantification of bacterial rubisco genes in soils by cbbl targeted real-time pcr. *Journal of microbiological methods*, **69** (2007) 497–503.
- Sensirion AG, SHT7X Humidity and Temperature Sensor Datasheet, Staefa, ZH
- Singh M P , Erickson J E, Boote K J, Tillman B L, Van Bruggen A H C, and Jones J W, Photosynthetic consequences of late leaf spot differ between two peanut cultivars with variable levels of resistance. *Crop Science*, **51** (2011) 2741.
- Spectrum BX, FTIR System, *Technical Information* (PerkinElmer Instruments LLC, 2008).
- Taiz L, and Zeiger E, *Plant Physiology* 5th. Ed. Sinauer, Sunderland, Massachussets, 2010. 111-143 pp.
- Takahashi, M., Ishiji, T., Kawashima, N.: Hand made oxygen and carbon dioxide sensors for monitoring the photosynthesis process as instruction material for science education. - *Sensors and Actuators B*. **77**: 237-243, 2001.
- Tank, J.L., Musson, J.C.: An inexpensive chamber apparatus for multiple measurements of dissolved oxygen uptake or release. – *J. of the North American Benthological Soc.* **12**(4): 406-409, 1993.
- Torres-Lopes, J.G.: Diseño de un sistema de irrigación automatizado para policultivo. Master Thesis, Univerisdad Autónoma de Querétaro, México, 2012.
- Walker J M, and Rapley R, Molecular biology and biotechnology. *Royal Society of Chemistry*, 2009. 604 pp.

- Warburg, O., Krippahl, G., Lehman, A.: Chlorophyll catalysis and Einstein's law of photochemical equivalence in photosynthesis. - *American J. of Bot.* **56**(9): 961-971, 1969.
- Waynant, R.W. y Ediger, M.N. 2000. *Electro-optics handbook*. Editorial McGraw-Hil. 2.1-2.6.
- West-Eberhard M J, Smith J A C, and Winter K, Photosynthesis, reorganized. *Science*, **332** (2011) 311.
- Wolfbeis O.S., Materials for fluorescence-based optical chemical sensors. *Journal of Materials Chemistry*, 15(2005), pp. 2657–2669.
- Woods, M.. 1988 *Glass houses: history of greenhouses, orangeries and conservatories*. Aurum Press, London, ISBN 0-906053-85-4.
- Zhang L, Xing D, and Wang J, A non-invasive and real-time monitoring of the regulation of photosynthetic metabolism biosensor based on measurement of delayed fluorescence in vivo. *Sensors*, **7** (2007) 52–66.