



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD
LEÓN**

TEMA:

**CONSTRUCCIÓN DE EQUIPO QUE MIDE LA EFICIENCIA
CUÁNTICA DEL FOTOSISTEMA II**

MODALIDAD DE TITULACIÓN:

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A:

LAURA ROSINA TORRES ORTEGA

TUTOR:

DR. AARÓN IVÁN VÉLEZ RAMÍREZ





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Contenido

| | |
|------------------------------|-----------|
| Agradecimientos | 1 |
| Resumen | 2 |
| CAPITULO I | 3 |
| Introducción | 3 |
| Hipótesis | 12 |
| Objetivo General | 12 |
| CAPITULO II | 13 |
| Antecedentes | 13 |
| CAPITULO III | 18 |
| Metodología | 18 |
| Resultados | 28 |
| Discusión..... | 53 |
| Conclusión | 56 |
| Perspectivas..... | 56 |
| Bibliografía | 57 |

Agradecimientos

La realización del presente trabajo fue posible gracias a los apoyos otorgados por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IA207519; el Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME), proyecto PE205918; el Programa de Investigadores Jóvenes de la Secretaría de Innovación, Ciencia y Educación Superior (SICES) del Estado de Guanajuato, proyecto SICES/CONV/080/2018; y el Programa de Fortalecimiento de la Infraestructura Científica y Tecnológica del CONACyT, proyecto 294511.

Primeramente, agradezco mis padres: Laura del Refugio Ortega Gonzales e Ismael Torres Gómez por haberme introducido ambos al camino de la ciencia desde distintos enfoques. A toda mi familia, mis tías y tíos, mis primos, mi hermano. Sobre todo, a mi abuela materna Margarita González Bravo, quien ha sido mi guía e inspiración durante toda mi vida.

También quisiera agradecer a mis amigas y amigos, quienes siempre han estado para mí en distintos momentos. Especialmente a Dennis, Gabs, Palmira, Caro, Tete, Gerardo, Take, Mau e Isaac. Además, me gustaría agradecer especialmente a Héctor y Oscar, por su contribución a este proyecto. También, me gustaría agradecer de manera profunda a la Dra. Harumi Shimada, por animarme durante toda la carrera y al Dr. Aarón Vélez, quien fue mi mentor en este trabajo y también una gran inspiración para mí durante la carrera. Además, también agradezco a los sinodales la Mta. Josefina y el Dr. Yebra, quienes me ayudaron a la revisión de este trabajo.

Resumen

El siguiente trabajo tiene como propósito el diseño y la construcción de un prototipo para medir la eficiencia cuántica (F_v/F_m) del Fotosistema II (PSII) en plantas, el cual mide la F_v/F_m del PSII con igual o mayor exactitud que otros equipos comerciales. Estos equipos comerciales tienen la desventaja de que son altamente costosos, por lo que no todos los laboratorios pueden acceder a un equipo de esta índole. El prototipo a construir se conformó de cinco subsistemas diferentes, los cuales se fueron comprobando individualmente para su correcta integración. Una vez construido el prototipo, se procedió a medir la F_v/F_m de una muestra de cinco plantas de la especie *Euphorbia pulcherrima*; con este experimento se logró comprobar que el cálculo de la F_v/F_m es similar a otros equipos comerciales. De esta forma, el prototipo puede utilizarse como servicio para el laboratorio PLANTECC, León Gto.

CAPITULO I

Introducción

La vida en nuestro planeta depende de las plantas y la fotosíntesis que llevan a cabo, pues éstas alimentan aproximadamente a 7 billones de personas. Existe una serie de desafíos en la actualidad como la población creciente, la necesidad persistente de alimentos, escasez de recursos y cambio climático. Por ejemplo, en el 2050, la producción de los cultivos tendrá que duplicarse para satisfacer la gran demanda de alimentos proyectada (Zhao et al., 2019). El reto mundial es la producción global de alimentos a través de la obtención de nuevas variedades vegetales que se sobrepongan a los climas adversos, con los cada vez más escasos recursos disponibles (Pieruschka & Schurr, 2019; Zhao et al., 2019). Este trabajo tiene el propósito de medir la eficiencia cuántica de la fotosíntesis II en plantas, para lograr la identificación de los mejores genotipos con una técnica no invasiva.

La obtención de plantas con características más deseables para el consumo humano se ha hecho desde hace algunos miles de años. Sin embargo, hasta hace algunas décadas se descubrió que estas mejoras en las características de las plantas están dadas por su genotipo y fenotipo. El genotipo es todo el conjunto de genes de un organismo, el cual es ampliamente estudiado. El fenotipo de un organismo se entiende como el conjunto de características físicas cuantificables resultantes de la interacción del genotipo y el ambiente. Para abordar el fenotipo de las plantas se utilizan herramientas de fenotipo que nos ayudan a cuantificar la interacción de la planta y su ambiente. Esta cuantificación ayuda a determinar los mejores genotipos de plantas. Los nuevos desarrollos en la tecnología de sensores para hacer el fenotipo han aumentado la capacidad de análisis de los cultivos para la selección de nuevas variedades (Houle et al., 2010; Pieruschka & Schurr, 2019). Actualmente el fenotipo se ha relacionado cada vez más con análisis ópticos no destructivos de rasgos de plantas donde se pretende la obtención de información mediante sensores no invasivos (Walter et al., 2015). Los sensores que se utilizan miden señales provenientes del organismo que puedan ser de interés, por ejemplo, la fotosíntesis, ya que es un parámetro fundamental en la vida de las plantas.

Las plantas obtienen su energía mediante la fotosíntesis, por lo que este parámetro puede ser medido con sensores ópticos para obtener información con la que se pueden inferir estados fisiológicos en las plantas, por ejemplo, se puede medir la fotosíntesis en relación con un tipo de estrés (Guo & Zhu, 2006). En general, la literatura de fotosíntesis es muy extensa con varios temas estudiados como mejoramiento genético, vigor de semillas, calidad de semillas, calidad de frutas y vegetales, cambio climático, entre otros (Kalaji et al., 2014, 2017). Una técnica que se utiliza para medir la fotosíntesis es la *fluorescencia de la clorofila*, este método tiene la ventaja de que no es un método destructivo y tiene una amplia aplicación, ya que se utiliza para medir estrés en plantas, determinación de biomasa, medición de metabolitos secundarios, inicio de la senescencia, deficiencia de azufre, calidad del agua, herbicidas, infecciones con virus y hongos.

La técnica de *fluorescencia de la clorofila* se basa en cuantificar la emisión de luz infrarroja por parte de la clorofila presente en las plantas. Se describe de la siguiente manera: La fotosíntesis es un proceso en donde

la luz es capturada por el complejo cosechador de luz, asociado a los fotosistemas (fotosistema I y II). La energía se transfiere a la molécula de clorofila central del centro de reacción (RC), seguido de una separación de cargas a través de la membrana en donde se divide el agua en oxígeno molecular, protones y electrones en el lado del donante del fotosistema II (PSII). Los electrones se mueven del PSII al conjunto de plastoquinonas (quinonas a (Q_a), y quinonas b (Q_b), Cyt b6 / f, plastocianina y al fotosistema I (PSI) donde se produce una segunda separación de carga, y existe una reducción de ferredoxina aceptora de electrones PSI que posteriormente reduce la nicotinamida adenina dinucleótido (NADP) + a NADPH. El flujo de electrones en la membrana produce un gradiente de pH que impulsa la síntesis de (adenosín trifosfato) ATP por la proteína ATP sintasa (Kalaji et al., 2012).

No toda la luz absorbida por las plantas es convertida a energía química para la producción de azúcares; en cambio, la energía lumínica que llega a las plantas es canalizada hacia varias vías, que compiten entre ellas: fotoquímica, procesos no fotoquímicos y fluorescencia (Figura 1). En la vía fotoquímica, la energía lumínica se utiliza para la reducción de elementos subsecuentes en la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis y cuyo destino final es la obtención de azúcares. Otra vía de disipación de la energía luminosa capturada es mediante procesos no fotoquímicos (NPQ), donde la energía se disipa mediante calor, esto representa hasta un 90% de la luz absorbida. Finalmente, la vía de fluorescencia, la cual representa sólo un 1-2% de energía absorbida por las plantas, ocurre cuando se absorbe la energía lumínica y el estado excitado de los pigmentos absorbentes (mayormente clorofila) es inestable y pueden volver a su estado fundamental por la emisión de un fotón, el fotón emitido es la fluorescencia.

Ya que estas tres vías compiten por la energía lumínica, se puede establecer una relación cuantitativa entre estos procesos, y así la determinación de la fluorescencia nos puede dar información sobre las otras dos vías de competencia (Cruz et al., 2016; Kalaji et al., 2012; Kramer et al., 2004; Maxwell & Johnson, 2000).

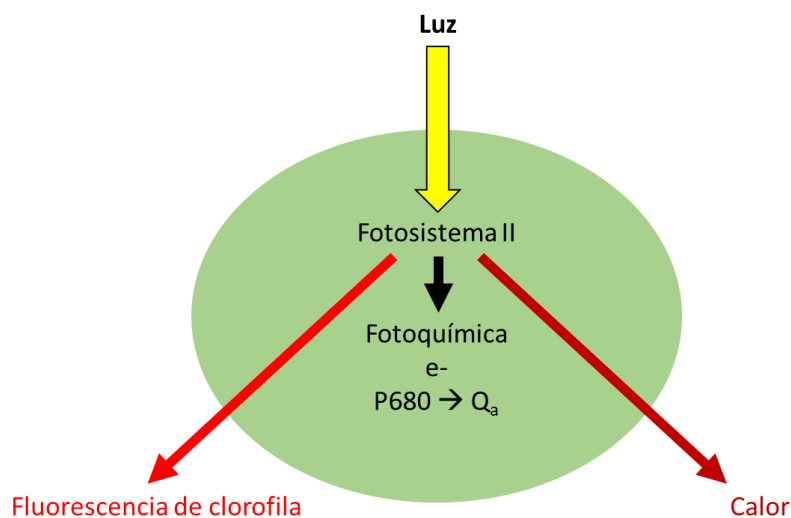


Figura 1. Vías en las que la energía luminosa se transfiere cuando llega al PSII en las plantas.
Fuente:(Baker, 2008).

Anteriormente para la determinación de fluorescencia se utilizaba DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea). La adición de DCMU a cloroplastos intactos y células de *Chlorella* inhibe la transferencia de electrones de la quinina (Q_a) hacia la segunda quinona aceptora (Q_b). Por lo que la Q_a se reduce rápidamente y hay un incremento en la fluorescencia. Sin embargo, es difícil utilizar esta técnica en las hojas ya que la DCMU no penetra fácilmente en los tejidos de las plantas. Además, su efecto es irreversible, por lo que no se pueden hacer mediciones continuas (Baker, 2008).

Otra técnica que surgió después fue la *fluorescencia de clorofila*, consiste en exponer a las hojas de la planta directamente a grandes intensidades de luz. Esta técnica mide cuantitativamente la desactivación de la fluorescencia por procesos fotoquímicos y no fotoquímicos. Consiste en aplicar un pulso saturante de menos de un segundo de duración para reducir la Q_a y así inducir fluorescencia, la cual es medida. Las ventajas de esta técnica es que la señal de clorofila es muy rica, es muy sensible a cambios fotosintéticos y puede ser grabada con mucha precisión. Otra ventaja importante es que es una práctica no invasiva, que permite la medición continua en hojas (Baker, 2008; Kalaji et al., 2014). Por estas características, la técnica de *fluorescencia de clorofila* mediante la aplicación de grandes intensidades de luz es la que se desarrollará en el presente trabajo. Para su aplicación, una tarea relevante de esta investigación fue el diseño y la construcción de un prototipo medidor de fluorescencia de clorofila que tuviera un grado de precisión comparable a equipos comerciales.

Este prototipo propuesto como parte de esta tesis fue diseñado con cinco subsistemas: el subsistema óptico, de alimentación, de temperatura, de adquisición y control y de interfaz con el usuario. Todos ellos en conjunto, almacenan y transmiten señales o información para medir la señal de fluorescencia en las plantas. El subsistema óptico consta de un arreglo de lentes y espejos que conducen la luz desde los diodos emisor de luz (LEDs) a la hoja y la luz reflejada de la hoja hacia al fotodetector. Existen dos conjuntos ópticos: el del LED blanco y el de los LEDs naranja e infrarrojo. Cada conjunto está construido por un telescopio simple que logra conducir la luz desde los LEDs hasta las muestras y de las muestras hasta el fotodiodo, que mide la señal de fluorescencia. El conjunto óptico de los LEDs naranja e infrarrojo posterior al telescopio simple tiene un divisor de luz, este divisor transmite una longitud de onda y refleja la otra (Lozano, 2015).

El telescopio simple está formado por dos lentes situados en extremos de un tubo, uno de ellos es una lente convergente, normalmente llamada objetivo, por donde entra la luz y se refracta hasta concentrarse en el foco, donde se forma la imagen. El fenómeno de refracción de la luz es cuando la luz cambia de dirección al incidir en una interface que separa a dos medios con diferente índice de refracción, ya que la densidad de este medio es diferente a la del aire (Villamiel, 2015). En el extremo opuesto se encuentra una lente divergente, que hace que la luz concentrada sea paralela nuevamente y la imagen se mantenga (Conde-Saavedra, 2018). Es importante que la imagen se mantenga, ya que se pretende que la mayor parte de la luz sea colectada y transmitida hasta la hoja a medir; esto debido a que este método requiere altas intensidades de luz (Figura 2) (Fraknoi et al., 2016).

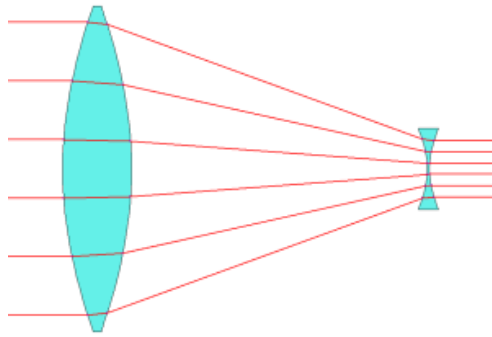


Figura 2. Representación de los lentes utilizados para la construcción de un telescopio simple. La luz incide en el objetivo, y después el lente divergente que hace que los rayos de luz sean paralelos.

Fuente: (Lutus, 2005).

El subsistema de alimentación de los LEDs tiene como objetivo el sustento energético de los LEDs para su funcionamiento. Este subsistema está conformado por tres circuitos. Las tareas principales de estos circuitos son recibir las señales provenientes del subsistema de adquisición y control para que los LEDs enciendan y apaguen rápidamente, y también regulan el flujo de electricidad que fluye hasta los LEDs. La cantidad de electrones que fluye desde el circuito de alimentación al LED se llama carga eléctrica, el flujo de carga eléctrica por unidad de tiempo se llama corriente, la cual es representada con la letra “I” y se mide en Amperios (A) — la corriente es análoga al flujo de un líquido dentro de una tubería. La diferencia de potencial que impulsa a la corriente de electrones se llama voltaje, se representa con la letra “V” y se mide en Volts (V). Ésta es una medida específica del potencial de energía entre dos puntos. Cuando se habla de voltaje, se refiere a la cantidad de energía potencial que existe para que los electrones se muevan de un punto a otro. La corriente se mueve a través de conductores que poseen un grado de oposición a este movimiento o fricción. Esta oposición es llamada resistencia, la cual se representa con la letra “R” y se mide en ohms (Ω) (Mercado, 2013).

La cantidad de corriente (I) que fluye en un circuito depende del voltaje (V) y la resistencia (R) presentes, si el voltaje aumenta en un circuito y la resistencia se mantiene, la corriente aumenta. Esta relación está descrita por la ley de Ohm, la cual nos dice que la corriente de un circuito puede ser calculada por el voltaje dividido por la resistencia (Ecuación 1). El subsistema de alimentación de LEDs controla la corriente usando una resistencia y voltaje conocidos y así puede alimentar a los LEDs de forma adecuada.

$$I = \frac{V}{R}$$

Ecuación 1.

En el prototipo, el subsistema de alimentación debe controlar la corriente que llega hasta los LEDs, pues de otra manera los LEDs consumirían demasiada corriente que dejarían de funcionar. Este control dentro de los circuitos se hace a través de transistores, cuya función es entregar una señal de salida en respuesta a una señal de entrada. Existen dos tipos, los transistores de unión bipolar y los Transistores de Efecto de Campo de Metal-óxido-Semiconductor (MOSFET). En el circuito que se construyó se utilizaron del tipo MOSFET, este

tipo de transistor está constituido por una entrada llamada “sumidero”, una salida llamada “drenado” y una terminal llamada “puerta”. Al aplicar un voltaje mínimo (voltaje umbral) en la puerta, la corriente se conduce entre el sumidero y la salida, si el voltaje umbral no se sobrepasa en la puerta, el MOSFET no conduce energía. Este tipo de transistores tienen una respuesta muy rápida y de esta manera se moduló la corriente dentro de los circuitos (García, 2016).

Los LEDs como fuente de luz consumen poca energía, tienen largo tiempo de vida, producen una iluminación uniforme y direccional y sobre todo prenden y apagan rápidamente (corto tiempo de conmutación). La desventaja que presentan es su sensibilidad térmica (Licari & Swanson, 2011). Esto quiere decir que el rendimiento en el color del LED depende de la temperatura de su unión. La temperatura de la unión del LED se refiere a la temperatura de la región activa en los LED; esta influye en la eficiencia, la potencia de salida, la fiabilidad, el cambio de longitud de onda máxima y el ancho espectral (Bhattacharya et al., 2011). Aunque la iluminación basada en LEDs es significativamente mejorada en comparación con productos de iluminación convencionales, su larga vida requiere de un control en la temperatura (Wilson, 2012; LED Systems Reliability Consortium, 2017). Por lo que, si la temperatura no es controlada, su vida útil disminuye, la intensidad de luz que se emite disminuye también y puede cambiar el color que es emitido, lo cual es muy importante mantener en la medición de fluorescencia de clorofila.

El subsistema de control de temperatura se encarga de controlar la temperatura de los LEDs alimentados para que estos no excedan su temperatura de unión, no disminuya su intensidad y no cambie la longitud de onda de emisión. Este subsistema se compone de sensores de temperatura que mandan señales a los controladores que deciden si se deben apagar o prender las celdas termoeléctricas. Estas últimas, utilizan energía eléctrica para transferir calor desde el LED hasta los disipadores de calor, que fueron equipados con ventiladores. Las señales eléctricas que controlan el encendido de los LEDs y las celdas termoeléctricas (entre otras cosas) está dado por el subsistema de adquisición y control. Este subsistema también está conformado por una tarjeta de adquisición de datos (DAQ) y una PC con software programable. Este subsistema nos ayuda a recibir las señales de otros subsistemas como el de control de temperatura o de alimentación de los LEDs y como respuesta se genera una señal de control emitida por este subsistema (National Instruments, s.f.).



Figura 3. Partes de un Sistema DAQ. Primeramente, el sensor que mide la señal, después el hardware o dispositivo DAQ para la traducción de señales y finalmente la PC para implementar control. Fuente: (National Instruments, s.f.)

El DAQ recibe señales de los sensores; los cuales miden un parámetro físico como temperatura, presión, luz sonido, etc. El sensor convierte un fenómeno físico en una señal eléctrica medible por el DAQ. Depende del tipo de sensor, su tipo de salida puede ser voltaje, corriente, resistencia o algún parámetro eléctrico variable en el tiempo, siendo voltaje el más común (Cifra, & Chandhoke, 2006). El tipo de señal que el hardware DAQ recibe es una señal de tipo “analógica”. Esto quiere decir que varía de forma continua a través del tiempo, puede tomar un número infinito de valores (Figura 4, panel a). Existe otro tipo de señales llamadas “digitales” que toman un número finito de valores discretos, es decir que pueden tomar un rango de valores limitados (Figura 4, panel b y c). La mayoría de nuestros dispositivos electrónicos deben interactuar con el mundo real, que se comporta de manera analógica. Sin embargo, la mayoría de estos dispositivos electrónicos en su interior funcionan con señales digitales o en combinación.

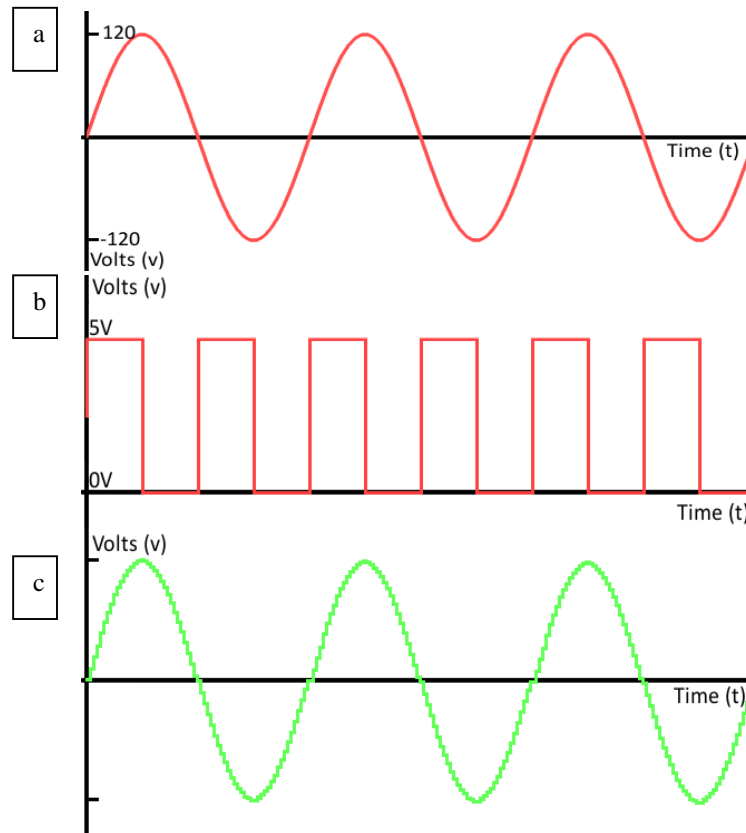


Figura 4. Representación de los tipos de señales a través del tiempo. Donde panel (a) representa una señal de tipo analógica. El panel (b) representa una señal tipo digital. El panel (c) es una señal digital que se comporta señal analógica.

Fuente: (Sparkfun, s.f.).

Un sistema de adquisición de datos tiene tres componentes importantes: el circuito de acondicionamiento de señales, convertidor analógico-digital (ADC) y un bus de PC. El acondicionamiento de las señales amplifica, atenúa, filtra o aísla las señales para que puedan ser leídas por el Convertidor Analógico Digital (ADC). Las señales provenientes de los sensores son señales analógicas, el ADC convierte las señales analógicas en señales digitales utilizando un algoritmo binario para convertir formas de onda analógicas continuas en salidas digitales. Cada punto analógico se verifica que sea mayor o menor que un punto de referencia digital. Si es mayor, el bit digital se establece en “alto” o 1, luego se mueve al siguiente punto. Si es bajo el bit se establece en “bajo” o 0, luego se mueve al siguiente punto. Este proceso continúa hasta que se completa la conversión de la señal analógica (Figura 4, panel c). El bus de la PC sirve como la interfaz de comunicación entre el dispositivo hardware DAQ y la PC para pasar las instrucciones y mediciones hechas. Finalmente, una PC con software programable controla el hardware y es utilizada para procesar, visualizar y almacenar datos (National Instruments, s.f.).

Un ejemplo de un sistema DAQ sería la forma en la que se mide la temperatura de los LEDs en el prototipo construido. Un sensor (termopar) registra la temperatura de los LEDs cuando el voltaje entre la unión de dos tipos de cables cambia en proporción a la temperatura del LED. Después, un circuito amplifica esta

pequeñísima diferencia en voltaje a un rango que es medible por el DAQ. En el DAQ, un ADC de 32 bits convierte esta señal analógica en una digital; es decir el voltaje es clasificado en uno de los 4,294,967,296 niveles posibles (número definido por los bits del ADC, 2^{32}). Finalmente, el DAQ transfiere la información a la PC mediante la conexión PCIe por la cual están ambos conectados (National Instruments, s.f.-b).

El software del sistema DAQ fue programado en el lenguaje de programación LabVIEW, por sus siglas (Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench), desarrollado por National Instruments. Este lenguaje es de tipo gráfico y se utiliza para lo que se conoce como instrumentación virtual. Es decir, que está orientado para desarrollar aplicaciones de control de equipos electrónicos, sistemas de instrumentación. Su naturaleza gráfica lo hace un lenguaje ideal para examinar, medir, automatizar, analizar datos y controlar instrumentos en un menor tiempo que los lenguajes convencionales (Chugani et al., 1998).

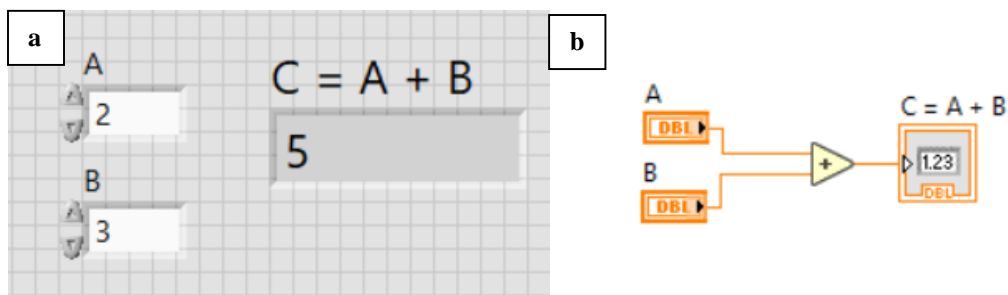


Figura 5. En el panel a) dos controladores se suman, A más B, en el indicador se muestra el resultado $C = A + B$. En el panel b) se encuentran los controladores para el usuario y el indicador de la suma.

Fuente: Elaboración propia.

LabVIEW genera programas llamados “VIs” o Instrumentos Virtuales, cada programa tiene su propio ícono que puede ser modificable. Además, cada VI puede tener conexiones de entrada y salida. Con estas características, existen dos ventajas de este lenguaje de programación, la primera es que un programa puede ser utilizado en diferentes aplicaciones únicamente cambiando sus entradas. La otra ventaja es que varios VIs pueden trabajar en conjunto para el control de un equipo. Cada VI está conformado por un panel frontal y un diagrama de bloques. En el panel frontal es donde el usuario verá y podrá usar botones, pantallas, controles, etc (Figura 5, panel a). El diagrama de bloques contiene la programación y circuitería de objetos donde el usuario no interactúa (Figura 5, panel b). Ambas partes se conectan a través de terminales, que son uniones que sirven como entradas o salidas de datos (Vizcaíno & Sebastián, 2011). Por ejemplo, en la Figura 5 se puede apreciar una suma entre dos variables “A” y “B”. En el panel (a) se muestra el panel frontal donde el usuario ingresa los dos números en los controladores “A” y “B”, cuando el programa se efectúe el resultado aparecerá en el indicador “C”. En el panel (b) se muestra el diagrama de bloque donde está la programación para llevar a cabo esta operación entre ambos valores en cuanto el programa sea ejecutado (Bitter et al., 2017).

El subsistema de interfaz gráfica con el usuario se programó igualmente en LabVIEW, este subsistema funciona como puente de interacción entre el usuario y el hardware del equipo que hace las mediciones. De manera que, a través de este subsistema, el usuario controla el equipo construido.

El motivo de la construcción de un fluorímetro como trabajo de tesis fue porque en los comerciales encontramos dos problemas relevantes:

1. El costo de los fluorímetros: en promedio los más sencillos superan los 600,000 pesos mexicanos y pocos laboratorios cuentan con presupuesto suficiente.

2. Se encontró que, estos equipos no garantizan mediciones comparables, pues sus programaciones son diferentes y también utilizan diferentes tipos de luz para excitar la clorofila, incluso en fluorímetros de la misma compañía comercial.

Por tanto, en esta tesis, se propone la construcción de un prototipo de menor costo, con igual o mejor calidad que los comerciales. Para corroborar que el prototipo desarrollado hace mediciones comparables con otros equipos, se realizó un experimento de medición de la eficiencia cuántica del PSII en cinco plantas de la especie *Euphorbia pulcherrima*. En este experimento se encontraron los parámetros óptimos para el cálculo de la eficiencia cuántica respecto a la duración de los pulsos para excitar la clorofila en las plantas. De esta forma, este prototipo permitirá al laboratorio Nacional de Plantas (PlanTECC) contar con una herramienta más accesible que le permita introducir esta técnica de medición fisiológica en plantas.

Hipótesis

El prototipo construido tomará mediciones con igual o mayor exactitud que equipos existentes en el mercado.

Objetivo General

Diseñar y construir un equipo para medir la eficiencia cuántica del fotosistema II en plantas

Objetivos Específicos

- Diseñar y construir los cinco subsistemas que conforman el prototipo
- Crecer y cuidar plantas sanas para su medición
- Medir la eficiencia cuántica del fotosistema II con el prototipo construido

CAPITULO II

Antecedentes

El prototipo construido como parte de esta tesis está basado en emisión de fluorescencia por la clorofila. La fluorescencia es un fenómeno donde algunas composiciones químicas, bioquímicas y organismos vivos tienen la capacidad de emitir luz cuando son expuestos a cierta intensidad de luz y correctas longitudes de onda, las moléculas responsables de la captación de luz y emisión de fluorescencia son llamados fluoróforos. Existen diferentes tipos de fluoróforos como la clorofila, los carotenoides y otras moléculas presentes en los aparatos fotosintéticos de plantas y algas (Fernandez et al., 1998; Narayan et al., 2012). Estos fluoróforos emiten una luz con una longitud de onda mayor que la longitud de onda con la que son excitados, a este efecto se le conoce como “Efecto Stokes”, y fue George Stokes, un matemático, el que descubrió que el espectro de emisión cambia a mayores longitudes de onda respecto al espectro de ondas absorbidas. Observó este fenómeno en la clorofila de algas rojas y le llamó *fluorescencia* por el parecido con el color del mineral fluorita. Además, sugirió que la fluorescencia se usara como herramienta analítica (Acuña & Amat-Guerri, 2008; Govindjee, 2004).

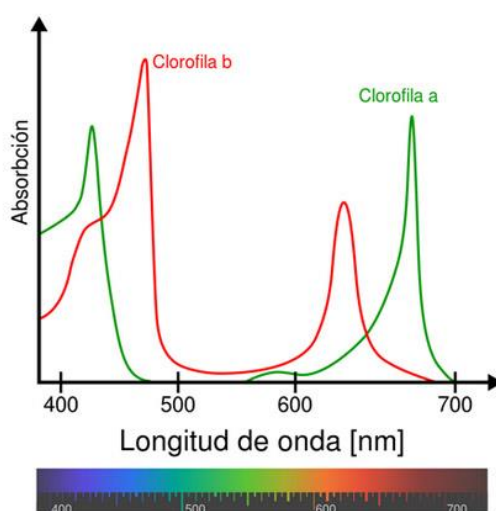


Figura 6. Espectro de absorción y emisión de clorofila a, el cual presenta efecto “Stokes”.

Fuente: (Dron Control, s.f.)

En 1931, Kautsky y Hirsch observaron que la fluorescencia de la clorofila crece hasta un nivel máximo, después declina y finalmente se mantiene en estado estacionario. Analizaron que este declive correlacionaba inversamente con la asimilación del CO_2 , a este fenómeno se le llama efecto Kautsky. Después, en la década de 1960, Duysens y Sweers plantearon la hipótesis “ Q_a ”, en donde proponían que la fluorescencia disminuía cuando la Q_a se oxidaba y aumentaba cuando la Q_a se reducía. En 1995, Govindjee, concluyó que: 1) La fluorescencia aumentaba rápidamente a un máximo y declinaba hasta nivel estable en minutos, 2) La parte que aumentaba de la curva fue considerada ser la reacción primaria de fotosíntesis porque no se afectaba por temperatura, y 3) El declive de fluorescencia se encontró inversamente correlacionado con incremento en tasa de asimilación de CO_2 (Govindjee, 2004; Lavergne & Trissl, 1995; Strasser et al., 1995).

Para la determinación de fluorescencia primeramente se utilizaba 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU), la adición de DCMU a cloroplastos intactos y células de *Chlorella* inhibe la transferencia de electrónicas de la quinina (Q_a) hacia la segunda quinona aceptora (Q_b). Por lo que la Q_a se reduce rápidamente y hay un incremento en la fluorescencia. Sin embargo, es difícil utilizar esta técnica en las hojas ya que este químico no penetra fácilmente en los tejidos de las plantas. Además, su efecto no es reversible, por lo que no se pueden hacer mediciones continuas (Baker, 2008).

Otra técnica que surgió después fue la inducción de fluorescencia al exponer a las hojas a grandes intensidades de luz. La inducción de fluorescencia por medio de una fuente de luz fue desarrollada para hacer mediciones continuas e inducir la fluorescencia en las hojas de manera uniforme (Baker, 2008; Lavergne & Trissl, 1995; Strasser et al., 1995). Existen diferentes instrumentos que utilizan la inducción de fluorescencia con luz, se dividen en dos diferentes tipos: de fluorescencia continua y modulada. Los equipos de fluorescencia continua como Handy PEA y Pocket PEA consisten en un LED o una matriz de LEDs que filtran ópticamente una longitud máxima de emisión de 650 nm, longitud que es absorbida fácilmente por la clorofila para inducir fotosíntesis. Existe un fotodiodo de alto rendimiento que detecta los cambios de fluorescencia, el diseño óptico y el filtrado aseguran que el equipo tome la señal de fluorescencia de longitud más larga que la de excitación (Hansatech Instruments, s.f). La fluorescencia originada en el PSII tiene un pico de emisión roja de 685 nm y el PSI tiene un pico de emisión en la región rojo lejana de 720-740 nm (Govindjee, 2004; Lamb et al., 2018; Narayan et al., 2012; Pedrós et al., 2008). Estos equipos por lo tanto bloquean la luz reflejada de la longitud de onda más corta de emisión (igual o menor a 650 nm), de esta manera se filtra la señal de emisión deseada proveniente de la fluorescencia medida.

En los equipos de fluorescencia continua la ventaja es que no existe luz actínica de fondo, por lo que en cada pulso hay una oscuridad absoluta y ciertos parámetros fotosintéticos pueden ser mejor determinados como la cinética rápida OJIP. Desafortunadamente este sistema no puede calcular la cinética lenta (ver siguiente sección), y por lo tanto no pueden utilizarse en presencia de la luz ambiental (Kalaji et al., 2014; Klughammer & Schreiber, 2008). En cambio, los equipos modulados por amplitud de pulso (PAM) separan el efecto de luz actínica que desencadena la fotosíntesis y la baja intensidad de luz que es usada para probar el estado del sistema fotosintético (Beer et al., 1998).

Los sistemas modulados, o equipos PAM, disponibles desde 1997, deben cumplir las siguientes características: 1) La luz modulada debe ser baja para no inducir fotosíntesis cuando se mide la fluorescencia mínima (F_o), 2) El sistema debe distinguir entre la fluorescencia emitida por las muestras y la luz ambiental y 3) Debe ser un sistema con detectores de respuesta rápida. En este sistema existen dos fuentes de luz, una que induce la fotosíntesis (conocida como luz actínica) y la otra es una fuente que produce un pulso de medición de color naranja (o azul) que induce la fluorescencia (Kalaji et al., 2014; Narayan et al., 2012). El pulso de medición se enciende y apaga con una frecuencia conocida; la fluorescencia inducida por la luz actínica y los pulsos de medición fluctúan con la misma frecuencia. Cuando el pulso de medición está apagado, la fluorescencia solo depende de la luz actínica, y cuando ambas luces están encendidas, la fluorescencia se incrementa. Este cambio

se puede medir y, por ende, se puede saber la magnitud de la fluorescencia que depende del pulso de medición. De esta manera, con los sistemas tipo PAM se pueden obtener las cinéticas rápidas y lentas, y así conocer a profundidad la eficiencia cuántica del PSII y los procesos de tipo NPQ que con los equipos de fluorescencia continua no es posible (Narayan et al., 2012; Schreiber & Ulrich, 2004). A continuación, se explicarán los parámetros fotosintéticos y cinéticas que se quieren medir con el este fluorímetro de tipo PAM.

Parámetros de medición

Hay dos tipos de cinética de la fluorescencia de la clorofila: rápida y lenta. Dependiendo del tipo de estudio se puede usar una, la otra o las dos. Para un muestreo rápido y gran cantidad de muestras se utiliza la cinética rápida. Para el estudio del aparato cinético a mayor profundidad y para estudiar los efectos que ocurren durante la relajación de los fotosistemas después de la exposición a la luz se utiliza la cinética lenta (Guidi & Calatayud, 2014; Kalaji et al., 2014).

En la cinética rápida, o también llamado *transitorio de fluorescencia de clorofila*, está basada en la inducción de fluorescencia de clorofila (OJIP). Este transitorio refleja la acumulación de la Q_a reducida. Primero, el OJ es el proceso de la reducción del lado aceptor de PSII ($Q_a + Q_b$), JI es la reducción de la plastoquinona (PQ) y IP es la reducción de aceptores alrededor de PSI y reoxidación de Q_a . Los transitorios OJIP son utilizados para hacer un análisis de flujo, un análisis del destino de los fotones absorbidos por PSII (Guidi & Calatayud, 2014; Kalaji et al., 2014).

En la cinética lenta, se incluye la transición del aparato fotosintético de las hojas adaptadas a oscuridad a hojas adaptadas a la luz. Primeramente, se tiene que adaptar las hojas a la oscuridad durante al menos 20 minutos, para asegurarnos que Q_a esté máximamente oxidada. Cuando las hojas se adaptan a la oscuridad, la Q_a se oxida a su máximo, los centros de relación del fotosistema II están “abiertos” y se relaja el gradiente de protones. La exposición de las hojas a un haz de luz débil ($<0.1 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que resulta en un nivel mínimo de fluorescencia (F_o) (Baker, 2008; Guidi & Calatayud, 2014). Seguido de la medición de F_o , se aplica un pulso saturante de luz de alta intensidad ($7,000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o más), donde Q_a será máximamente reducida y la fluorescencia máxima será determinada (F_m), en donde los centros de reacción, con la Q_a reducida estarán “cerrados” (Harbinson, 2013). Si se aplica luz actínica continua y se mide la fluorescencia al aplicar el pulso de medición, en nivel de fluorescencia medida corresponde a (F'). Cuando además se aplica luz infrarroja para vaciar la cadena de transporte de electrones se obtiene la fluorescencia mínima para hojas adaptadas a la luz (F_o'). Cuando se expone la muestra a un pulso saturante de luz a una hoja adaptada a la luz, se obtiene la máxima fluorescencia (F_m'). La notación ($'$), simplemente indica que la muestra está adaptada a la luz (Baker, 2008).

Tabla 1. Principales parámetros fotosintéticos medidos por el prototipo construido.

| | Definición | Tipo de luz | Tipo de flash | Fisiología en planta |
|--------|--|----------------------|----------------------------|--|
| F_o | Fluorescencia mínima para hojas adaptadas a la oscuridad | Naranja | Modulado | Fluorescencia medida cuando Qa está oxidada máximamente |
| F_o' | Fluorescencia mínima para hojas adaptadas a la luz | Naranja e Infrarrojo | Modulado y Pulso Saturante | Fluorescencia medida cuando Qa está oxidada después de exposición a luz actínica |
| F_m | Fluorescencia máxima para hojas adaptadas a la oscuridad | Naranja y blanco | Modulado y Pulso Saturante | Fluorescencia medida cuando Qa está reducida máximamente |
| F_m' | Fluorescencia máxima para hojas adaptadas a la luz | Naranja y blanco | Modulado y Pulso Saturante | Fluorescencia medida cuando Qa está reducida después de exposición a luz actínica |
| F' | Fluorescencia emitida de hojas adaptadas a luz | Naranja | Modulado | Se obtiene información de desempeño de fotosíntesis pero involucra varios factores |

Fuente: Elaboración propia.

Para el cálculo de F_m y F_m' , el equipo va a poder generar dos tipos de pulso saturante, uno denominado “estándar” y uno “pulso multifacético saturante” o MFP. El pulso saturante estándar, expone a las hojas a un haz de luz saturante blanca de intensidad constante por un periodo determinado. El pulso saturante se apaga completamente durante unos pocos microsegundos para ser alternado con pulsos de medición haciendo en esos espacios las mediciones de fluorescencia. El problema de la aplicación del pulso estándar, utilizado por los equipos comerciales, es que si el pulso saturante no es lo suficientemente intenso se subestima F_m y F_m' (Loriaux et al., 2013). Para corregir este error se pueden hacer varios pulsos a diferentes intensidades para calcular F_m' o se puede extrapolar F_o y extraerlo del valor de F_v/F_m' (Schreiber & Ulrich, 2004). Otra técnica novedosa para mejorar el cálculo de F_v/F_m' es la técnica de “pulso multifacético saturante” inducida por Loriaux et al. 2013, donde se realizan varias mediciones en un solo pulso gracias a que durante la duración de este único pulso se varía su intensidad; así se puede calcular de mejor manera F_m' .

El pulso tipo MFP tiene tres fases, en la primera fase se aplica un pulso saturante con intensidad dada, en la segunda fase se disminuye la intensidad con base en una profundidad seleccionada y en la tercera fase la intensidad vuelve la de la primera fase. Con este tipo de aplicación se logra una mejor determinación de F_m' junto con los otros cinco parámetros fotosintéticos principales (F_o , F_m , F' , F_m' y F_o'). A partir de estos parámetros principales, se pueden obtener otros parámetros fotosintéticos que nos ayudan a conocer a mayor profundidad cómo se está distribuyendo la energía en el aparato fotosintético (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros secundarios obtenidos a partir de los parámetros principales fotosintéticos.
Fuente: (Baker, 2008).

| Parámetro | Definición | Fórmula | Relevancia Fisiológica |
|-----------------------------------|---|---|--|
| F, F' (estadio estacionario) | Emisión de fluorescencia de hojas adaptadas a la oscuridad y a la luz respectivamente | $I * A_{leaf} * fraction_{PSII} * \Phi_F$ | Información de desempeño fotosintético porque parámetros están influenciados por varios factores |
| F_v, F_v' | Fluorescencia variable de hojas adaptadas a la oscuridad y a la luz | $F_m - F_o, F_m' - F_o'$ | Habilidad del PSII para hacer fotoquímica |
| F_q' | Diferencia entre F_m' y F' | $F_m' - F'$ | Desactivación fotoquímica por centros de reacción abiertos PSII. |
| F_v/F_m | Eficiencia cuántica de fotoquímica del PSII | $(F_m - F_o)/F_m$ | Eficiencia máxima a la cual la luz es usada para reducción de Q_a |
| F_q'/F_m' | Eficiencia operativa del PSII | $(F_m' - F')/F_m'$ | Eficiencia en donde luz absorbida por el PSII se usa para reducción de Q_a . En un flujo de electrones determinado fluyendo por el PSII. |
| F_v'/F_m' | Máxima eficiencia del PSII | $(F_m' - F_o')/F_m'$ | Estimado de la eficiencia máxima de fotoquímica del PSII en un flujo de electrones dado, cuando los centros están abiertos. Es lo mismo que eficiencia operativa si centros de reacción están abiertos |
| F_q'/F_v' | Factor de eficiencia del PSII | $(F_m' - F') / (F_m' - F_o')$ | Fórmula igual que qP. Relaciona máxima eficiencia del PSII con eficiencia operativa. |
| NPQ | Atrapada no fotoquímica | $(F_m/F_m') - 1$ | Estima la desactivación no fotoquímica de F_m a F_m' , pérdida de calor aparente del PSII |
| qE | Desactivación dependiente de energía | - | Asociado con el transporte de protones inducido en el lumen. Recula tasa de excitación del centros de reacción del PSII |
| qI | Desactivación Fotoinhibitoria | - | Resulta en fotoinhibición de fotoquímica del PSII |
| qL | Fracción de centros de reacción del PSII que están abiertos | $(F_q'/F_v')/(F_o'/F')$ | Estima fracción de centros de reacción abiertos. Basándose en el modelo del lago. |
| qT | Desactivación asociada a estado de transición | - | Por la fosforilación de complejos captadores de luz del PSII |
| Φ_F | Eficiencia cuántica de fluorescencia | $k_f/(k_f + k_h + k_{pp})$ | Número de eventos fluorescentes por cada fotón absorbido |
| $J (LEF)$ | Transporte lineal de electrones | $\Phi_{PSII} * PFDA * (0.5)$ | Capacidad fotosintética <i>in vivo</i> |

Fuente: (Baker, 2008)

CAPITULO III

Metodología

El prototipo construido como parte de esta tesis consta de cinco subsistemas: subsistema óptico, de alimentación de los LEDs, de control de temperatura, de adquisición y control (DAQ), y de interfaz gráfica con el usuario. Los subsistemas y sus conexiones se encuentran ilustrados en la (Figura 7). Estos subsistemas trabajan en conjunto para hacer las mediciones. En las secciones subsecuentes se explican cada uno de ellos.

El prototipo construido es un fluorímetro tipo PAM con algunas modificaciones de acuerdo con la patente WO 2013/181433 A3 (Kramer et al., 2016), los cinco subsistemas que constituyen al equipo trabajan en conjunto para lograr una metodología análoga a la patente mencionada en donde: 1) se ilumina al organismo fotótrofo con una fuente de luz actínica, 2) se apaga la luz actínica rápidamente, 3) se ilumina al organismo fotótrofo con un pulso de luz en un periodo en donde la luz actínica está apagada, 4) se colecta la fluorescencia para ser medida por un fotodiodo.

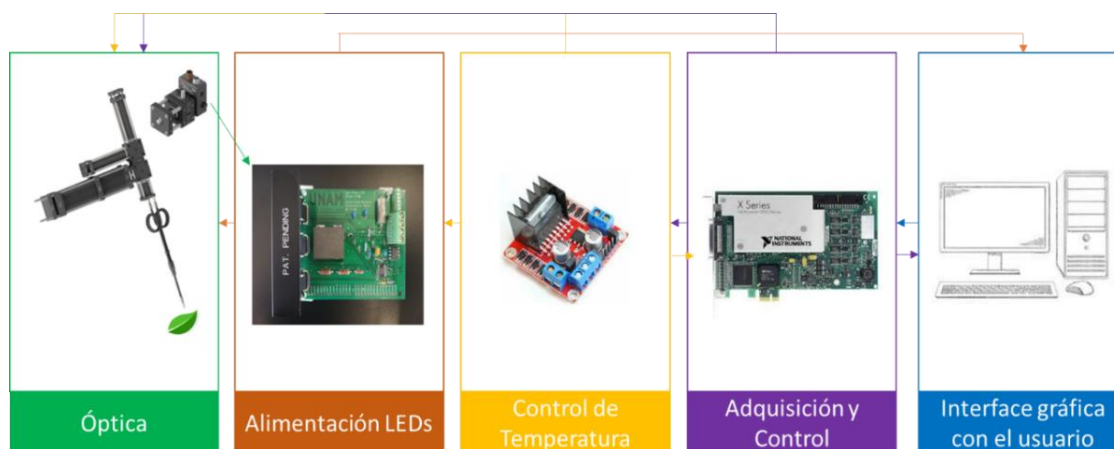


Figura 7. Imagen de los subsistemas del fluorímetro
Fuente: Elaboración propia.

Subsistema Óptico

El Subsistema Óptico consistió en lentes y espejos que transmiten la luz de los LEDs hacia una fibra óptica y de ahí hacia la muestra a medir (Figura 8). Después la fluorescencia que la muestra emite es colectada por la fibra óptica y transmitida hasta un fotodiodo amplificador que induce un voltaje leído por el DAQ (Figura 8). La luz proveniente de los LEDs se colimó usando lentes esféricas, en seguida, un par de lentes a modo de telescopio simple enfocó el haz colimado hacia espejos dichroicos o divisores de luz (Figura 9). Finalmente, un par de lentes canalizaron esta luz hacia la muestra a través de la fibra óptica para llegar hasta la muestra.

Este equipo empleó tres fuentes de iluminación: blanca, naranja e infrarroja. En la Figura 9 se observa el sistema de lentes que conducen a cada uno de los tres haces de luz. El LED blanco (XIAMP⁸ CXA1310 de CREE) emite un haz que consiste en luz de varias longitudes de onda, por lo que se utilizan lentes acromáticas para evitar aberraciones cromáticas; así mismo las lentes son de mayor tamaño debido a la necesidad de que el

pulso saturante sea de alta intensidad. El LED naranja (LEA P2W de OSTAR High Power Projection) y el LED infrarrojo (LZ4-00R308 de LED ENGIN) emiten haces con un espectro de emisión muy estrecho, por lo que se usan lentes simples ya que las aberraciones cromáticas no son un problema (Tabla 3). Para diseñar la estructura metálica que sostiene este subsistema óptico se utilizaron piezas modulares de Thor Labs ensambladas a la medida. El diseño del ensamble se realizó con un software de diseño asistido por computadora (CAD) (Figura 10).

Tabla 3. Características de los LEDs utilizados en subsistema óptico.

| LEDs | Longitud de onda dominante (nm) | Objetivo |
|------------|---------------------------------|---|
| Blanco | 430-630 | Parámetros fotosintéticos (F_m, F_m') |
| Naranja | 617 | Mediciones moduladas |
| Infrarrojo | 740 | Parámetros fotosintéticos (F_o) |

Fuente: Elaboración propia.

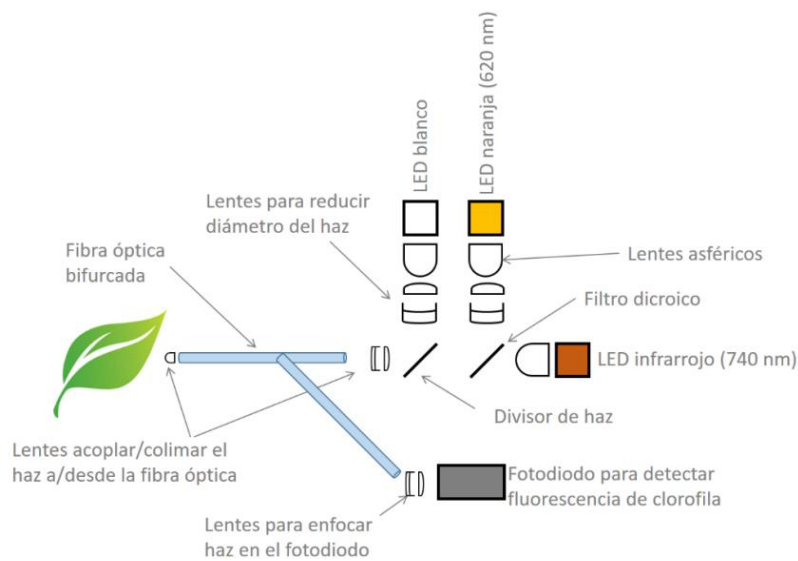


Figura 8. Esquema general del diseño general del prototipo de fluorímetro construido.

Fuente: Dr. Aarón Vélez, contacto personal.

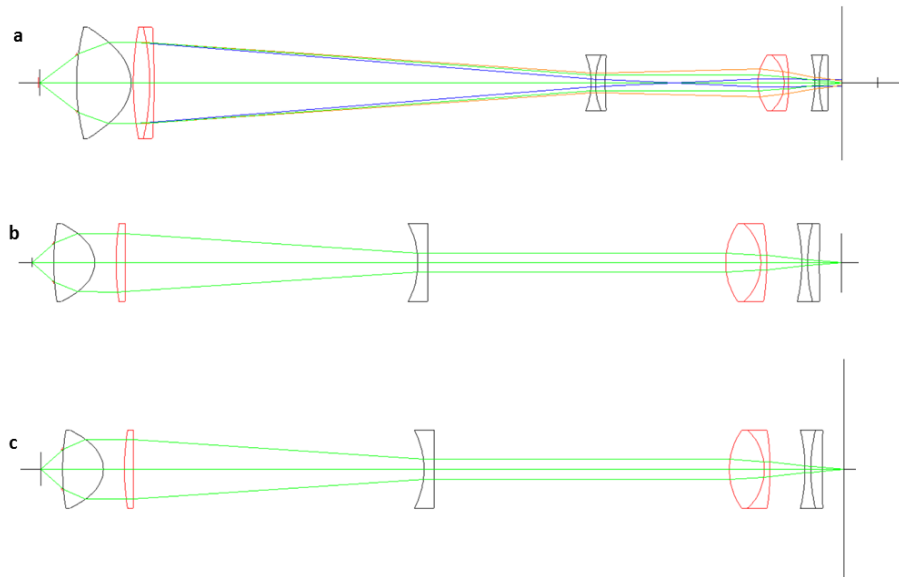


Figura 9. Panel (a) muestra los lentes y el haz de la luz blanca; panel (b) muestra los lentes y el haz de luz naranja; y el panel (c) muestra los lentes y el haz de luz infrarroja.
 Fuente: Dr. Aarón Vélez, contacto personal.

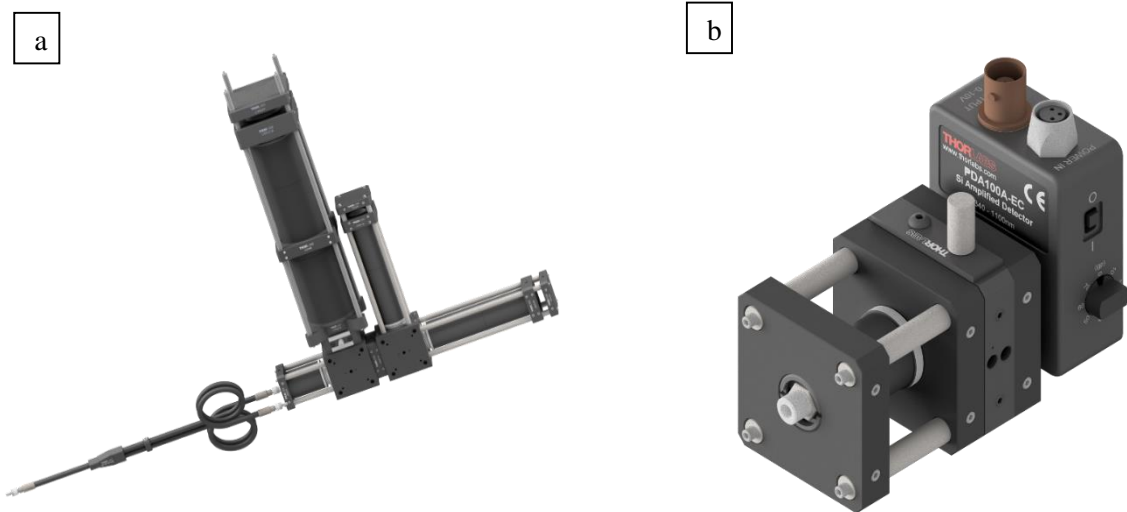


Figura 10. El panel (a) muestra la estructura que contiene a los lentes que canalizan la luz de excitación, el pulso saturante y los pulsos modulados, además se muestra la fibra óptica. El panel (b) muestra el fotodiodo amplificador que recibe la señal de fluorescencia.
 Fuente: Dr. Aarón Vélez, contacto personal.

Subsistema de Alimentación de los LEDs

Este subsistema cuenta con tres circuitos de alimentación para los tres tipos de LEDs. Los tres circuitos están físicamente soldados a una placa impresa (PCB) de diseño propio. Dentro de cada circuito existe un chip que recibe cuatro señales desde la computadora vía el DAQ: CTRL_PWM, CTRL_SEL, CTRL_H y sync; es necesario recibir los cuatro tipos de señal para que el LED se encienda (Figura 11). La señal CTRL_PWM se empleó para apagar el LED rápidamente, la señal CTRL_SEL se empleó para ajustar la señal de forma digital, la señal CTRL_H se empleó para controlar su intensidad de forma analógica y la señal sync sirvió para sincronizar a los LEDs en conjunto (Tabla 4).

Los circuitos de alimentación están basados en un circuito integrado que monitorea la corriente a través de una resistencia y ajusta la misma de forma analógica y/o digital al nivel indicado por el subsistema de adquisición y control. En este sentido, este subsistema tiene las características de a) prender y apagar los LEDs a frecuencias de 200 kHz, b) apagar completamente los LEDs en pocos microsegundos y c) variar la intensidad de los LEDs con una señal analógica.

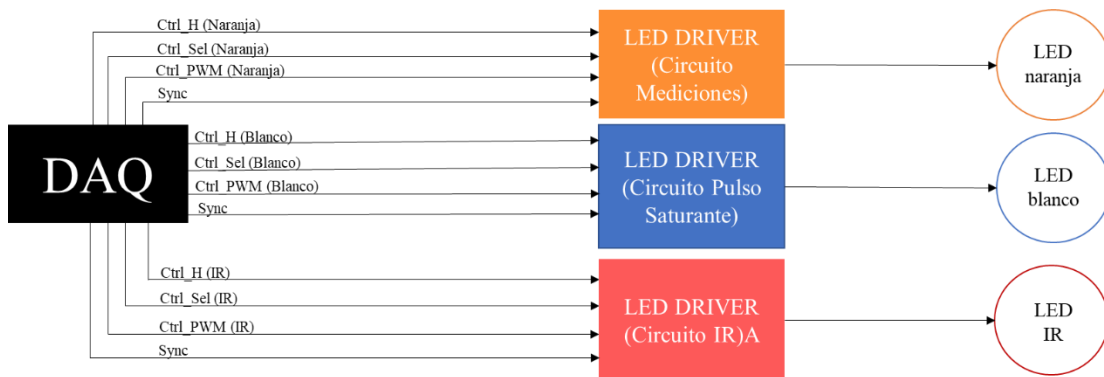


Figura 11. Representación gráfica de las señales presentes en los tres circuitos para el subsistema de Alimentación de los LEDs.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Tipo de señales para cada circuito.

| LED | Señales | Tipo de señal |
|---------------------------------|--------------------------------|---------------|
| Blanco (Pulso Saturante) | CTRL_H | Analógica |
| | CTRL_PWM, CTRL_SEL, Sync | Digital |
| Naranja (Pulso Modulado) | CTRL_H | Analógica |
| | CTRL_PWM, CTRL_SEL, Sync | Digital |
| IR | CTRL_H | Analógica |
| | CTRL_PWM, CTRL_SEL, Sync | Digital |

Fuente: Elaboración Propia

Subsistema de Control de Temperatura

El subsistema de Control de Temperatura de los LEDs es importante para que la intensidad y color de la luz emitida sea estable. Este subsistema consta de cuatro partes fundamentales: sensores de temperatura, controladores de corriente, un algoritmo de control (software) y los actuadores (celdas termoelectricas). La temperatura en cada uno de los LEDs se midió con un sensor de temperatura (termopar) que se conectó a un chip amplificador AD8495, el cual aumenta el pequeño voltaje entregado por el termopar y rechaza el ruido que pudiera ser recogido por cables de los termopares; este voltaje fue leído por el DAQ, el software hace una comparación entre la temperatura actual y la temperatura deseada dando como resultado una señal que envía a los controladores (L298N) para encender la celda termoelectrica que transfiere el calor del LED hacia los disipadores, así reduciendo así su temperatura. Los controladores de las celdas termoelectricas tienen un circuito tipo puente H, que normalmente se usa para controlar la velocidad y dirección de rotación de motores de corriente continua mediante transistores, en este caso pueden controlar la intensidad y dirección de transferencia de calor por parte de las celdas termoelectricas (Tabla 5 y Tabla 6) (Figura 12) (Ravi, 2018).

Tabla 5. Explicación de las señales de salida del motor 1.

| Motor 1 | | | | | |
|------------|------------|----------------|----------------|-----|-----|
| OUT 1 | OUT 2 | OUT 3 | OUT 4 | ENA | ENB |
| LED Blanco | LED Blanco | LED Infrarrojo | LED Infrarrojo | Sí | Sí |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6. Explicación de las señales de salida del motor 2.

| Motor 2 | | | | | |
|------------|------------|-------------|-------------|-----|-----|
| OUT 1 | OUT 2 | OUT 3 | OUT 4 | ENA | ENB |
| Ventilador | Ventilador | LED Naranja | LED Naranja | Sí | Sí |

Fuente: Elaboración propia.

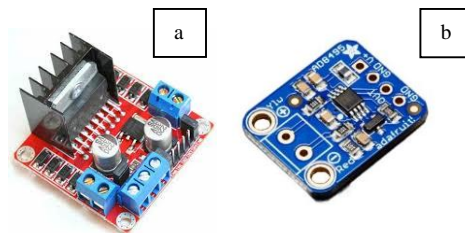


Figura 12. Panel (a) muestra controlador L298N utilizado para el control de temperatura y el panel (b) muestra el chip de traducción de temperatura a voltaje.

Subsistema de Adquisición y Control (DAQ)

El subsistema de Adquisición y Control (DAQ) es una combinación de hardware y software. La parte de hardware nos permite tomar señales analógicas obtenidas del fotodiodo y convertirlas a señales digitales que pueden ser leídas por el software hecho a la medida, el cual, a su vez, con ayuda del DAQ, manda órdenes digitales que son traducidas a señales analógicas para controlar la intensidad y encendido de los LEDs de alta potencia óptica.

Uno de los retos más grandes, es que las señales digitales y analógicas tienen que estar sincronizadas con una precisión de pocos microsegundos; para lograr esto, se programaron acciones ligadas a disparadores del DAQ en lugar de estar controladas por un software en Windows. De esta forma, se asegura que las señales se generen cuando se espera que se generen. Mediante un protocolo propio desarrollado en LabVIEW, sincronizamos las señales que controlen el Subsistema de Alimentación de los LEDs, alternando la frecuencia, duración e intensidad de los pulsos para obtener parámetros fotosintéticos con base en la patente de WO 2013/181433 A3 (Kramer et al., 2016)(Tabla 7)(Figura 13).

Tabla 7. Ajustes a agregar en protocolo para encender los LEDs.

| Ajuste | Unidad | LED | Tipo de ajuste |
|--|----------------|------------------|----------------|
| Tasa de toma de muestras | Segundos | Blanco | General |
| Tiempo de encendido para pulso estándar | Segundos | Todos | General |
| Intensidad del LED | Porcentaje (%) | Blanco y naranja | General |
| Tipo de Saturación | - | Blanco | General |
| Retraso inicial del LED naranja | Segundos | Naranja | General |
| Primera fase | Milisegundos | Blanco | Avanzado |
| Segunda fase | Milisegundos | Blanco | Avanzado |
| Tercera fase | Milisegundos | Blanco | Avanzado |
| Profundidad | Porcentaje (%) | Blanco | Avanzado |
| Tiempo encendido para pulso tipo MFP | Segundos | Blanco y naranja | Avanzado |

Fuente: Elaboración propia.

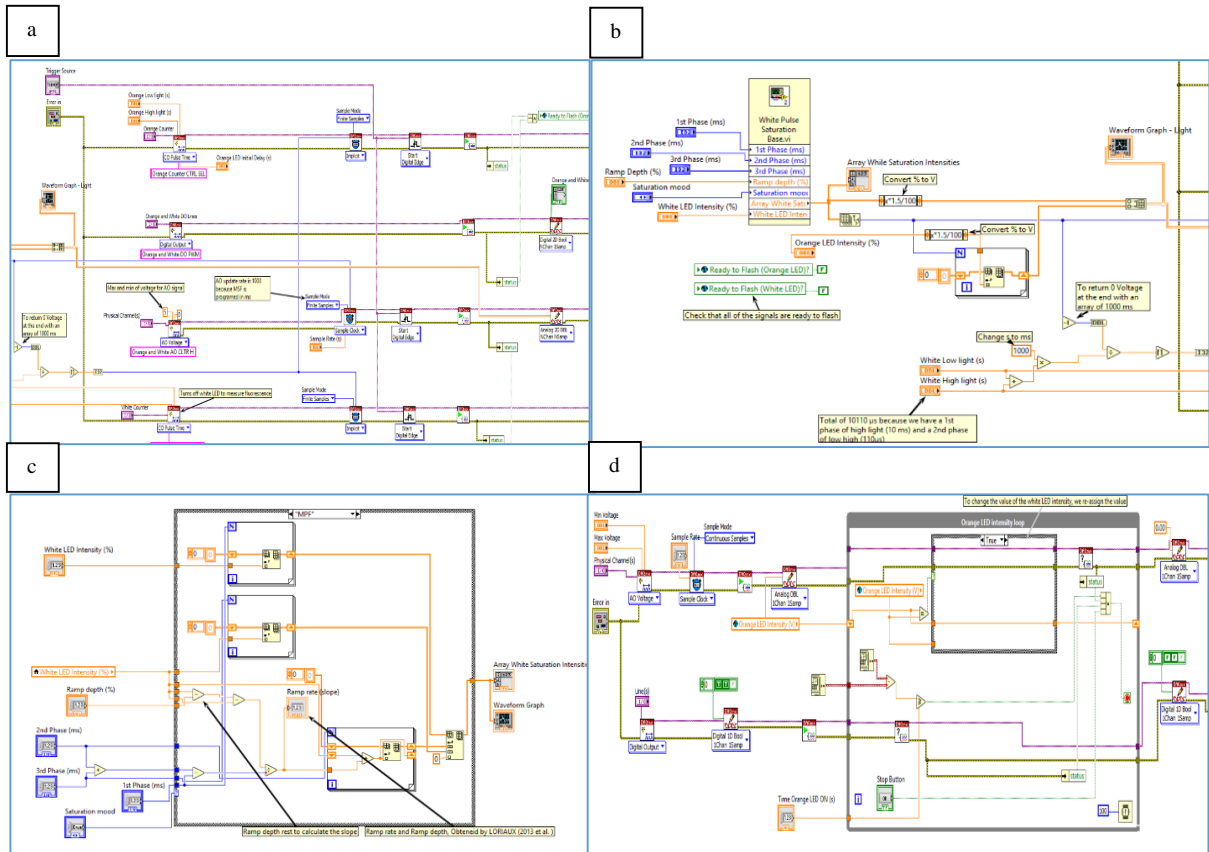


Figura 13. Diagramas del software programado ad hoc en LabVIEW para encendido y sincronización de los LEDs. El panel (a) muestra la programación de las cuatro señales de control para el prendido y apagado de los LEDs. El panel (b) y (c) muestran la programación para lograr el pulso saturante. El panel (d) muestra la programación para lograr el pulso de mediciones.

Fuente: Elaboración propia.

Subsistema de interfaz gráfica con el usuario

Se utilizó la plataforma LabVIEW de National Instruments para programar el subsistema interacción gráfica con el usuario. El subsistema de interfaz gráfica con el usuario forma parte de la comunicación directa entre el usuario y el prototipo desarrollado. Las acciones seleccionadas por el usuario parten gráficamente del Menú hacia las siguientes secciones fundamentales de la interfaz: Programador, Ajustes, Administrador, Iniciar

Sesión, Subir Datos, Selector de Mediciones y Monitoreo de Progreso (Figura 14).

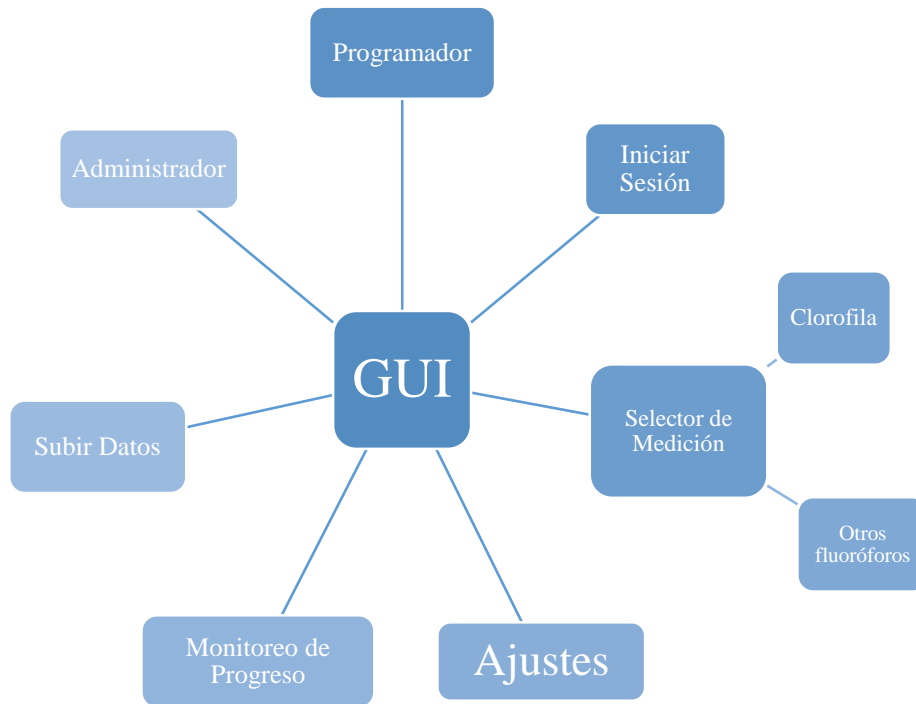


Figura 14. Interfaz gráfica del usuario (GUI), programada con siete secciones fundamentales.

Fuente: Elaboración propia.

En el subsistema de interfaz gráfica de usuario se implementó una estructura de tipo “Controlador de mensajes en cola”, que facilita que múltiples secciones del código se efectúen en paralelo y se pueda hacer un intercambio de datos entre distintas secciones. Esto es necesario para que, por ejemplo, los datos introducidos en la toma de mediciones puedan ser utilizados y modificados en el análisis dando un *click*. En este tipo de estructuras se tiene patrón de productor/consumidor, donde la interfaz del usuario es la parte productora que produce mensajes y las tareas son la parte consumidora. Este tipo de estructura es muy similar a una máquina de estados, que se usa frecuentemente en programación.

Con base en la entrada que el usuario captura, la GUI calcula el siguiente estado que se efectuará; donde cierta acción se lleva a cabo, esta acción depende de entradas actuales y pasadas. En el caso de este equipo se pretendía que cinco ciclos controlan el prototipo de mediciones (Figura 15): El primer ciclo de *eventos* controla a los demás mediante las acciones que el usuario realiza como primer productor del sistema. Cada *click* es un evento, este evento lo consumen los demás ciclos como una orden. El segundo ciclo de *eventos* sería el de *mensajes*, el cual manda las órdenes de medición y control a los otros ciclos, es decir, a la vez es consumidor del ciclo de *eventos* y productor para los demás ciclos en el sistema. Este ciclo también manda órdenes al ciclo de *temperatura*, el cual controla la temperatura de los LEDs y solo sería un consumidor. El tercer ciclo es el de

programador, éste consume las órdenes del ciclo de *mensajes* para programar una medición posterior y puede actuar como *productor* para controlar el ciclo de las *mediciones*. Finalmente, el ciclo de las *mediciones* recibe información del ciclo de *mensajes* y del ciclo del *programador*, realizando las mediciones de los parámetros fotosintéticos deseados y actuando como productor para el ciclo de *mensajes*. En la Figura 15 se ilustra estos procesos.

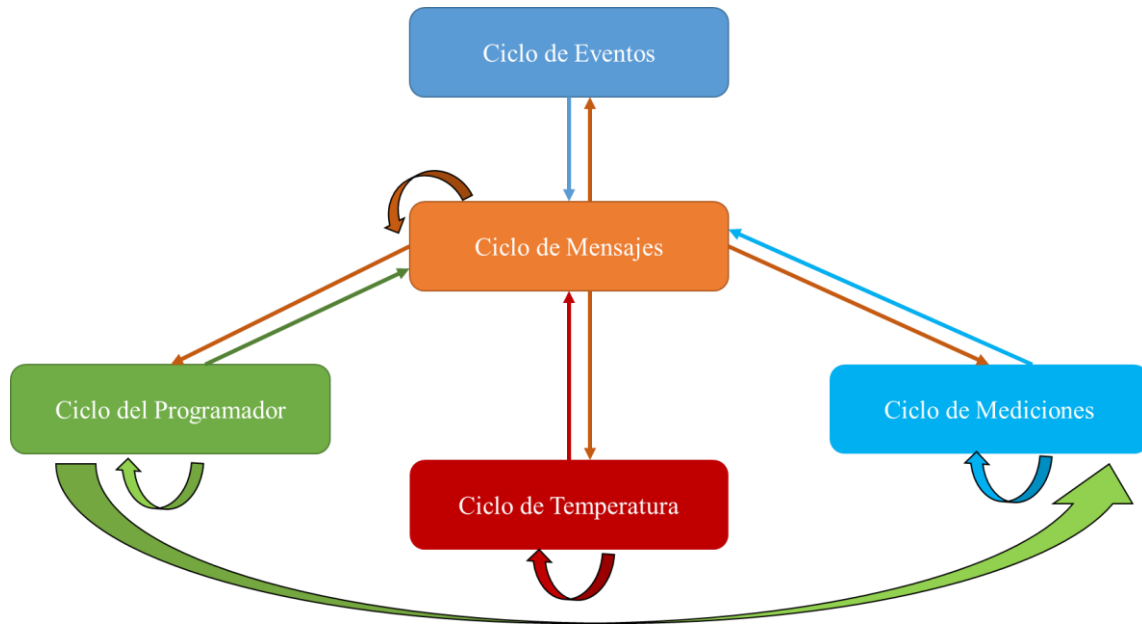


Figura 15. Representación de los ciclos diseñados para el control del prototipo por parte del usuario.
Fuente: Elaboración propia.

Pruebas a realizar al prototipo

Alineación óptica

Es importante que cada uno de los arreglos ópticos estén bien alineados para una correcta iluminación de la muestra y un funcionamiento óptimo del prototipo. De no estar bien alineados, no se obtiene una iluminación adecuada sobre la muestra y por ende una inadecuada medición de la fluorescencia. Ya que cada arreglo óptico está conformado por un telescopio simple, se ajustó la distancia entre el segundo y el tercer lente hasta obtener la iluminación máxima sobre la muestra para cada uno de los LEDs.

Señales del DAQ

Señal eléctrica con el osciloscopio

Los pulsos programados en LabVIEW para el subsistema de adquisición y control fueron medidos con un osciloscopio para su evaluación y sincronización. El osciloscopio puede tomar mediciones muy rápidas; lo que permitió comprobar las señales programadas en LabVIEW. Como se mencionó anteriormente, cada LED necesita de cuatro señales distintas para poder prenderse (CTRL_SEL, CTRL_PWM, CTRL_H y sync). Durante la prueba, estas señales se conectaron físicamente del DAQ al osciloscopio. Las pruebas para la sincronización de las señales son explicadas a continuación.

En primer lugar, se sincronizaron las señales internas del pulso blanco puesto que es el más complejo en cuanto a sus funciones, concretamente la sincronización de las señales CTRL-H y CTRL-SEL. En segundo lugar, se tuvo que sincronizar las señales del LED blanco y naranja con la señal CTRL-SEL del LED blanco y la señal PWM del LED naranja, esto es especialmente importante para el correcto cálculo de los parámetros fotosintéticos, ya que la fluorescencia se mide únicamente en presencia de luz naranja entre cada pulso blanco. En tercer lugar, se comprobó la sincronización de la señal CTRL-H de los LEDs blanco y naranja, esto con el objetivo de asegurar que la intensidad de luz con la que cada LED pudiera modificarse para aplicación del pulso tipo MFP (Tabla 8).

Tabla 8. Prueba de sincronización de la señal CTRL-SEL del LED blanco y señal PWM del LED naranja

| Señales | LED Blanco (ms) | LED Naranja (ms) |
|----------|-----------------|------------------|
| Luz alta | 10 | 1.00E-02 |
| Luz baja | 0.11 | 10.01 |

Fuente: Elaboración propia.

Medición de señales con circuito incluido

Cuando se integró el circuito eléctrico para encender los LEDs, se necesitaba probar el correcto prendido y apagado de las distintas señales provenientes del DAQ, ya que puede que, al integrar el circuito eléctrico, se hubieran podido alentar la velocidad en que los LEDs se encendieran. De igual manera con el osciloscopio, se probó cada una de las señales y en conjunto.

Mediciones en plantas

Para medir la eficiencia cuántica (F_v/F_m) se determinaron distintas duraciones del pulso de medición ya que éste afecta este cálculo fotosintético. Las duraciones del pulso de medición partieron de la mínima posible para hacer las mediciones y que la señal pudiera ser detectada por el fotodiodo, es decir que hubo un total de 6 duraciones diferentes del pulso de medición (6 μ s, 10 μ s, 15 μ s, 20 μ s, 25 μ s, y 30 μ s). Estas mediciones se realizaron en cinco Nochebuenas (*Euphorbia pulcherrima*), en la primera hoja sana y madura, se realizaron las mediciones en distintos puntos. Las plantas fueron adquiridas y aclimatadas una semana antes de las mediciones, se mantuvieron en el laboratorio y fueron constantemente regadas con agua del grifo. Antes de hacer cada medición la hoja medida fue adaptada previamente a la oscuridad durante 20 minutos.

Análisis estadístico

Para determinar qué variables y parámetros elegidos en las mediciones afectaban con mayor medida el cálculo de la eficiencia cuántica (F_v/F_m) se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) en los diferentes grupos divididos por la duración del pulso de mediciones (6 μ s, 10 μ s, 15 μ s, 20 μ s, 25 μ s, y 30 μ s). Los análisis fueron realizados con el lenguaje de programación R.

CAPITULO IV

Resultados

Subsistema de Adquisición y Control

Se programó un VI en LABVIEW al que se denominó *Protocolo Rosina.vi* para el control de los pulsos naranja, blanco e infrarrojo. El VI implementó un protocolo que utilizan tres tipos de señal para prender cada uno los LEDs en forma de canales, los cuales no son modificables. La forma en que se iluminan las muestras se puede cambiar en ajustes simples y ajustes avanzados dependiendo de la complejidad del pulso (Figura 16 y Figura 17). Existen diferentes parámetros que son modificables, en cuanto a la duración, tipo e intensidad de los pulsos.

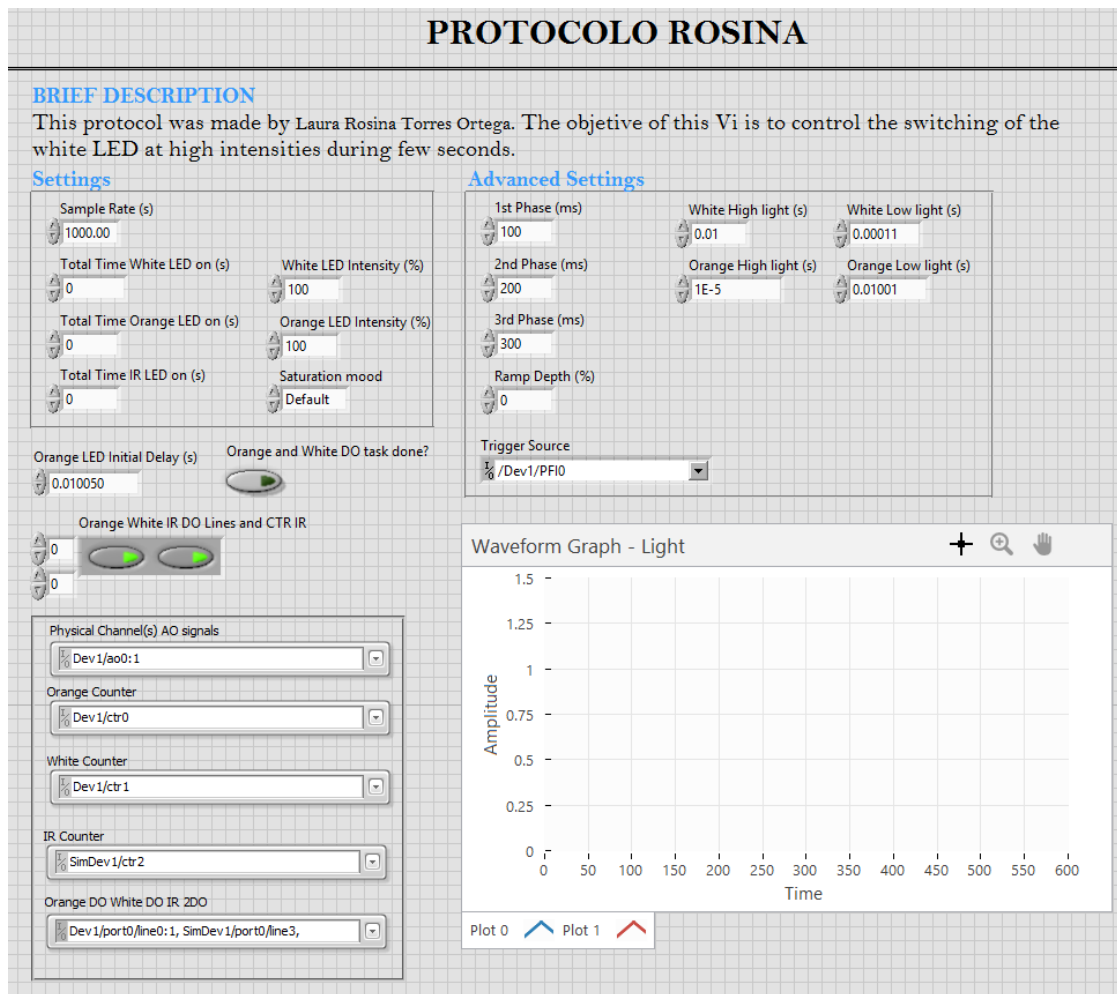


Figura 16. Vista frontal del “Protocolo Rosina.vi” para el control de los pulsos blanco, naranja e infrarrojo.

Fuente: Elaboración propia.

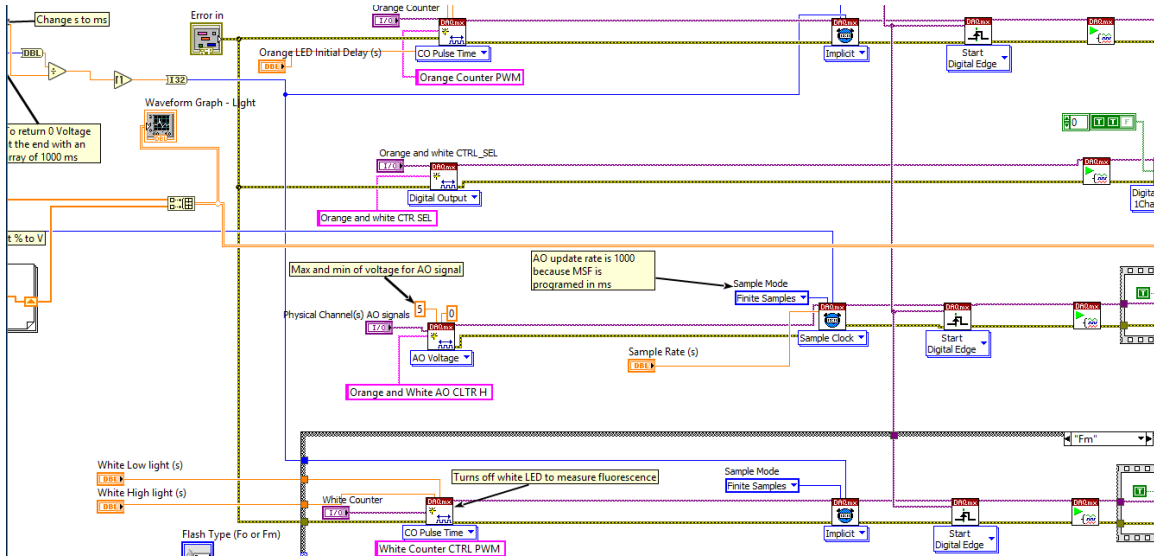


Figura 17. Vista de diagrama de bloque del “Protocolo Rosina.vi” con las señales para prender cada uno de los LEDs.

Fuente: Elaboración propia.

Una vez programado el *Protocolo Rosina.vi*, se comprobó su funcionamiento a través de la medición de los pulsos utilizando el osciloscopio para medir cada una de las señales. En la primera prueba se corroboró la correcta aplicación del pulso tipo “MFP” y “pulso estándar”. Se ajustaron las frecuencias de medición en la señal CTRL_H y CTRL_SEL para que se sincronizaran correctamente. Para el pulso tipo “MFP”, la señal CTRL_H fue ajustada a una intensidad de 100% (1.5 V) durante los primeros 300 ms con una intensidad de 100%, después disminuimos la intensidad del LED hasta un 40% de profundidad durante 400 ms y finalmente se volvió a establecer a una intensidad del 100% durante otros 300 ms. Paralelamente, se envió una señal de 5V en la señal CTRL_SEL durante 1000 ms (Figura 18).

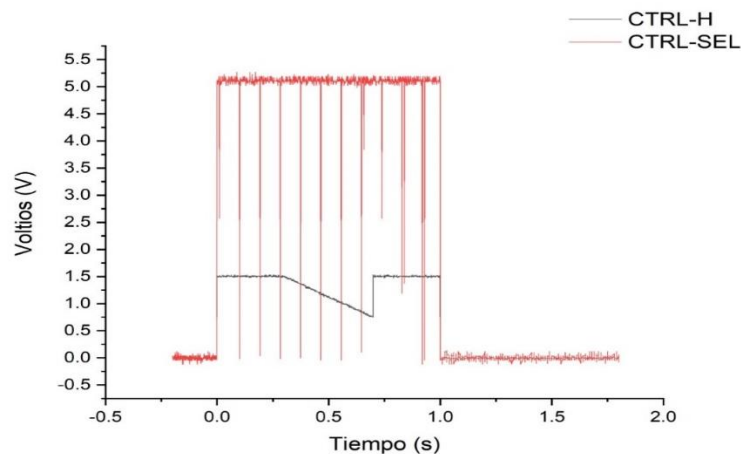


Figura 18. Gráfica de la sincronización de las señales CTRL_H y CTRL_SEL en el LED blanco.

Fuente: Elaboración propia.

A continuación, se comprobó la sincronización entre la señal de la luz blanca y la señal de la luz naranja. Esto se realizó midiendo la señal de CTRL_SEL de la luz blanca y la señal CTRL_PWM de la luz naranja, ambas generando una tensión de 5V. Para la duración del prendido y apagado de las señales, se eligieron parámetros de acuerdo a la patente WO 2013/181433 A3 (Kramer et al., 2016), se enciende la luz blanca durante 10 ms, y luego se apaga durante 0.110 ms, en los primeros 10 ms donde la luz blanca está prendida la naranja se apaga completamente, la luz naranja se prende al contrario, es decir se prende hasta 10.060 ms después durante sólo 0.050 ms para luego apagarse nuevamente tal como se ilustra en la Figura 19.

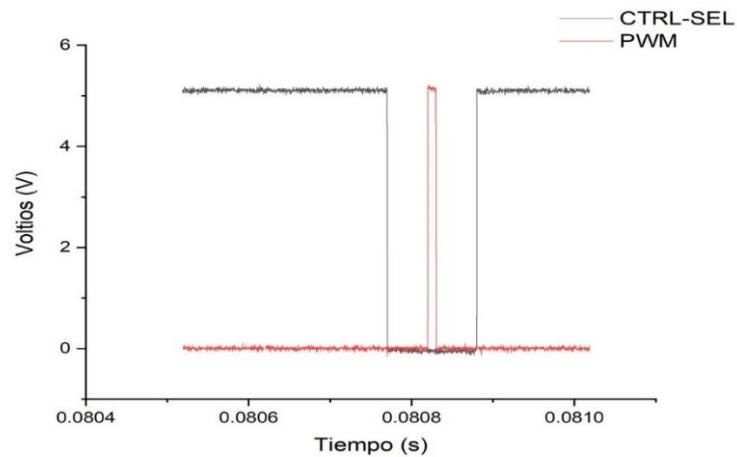


Figura 19. Gráfica de la sincronización de las señales CTRL_SEL y CTRL_PWM para el LED blanco y naranja respectivamente.
Fuente: Elaboración propia.

En tercer lugar, se comprobó la sincronización de la señal analógica (CTRL_H) de ambos tipos de pulsos (saturante y modulado). Las señales analógicas de ambos LEDs se activan con el “Disparador”, una señal de 5V. La señal CTRL-H consiste en una señal de 1.5V, lo que el circuito de alimentación del LED interpreta como una orden de encender el LED a un 100% de intensidad. Se aplica el modo “MFP”, donde se tiene una duración de 300 ms para la primera fase, 400 ms para la segunda (con profundidad de 65%) y 300 ms para la última; mientras que la señal naranja simplemente se prende de manera continua a un 50% de intensidad (0.75 V), como se puede observar en la Figura 20.

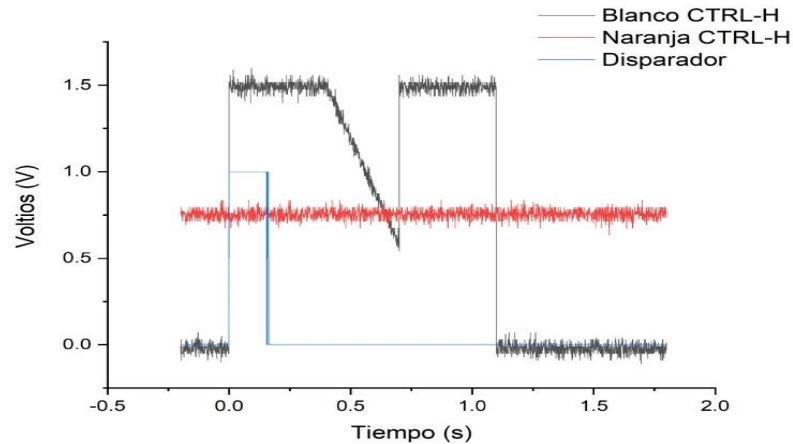


Figura 20. Gráfica de la sincronización de las señales CTRL_H para el LED blanco y naranja respectivamente.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 21. Utilización del osciloscopio adquirido durante las pruebas eléctricas para sincronizar las señales CTRL_SEL del LED blanco y la señal CTRL_PWM del LED naranja.

Fuente: Elaboración propia.

El subsistema de Alimentación y el subsistema de Adquisición y Control debían trabajar en conjunto para la medición de las plantas (Figura 22). Para ello, se desarrollaron tres programas: *Trigger.vi*, *Photodiode Input Control.vi* y *Probe 1 Measurements.vi* que controlan el software y hardware del prototipo para las mediciones de fluorescencia en las plantas (Figura 23, Figura 24 y Figura 25).

El programa *Probe 1 Measurements.vi* (Figura 25) tiene como objetivo ejecutar las mediciones, contiene a los programas *Trigger.vi*, *Photodiode Input Control.vi* y *Rosina.vi*, (Figura 23). Primero el programa *Trigger.vi* (Figura 23), se da la orden de comenzar a *Protocolo Rosina.vi* y al programa *Photodiode Input Control.vi* (Figura 24) para que comiencen de manera sincronizada. El *Protocolo Rosina.vi* controla el apagado y encendido de los LEDs para las mediciones y el programa *Photodiode Input Control.vi*, escribe los datos provenientes del fotodiodo, lee una entrada analógica, proveniente de la señal de fluorescencia, estos datos se

almacenaron en la memoria interna el DAQ, que consta de una muestra finita de dos millones de valores. Durante las mediciones las muestras fueron almacenadas en la memoria del DAQ y después en la computadora para hacer los cálculos fotosintéticos: F_o , F_m y F_v/F_m .

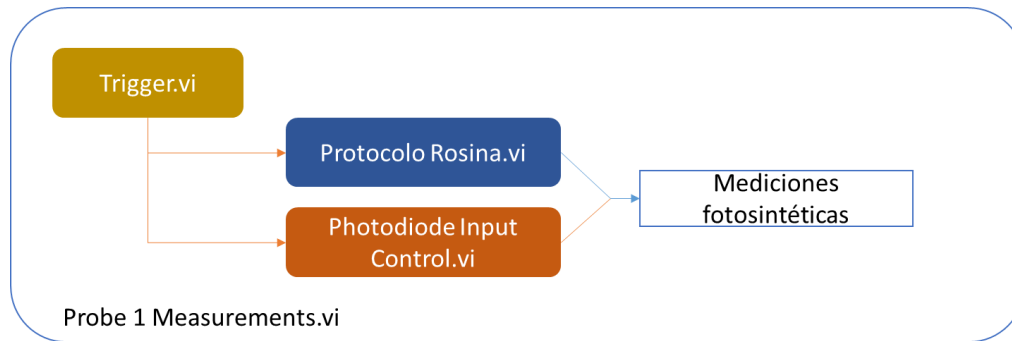


Figura 22. Representación gráfica del orden de ejecución de los programas para medición en plantas.
Fuente: Elaboración propia.

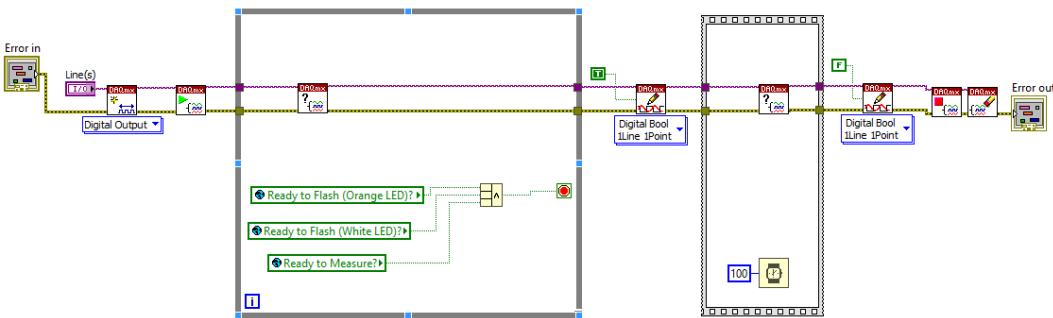


Figura 23. Vista del diagrama de bloque del programa llamado “Trigger”.
Fuente: Elaboración propia.

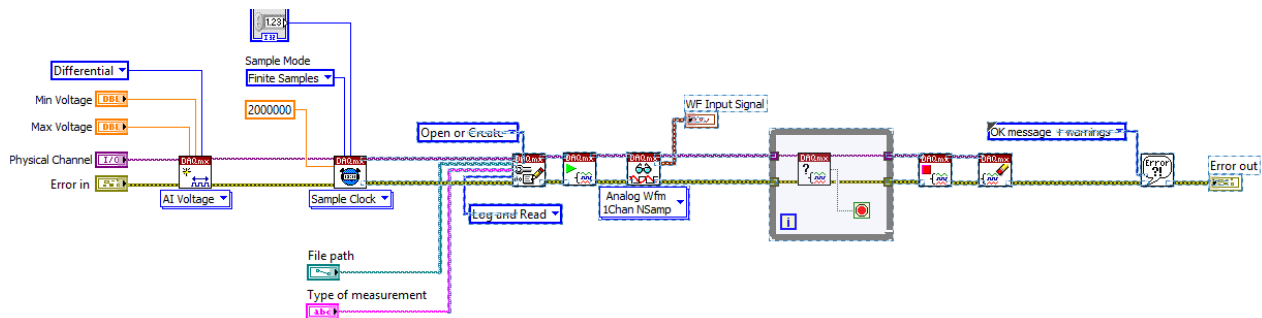


Figura 24. Vista del diagrama de bloque del programa llamado “Photodiode Input Control.vi”.
Fuente: Elaboración propia.

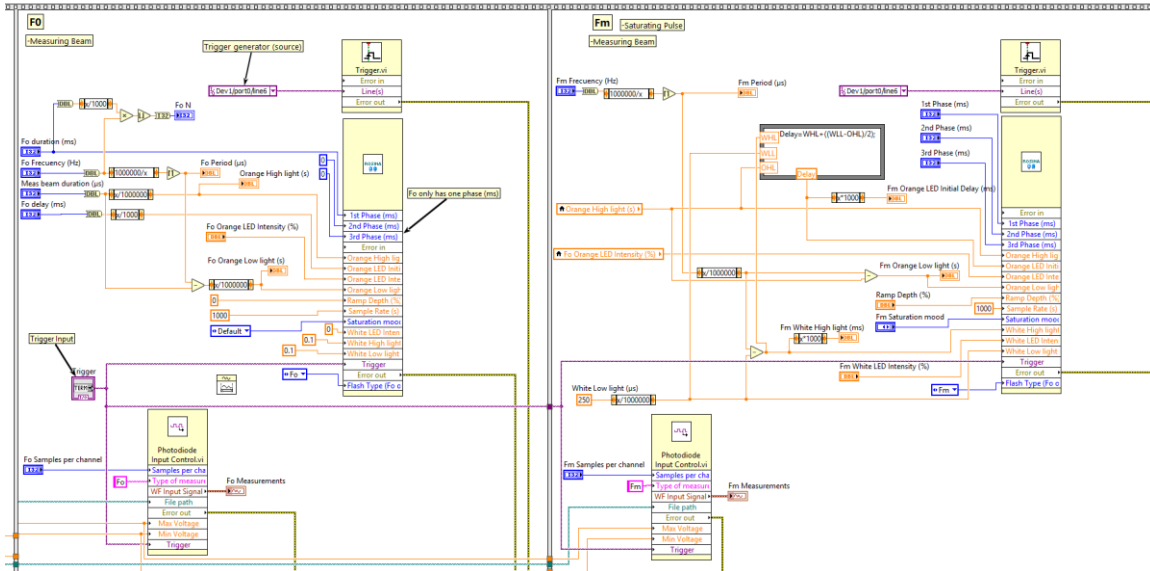


Figura 25. Vista del diagrama de bloque en el programa “Probe 1 Measurements.vi”.

Fuente: Elaboración propia.

Subsistema de Alimentación de los LEDs

En principio, nuestra intención era usar tres LEDs alimentados por un circuito cada uno para controlar su frecuencia, intensidad y sincronización. De esta manera se diseñó el circuito *pulso saturante* para alimentar al LED blanco, circuito de *pulso de mediciones* para alimentar al LED naranja y el circuito del LED infrarrojo (Figura 11). La dificultad en estos circuitos es que hay pines que hacen funciones de señal, es decir que solo necesitan un pequeño estímulo para ejecutar su función, por lo que usualmente son corrientes bajas y de igual forma voltajes bajos. Por otra parte, se encontró que existen otros pines de potencia donde pasa voltaje más alto y corriente más alta, que involucran a los MOSFETs para el control de los LEDs.

La primera versión del circuito de pulso saturante (versión 1.0) falló porque uno de los pines de señal fue erróneamente conectado a uno de potencia, por lo que la corriente llegó con excesiva fuerza al chip y dejó de funcionar (Figura 26). Cuando conectamos el chip correctamente, se logró prender por momentos el LED blanco con esta versión del circuito, sin embargo, usando el sensor cuántico probamos que la potencia del LED blanco no es suficiente para la intensidad de luz que queríamos lograr. Con el sensor cuántico midiendo frente a la última lente del LED blanco, este alcanzaba unas intensidades de aproximadamente $7,200 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, esta cantidad de luz con la distancia se pierde, de manera que, al medir las plantas, éstas iban recibir menor cantidad de luz. Para poder alcanzar la intensidad de fotones necesaria decidimos que trabajaríamos únicamente con el LED naranja, simulando la función del LED blanco. En teoría el LED naranja podría simular el trabajo del LED blanco, ya que la clorofila tiene ese espectro de absorción (617 nm).

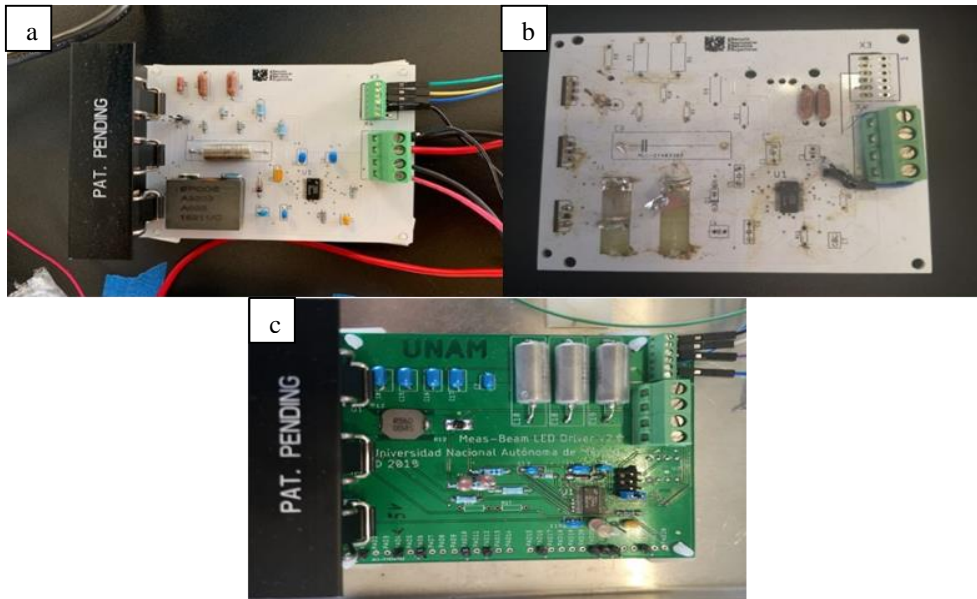


Figura 26. Panel (a) muestra la versión 1.0 del circuito de pulso saturante antes de ser probado. Panel (b) muestra la misma versión ya probada e inutilizada. Panel (c) muestra la versión 2.5 del circuito de pulso saturante.

Fuente: Elaboración propia.

La segunda versión del circuito de pulso saturante (versión 2.0) tuvo varios errores, la conexión del V_{in} en el chip era incorrecta y existía una resistencia mal posicionada, la caída del voltaje de entrada en el divisor de voltaje no era la esperada, el voltaje no disminuía y entraba con alta tensión al circuito. Esto se resolvió cambiando el posicionamiento de resistencia para conectar el chip correctamente. Otro error fue que uno de los capacitores necesitaba una capacitancia de al menos $5 \mu\text{F}$, y en su lugar tenía por error una capacitancia de 15 pF , éste se cambió por una capacitancia adecuada de $6.8 \mu\text{F}$. El 3) error fue que existía poca tensión para que los LEDs se pudieran prender, se cambió la fuente de poder que suministra al circuito del LED de 5V a 12V , pero al cambiar la tensión de entrada (V_{in}) cambia también la inductancia necesaria en el sistema, se tuvo que recalcular la inductancia necesaria (Ecuación 2.) por un inductor de $0.58 \mu\text{H}$.

$$L = \frac{(12V_{in})(3.15Vf) - (3.15Vf)^2}{(0.2)(1000000\text{Hz})(20A)(12V_{in})}$$

$$L = 0.59\mu\text{H}$$

Ecuación 2.

El pin FB (retroalimentador negativo) no estaba funcionando correctamente, ya que se activaba y apagaba el LED. Este retroalimentador negativo funciona de tal manera que cuando existe un voltaje de salida mayor a 1.3V , el LED se apaga. Para evitar esto se agregó un potenciómetro, que tiene la capacidad de modificar la resistencia de manera que el voltaje de salida se mantuvo menor a 1.3V y la retroalimentación negativa no se activó.

Al corregirse estos cuatro errores, la versión modificada (versión 2.5) funcionó de la manera esperada, la mayor prueba era el control analógico de la señal para prender el LED naranja, con el sensor cuántico se fue midiendo el cambio de intensidad en relación al control analógico del LED desde intensidad al 0% hasta un 90% de su capacidad (como máximo 1.5V) y así se comprobó que efectivamente el control analógico del LED funcionaba (Figura 27).

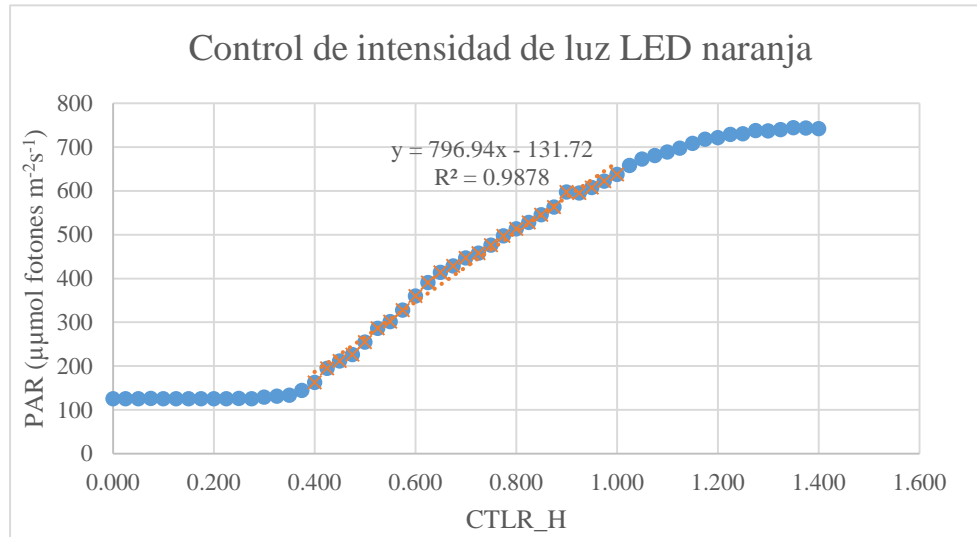


Figura 27. Mediciones del control analógico (CTRL_H) en el LED naranja utilizando el sensor cuántico.

Fuente: Elaboración propia.

Con el objetivo de trabajar con mayor seguridad, y dado que se trabajan con tensiones de 127 Volts, se añadieron optoacopladores ópticos para aislar los circuitos de los LEDs del DAQ. Los acopladores ópticos contienen un emisor óptico que está acoplado ópticamente a un detector a través de algún tipo de medio eléctricamente aislante. Esto permite el paso de información de un circuito a otro de manera unidireccional y evita que la corriente regrese dañando al circuito emisor (Brown & Salina, 1996).

Al sustituir el circuito de pulso saturante con el de mediciones se construyó un circuito externo para hacer el trabajo del circuito de mediciones, en este circuito se generó una señal simple de tipo PWM para poder hacer las mediciones con el fotodiodo (Circuito PWM de mediciones, véase Figura 28). Ambos circuitos, el circuito de *pulso saturante* versión 2.5 y el circuito PWM de mediciones prendían el mismo LED, para evitar algún error de sincronización entre ambos, se agregó una herramienta de compuerta lógica para evitar algún error en la electrónica del circuito de (tipo AND) y añadiendo un inversor (Figura 29). De esta manera nos aseguramos que sólo cuando el circuito de *pulso saturante* versión 2.5 se apague, el *circuito PWM de mediciones* se prenda (Tabla 9).

Tabla 9. Representación binaria de puertas lógicas para el encendido del circuito de Mediciones y Pulso Saturante.

| Pulso Saturante | PWM Mediciones | PWM Mediciones* |
|-----------------|----------------|-----------------|
| 1 | 1 | 0 |
| 1 | 0 | 0 |
| 0 | 1 | 1 |
| 0 | 0 | 0 |

Fuente: Elaboración propia.

Nota: El signo * se usa solo para diferenciar entre el circuito PWM de mediciones antes y después de la compuerta lógica.

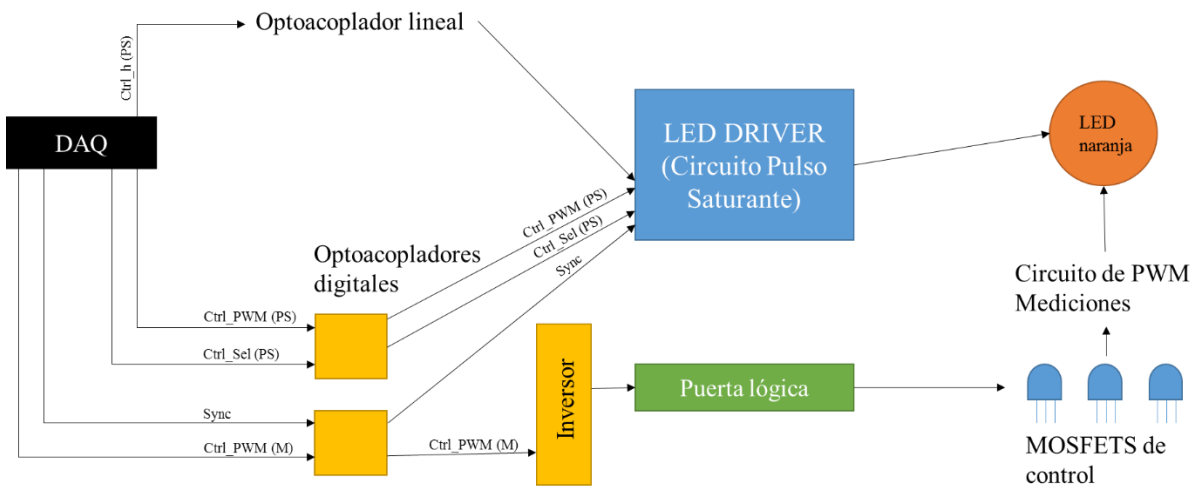


Figura 28. Nueva representación gráfica del reajuste en el subsistema de alimentación.

Fuente: Elaboración propia.

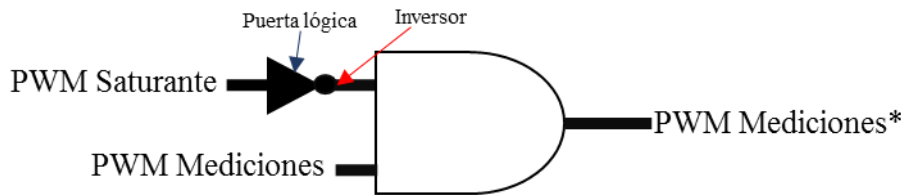


Figura 29. Diagrama de puerta lógica implementada.

Fuente: Elaboración propia.

El circuito que generaba la señal PWM para hacer las mediciones funcionaba correctamente, ya que se probó con un programa sencillo manual de LabVIEW. Sin embargo, el circuito *pulso saturante* versión 2.5 se quemó después de utilizarse por un rato. Finalmente, optamos por utilizar un circuito hecho a la medida para encender el LED naranja a máxima potencia simulando el pulso saturante. Este circuito es el modelo LT3743 para el control del LED naranja, este circuito no posee una salida analógica, solo una señal PWM. En este sentido, la programación de las señales no cambió, pero el pulso de tipo MFP no pudo incluirse porque éste se

genera a través de un cambio de intensidad con una señal de tipo analógica. Para evitar dañar este circuito y reducir la complejidad electrónica entre los dos circuitos, en lugar de usar un solo LED naranja se usaron dos LEDs naranjas, uno conectado al *circuito de mediciones* y otro al nuevo circuito de *pulso saturante* (Figura 30 Figura 31)(Tabla 10).

Tabla 10. Actualización final de las señales en el circuito de Mediciones y Pulso Saturante

| Circuito | Tipo de Señal | LED |
|-----------------|---------------|---------|
| Mediciones | Ctrl_PWM | Naranja |
| Pulso Saturante | Ctrl_PWM | Naranja |

Fuente: Elaboración propia.

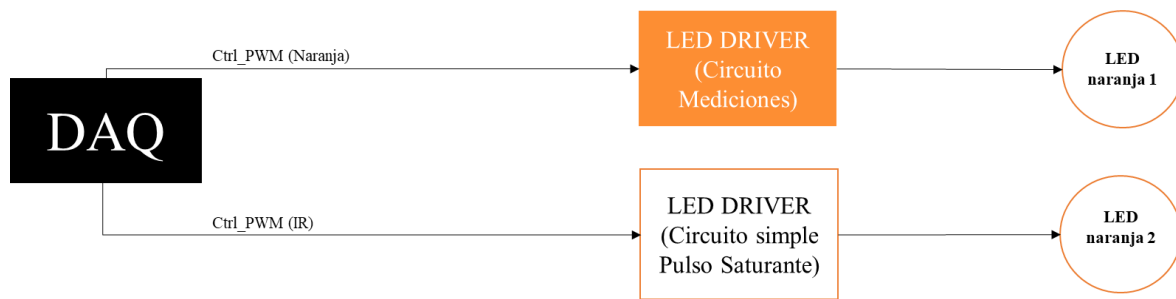


Figura 30. Última versión del subsistema de Alimentación de los LEDs.

Fuente: Elaboración propia.

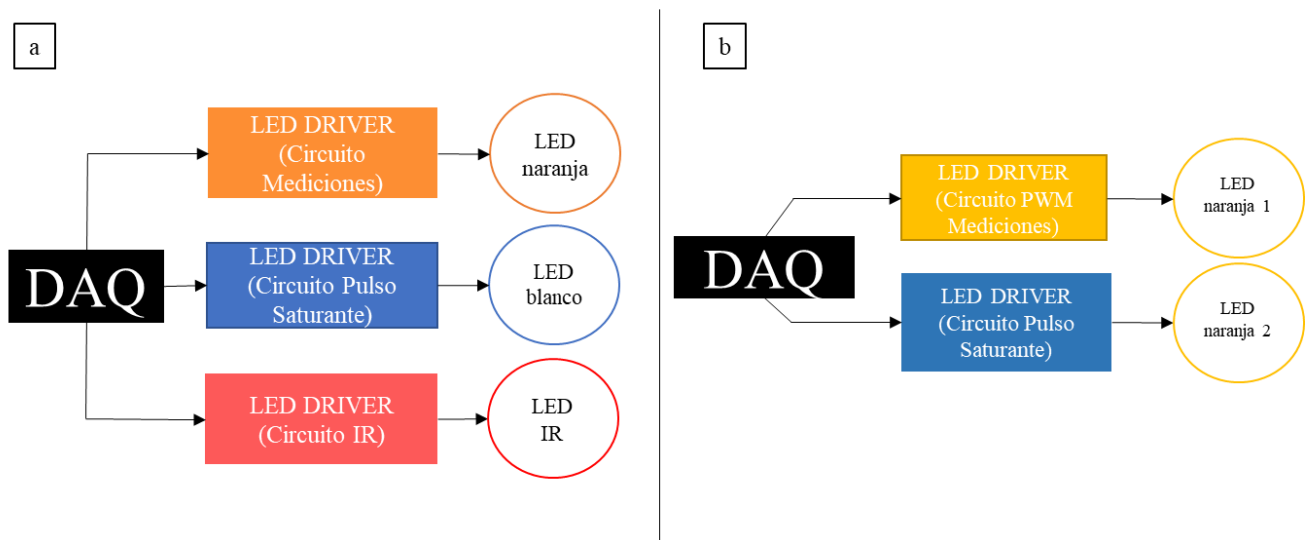


Figura 31. Diagramas comparativos entre primera y última versión del subsistema de alimentación.

Fuente: Elaboración propia.

Subsistema de Temperatura

El subsistema de temperatura tiene el objetivo de mantener los LEDs trabajando a una óptima temperatura, enfriando éstos mediante un elemento termoelectrico. Esto es de suma importancia porque si se incrementa la temperatura de los LEDs durante un largo periodo de tiempo, estos trabajan a una menor eficiencia, e incluso puede cambiar la longitud de onda a la que éstos emiten (VL Lighting Solutions, 2019). Primeramente, los dos controladores L298N, que controlan las celdas termoelectricas se ensamblaron en la caja metálica, como se muestra en la Figura 32. En seguida, se probó su funcionamiento cuando se encendieron los LEDs, de manera que se comprobó que las celdas termoelectricas se encendieron. Lo siguiente fue introducir el termopar en las estructuras metálicas del prototipo, para que la temperatura del LED se midiera desde el centro y por dentro, el termopar se conectó al chip amplificador que traduce la temperatura dada a un voltaje y de éste al software para el control de temperatura programado (Figura 33).

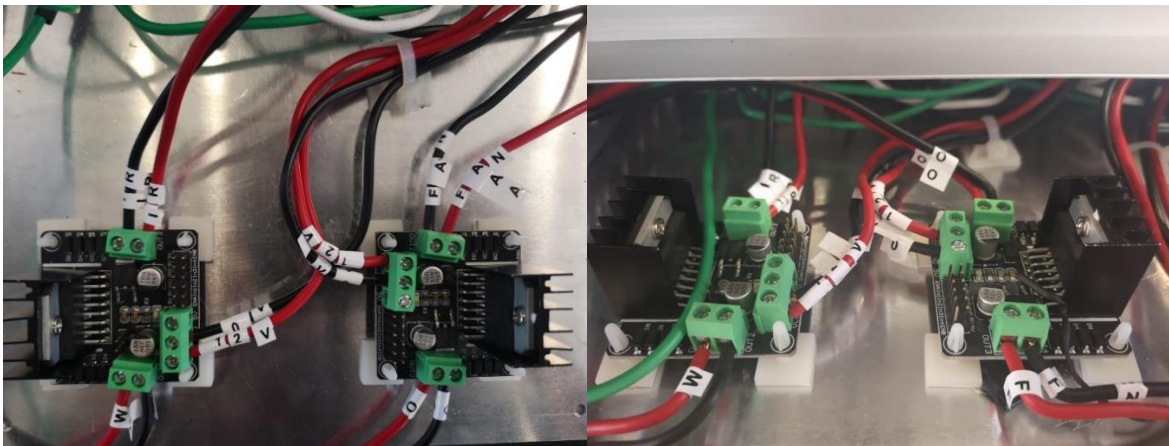


Figura 32. Implementación final de los dos motores de control de temperatura en la caja metálica.

Fuente: Elaboración propia.

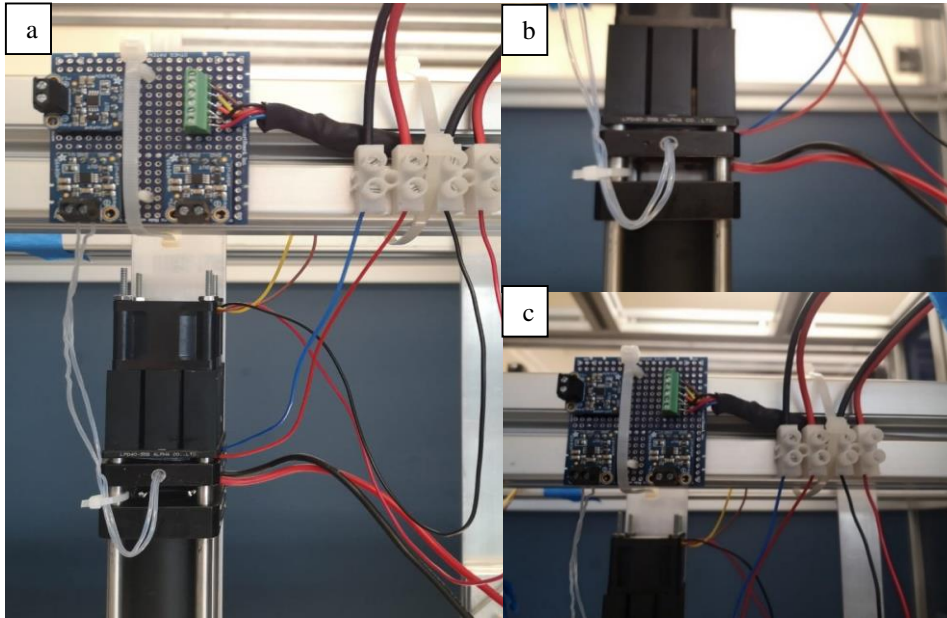


Figura 33. Panel (a) muestra en general parte del subsistema de Control de Temperatura. Panel (b) muestra el sensor de temperatura dentro de la pieza modular óptica. Panel (c) muestra la conexión del termopar con el chip traductor de temperatura.

Fuente: Elaboración propia.

En la programación de del software, se utilizó un ciclo en donde se abrieron dos canales, el primero fue para leer la señal del chip de temperatura y recuperar el promedio de las mediciones, el promedio fue introducido al algoritmo PID, teniendo como resultado el apagado o prendido del elemento termoelectrico; este resultado se escribió en el otro canal y es mandado como una orden de prendido o apagado de las celdas termoelectricas (Figura 34).

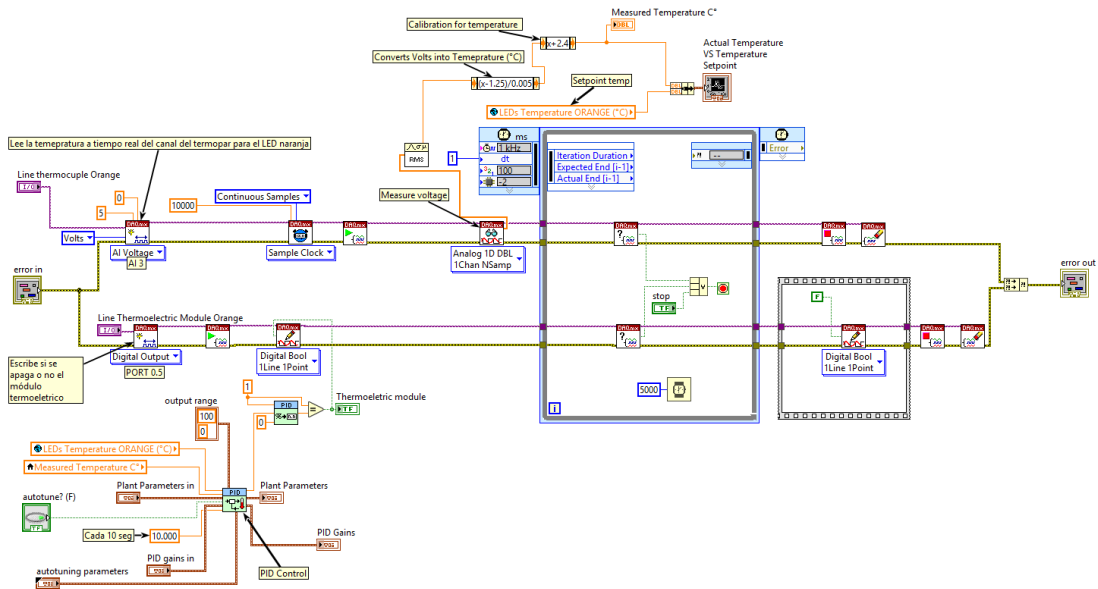


Figura 34. Captura de pantalla del software que controla el encendido de la termocelda.

Fuente: Elaboración propia.

Subsistema Óptico

Las piezas modulares del prototipo fueron ensambladas junto con los arreglos ópticos, poniendo especial cuidado en las distancias focales entre las lentes calculadas con el software de diseño asistido (CAD); esto con el objetivo de la correcta transmisión de luz en el subsistema, ya que de otra manera las propiedades de la luz se modifican, así como su intensidad. En la Figura 35 se muestran fotografías del ensamble.

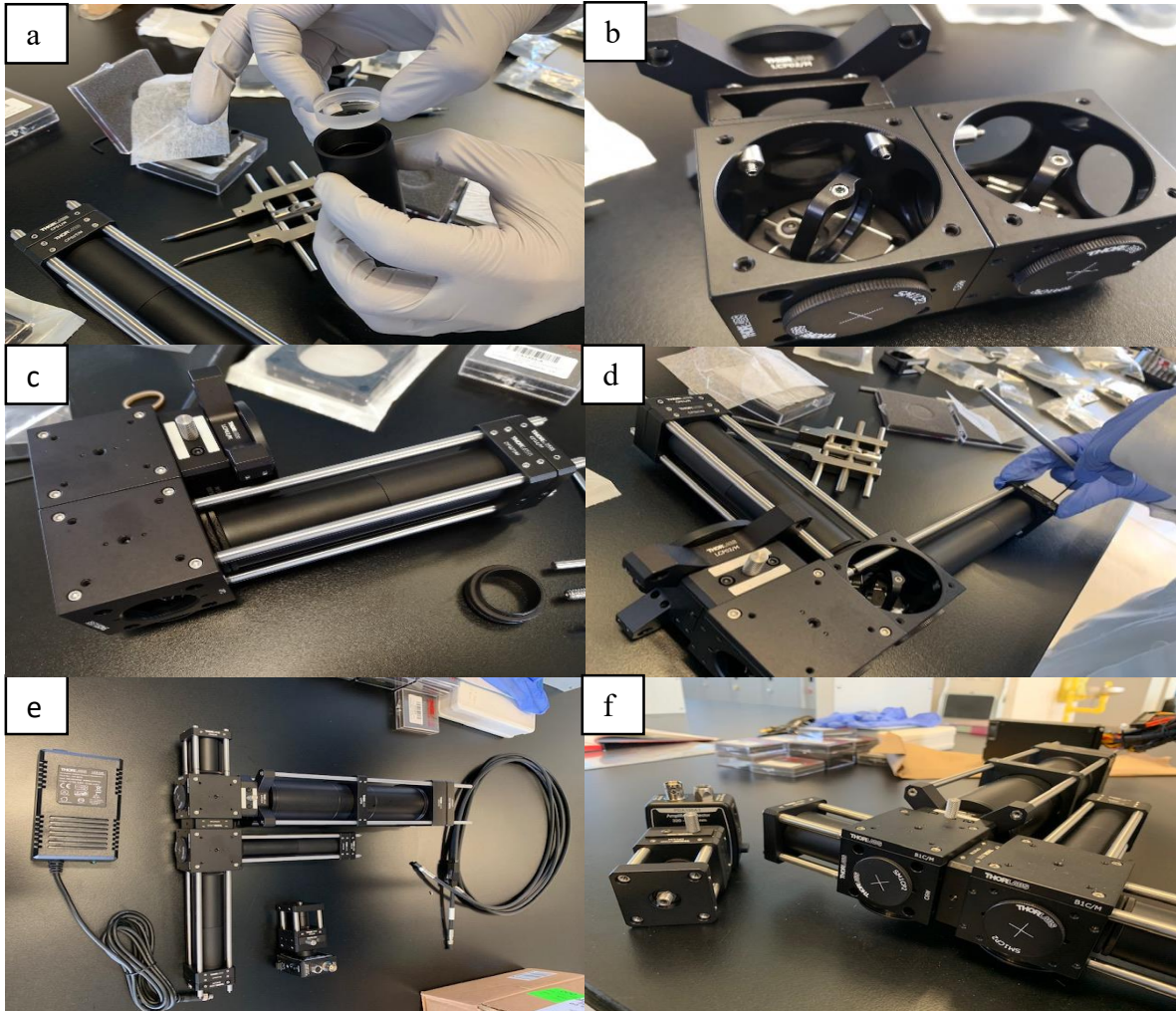


Figura 35. Ensamble y aspecto final del subsistema óptico del prototipo. Los paneles (a y b) muestran comienzo del proceso de ensamble de la estructura metálica y de los lentes en su interior. Los paneles (c y d) muestran proceso de construcción del subsistema óptico. Los paneles (e y f) muestran el ensamble finalizado.

Fuente: Elaboración propia.

Alineación óptica

Para la alineación óptica se tuvieron que probar los dos sistemas (luz blanca y luz naranja/infrarroja) por separado. En conclusión, gracias al sensor cuántico obtuvimos que las distancias focales calculadas fueron las óptimas en cuanto a la obtención de mayor intensidad y calidad de luz (Tabla 11).

Tabla 11. Resultados de la alineación óptica.

| LED | Distancia focal entre las dos primeras lentes | Medición $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ |
|----------------|---|--|
| Blanco | 17 mm | $\sim 7,200$ |
| Naranja | 7.3 mm | $\sim 20,000$ |

Fuente: Elaboración propia.

Con el sensor cuántico, se pudo establecer que los dos lentes finales en forma de telescopio se eliminaran, ya que no ayudaban a colimar la luz blanca. Posteriormente el LED se cambió por uno de mayor potencia. En el caso de la óptica de los LEDs naranja e infrarrojo, también se eliminaron los últimos dos lentes; en este caso se agregó un lente esférico de 16 mm al final, con el objetivo de mantener la luz colimada.

En las fibras ópticas se perdió la mitad de la luz de aproximadamente $20,000 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ se rescataba menos de $10,000 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, por lo que posteriormente se piensa utilizar en su lugar una guía de agua líquida, la cual se espera que conduzca mayor cantidad de luz (Figura 36).

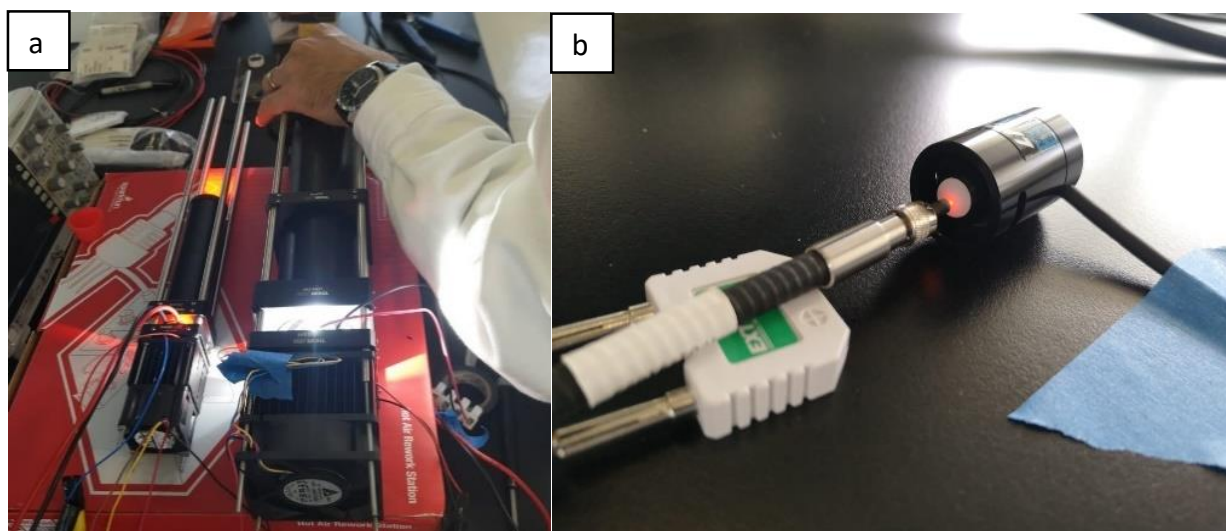


Figura 36. Panel (a) muestra el proceso de alineación óptica y medición de luz. Panel (b) muestra el contacto de la fibra óptica para la medición de luz con el sensor cuántico.

Fuente: Elaboración propia.

Además del cálculo de la luz con las lentes de cada sistema, se alineó la óptica con un láser para determinar la distancia correcta entre las piezas modulares del sistema óptico. Primeramente, desde el láser hasta el primer lente del sistema de luz blanca. Después añadiendo una por una las piezas modulares. Con las

piezas modulares armadas se obtuvieron como máximo $141 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ hasta la fibra óptica (Figura 36).

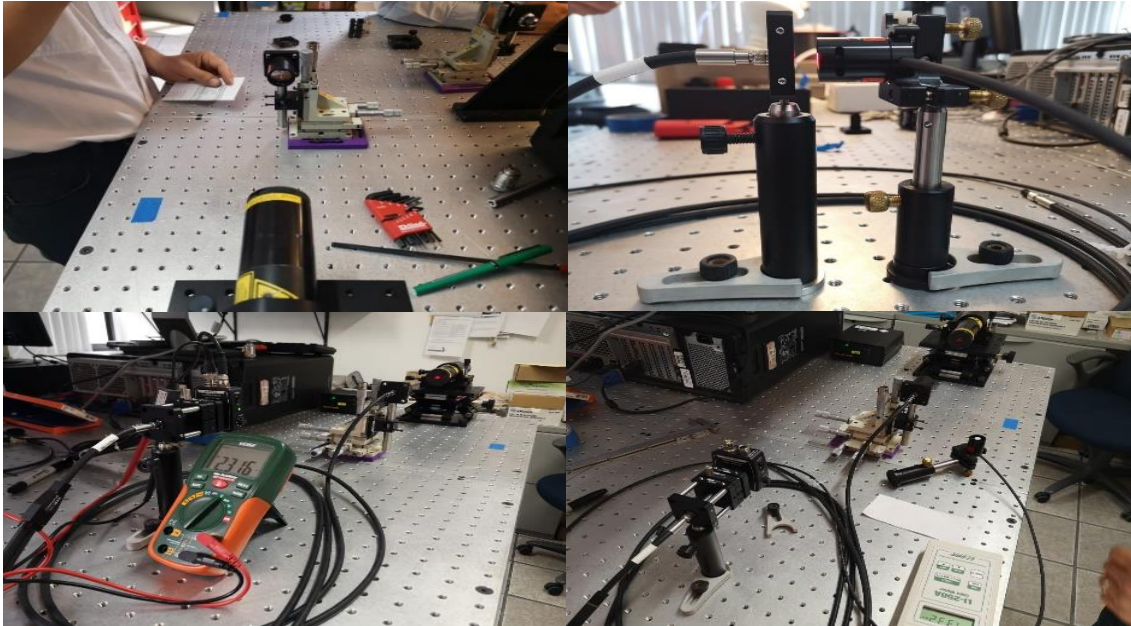


Figura 37. Imágenes de la alineación óptica con láser para maximizar la obtención de luz.

Subsistema de Interfaz con el Usuario

La arquitectura interfaz de usuario fue programada de manera general, en el panel frontal se estableció la sección del Menú, a partir de él se establecieron las siguientes secciones: Programador, Ajustes, Administrador, Iniciar Sesión, Subir Datos, Selector de Mediciones y Monitoreo de Progreso (Figura 38, panel a).

Dentro de cada una de las secciones se trabajaron posibles versiones del diseño, basándonos en los manuales de otros equipos comerciales como el equipo de la marca Walz (Effeltrich, Alemania). De esta manera, una opción en el Selector de Mediciones del prototipo se mostraron los filtros para que el usuario determinara, dependiendo del fluoróforo que se esté midiendo, que se pudiera prender desde ahí el equipo y que se monitoreara la temperatura (Figura 38, panel b). Otro ejemplo es en la sección de Monitoreo de Progreso, donde se optó por una gráfica que muestre la fluorescencia y la temperatura medidas, así como los parámetros fotosintéticos de interés a tiempo real (Figura 38, panel c).

En cuanto a la programación de los ciclos, el ciclo de eventos y el ciclo de mensajes se programaron completamente. De manera que cuando el usuario presionara un botón, correspondía a un evento, y este producía un mensaje a los otros ciclos. La arquitectura de los ciclos de programador, temperatura y mediciones fue incluida en el diagrama de bloques sin los programas que ejecutaban dicho ciclo. En este sentido, de manera independiente los ciclos funcionaban; aunque no se concluyó la programación para que los ciclos trabajasen en conjunto, lo más importante era lograr las mediciones con el equipo a tiempo, a pesar de que los programas fueron ejecutados por separado.

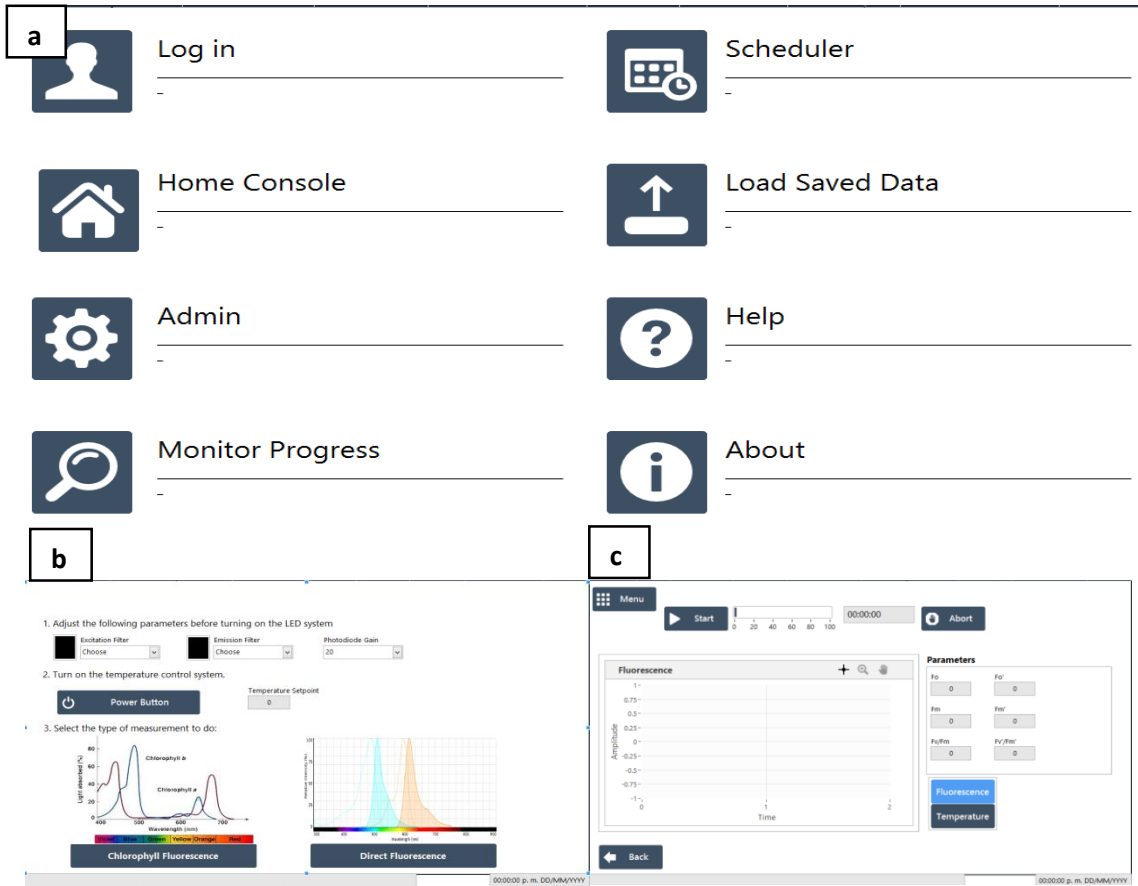


Figura 38. Imágenes del menú de interfaz con el usuario, muestras del selector de mediciones y del monitoreo de progreso.

Fuente: Elaboración propia.

Ensamble del prototipo

Los subsistemas y componentes del prototipo se unieron dentro de una caja metálica de dos niveles. En la Figura 39 se aprecia el proceso de armado del prototipo dentro de la caja, comenzando por el nivel inferior hacia el nivel superior. En la parte inferior se encuentran el subsistema de control de temperatura y las fuentes de poder de todos los componentes eléctricos. Esto se hizo con el objetivo de que el usuario no tenga acceso directo a las fuentes de poder y así contribuir a su seguridad. En la parte superior se encuentra el subsistema de adquisición y control, el subsistema de alimentación de los LEDs y para del sistema de interfaz del usuario. Al principio, el subsistema óptico también estaba integrado, pero por cuestiones de espacio y mecánica, se puso afuera de la caja metálica para la toma de muestras. La caja se puso arriba de un soporte metálico dentro del gabinete, en el lado derecho junto con la computadora. En el lado izquierdo del gabinete se encuentra el subsistema óptico y parte del subsistema de temperatura, ambos subsistemas conectados por cables.

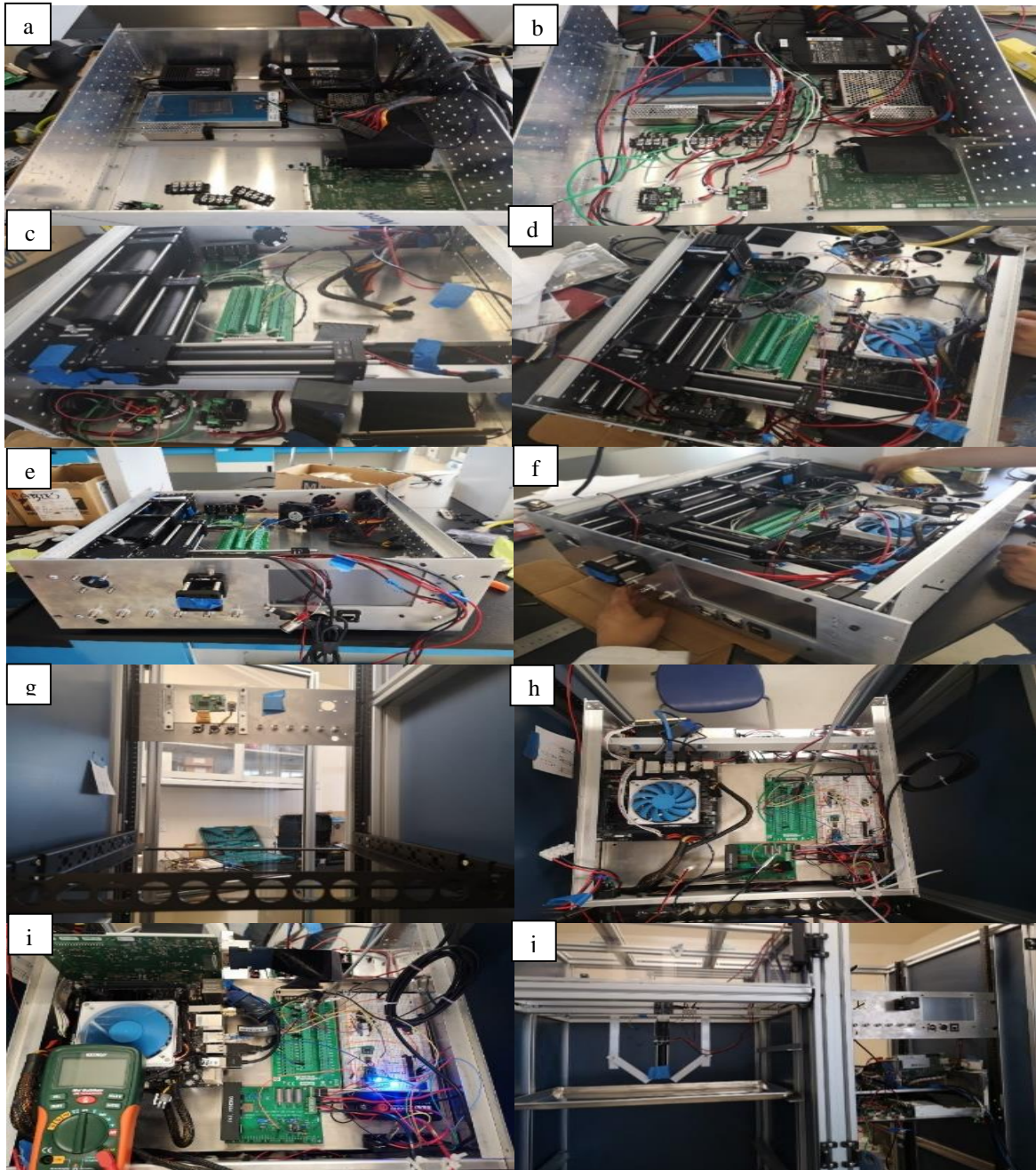


Figura 39. Proceso secuencial de ensamble del prototipo.

Fuente: Elaboración propia

Mediciones en plantas

Una vez que cada uno de los subsistemas funcionaba, se procedió a la medición de plantas. Para demostrar que nuestro prototipo toma mediciones correctamente, se determinó la duración de los pulsos de medición a utilizar. La duración mínima del pulso que el fotodiodo pudo detectar fue de $6 \mu\text{s}$. Con un pulso tan corto, la señal de fluorescencia inducida es muy tenue; por lo que se aumentó la ganancia para poder detectar la señal. Pulsos de medición menores a $6 \mu\text{s}$ resultaron en una señal de fluorescencia tan débil que el fotodiodo no logró distinguir

del ruido de fondo. A partir del mínimo de 6 μs , probamos con las siguientes duraciones: 10 μs , 15 μs , 20 μs , 25 μs y 30 μs (Figura 40).



Figura 40. Medición de eficiencia cuántica del PSII en nochebuenas.

Fuente: Elaboración propia

Para medir F_o , la intensidad del pulso de medición debe ser lo más baja posible para evitar establecer un gradiente de protones en la membrana fotosintética y al mismo tiempo la intensidad debe ser lo suficientemente alta para que fotodiodo pueda discriminarla del ruido. De esta manera encontramos que el pulso de medición no puede ser menor a 6 μs . La señal promedio de medición con esta duración fue de 0.004 u.a., al aumentar la duración de los pulsos el promedio hasta 30 μs el promedio de la señal aumentó casi cuatro veces (Figura 41).

Para obtener el valor más acertado de F_m , se calculó de manera que se ignoraron los primeros 200 ms de toma de muestras cuando se indujo el pulso saturante, ya que el pool de Q_A tarda unos cuantos ms en reducirse completamente. A partir de los 200 ms, la señal de fluorescencia fue promediada. Con la duración más corta del pulso de mediciones se obtuvo una señal promedio de 0.02 u.a. en comparación a una señal promedio de 0.06 u.a. cuando el pulso de mediciones tuvo una duración de 30 μs (Figura 42).

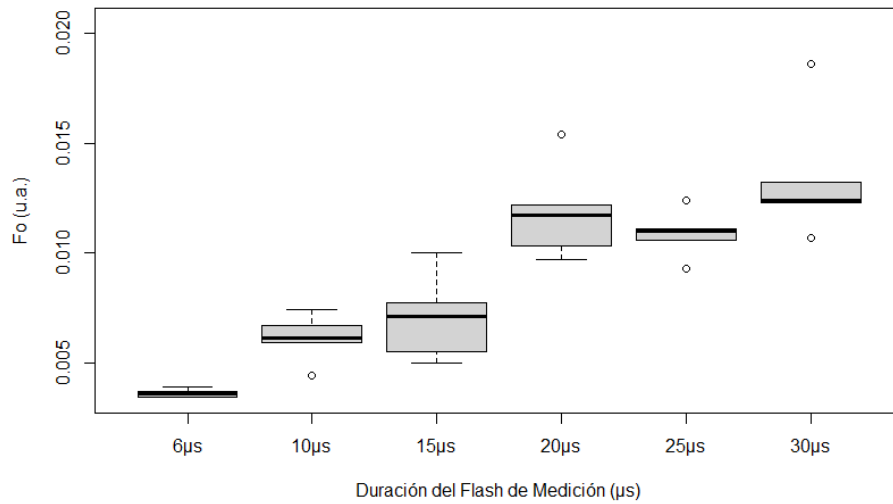


Figura 41. Fluorescencia mínima promedio (F_o) en relación con la duración de los pulsos de medición.

La barra negra significa la mediana de cada grupo, por debajo se encuentra el cuartil 1 (25% de datos), y arriba de la media el cuartil 3 (75% de datos). Los círculos sin relleno son los datos atípicos. (n=5).

Fuente: Elaboración propia.

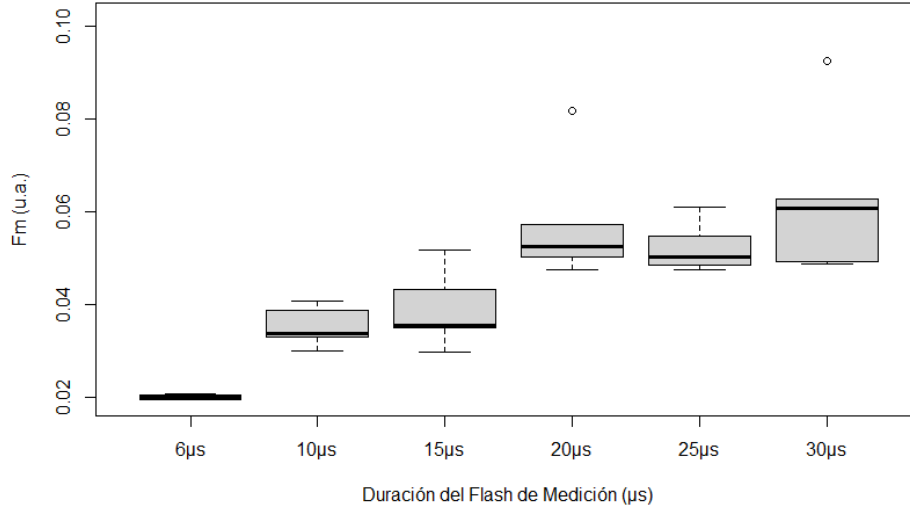


Figura 42. Fluorescencia máxima promedio (F_m) en relación con la duración de los pulsos de medición.

La barra negra significa la mediana de cada grupo, por debajo se encuentra el cuartil 1 (25% de datos), y arriba de la media el cuartil 3 (75% de datos). Los círculos sin relleno son los datos atípicos. (n=5).

Fuente: Elaboración propia.

Al calcular F_v/F_m , los valores disminuyen en relación con la duración del pulso de medición. El promedio de la eficiencia fotoquímica calculada oscila entre 0.82 y 0.84 para pulsos cortos de duración (6 y 15 μs). Después el promedio de la eficiencia cuántica disminuye a partir de los 20 μs y continúa en decremento hasta la duración más larga del pulso de medición de 30 μs (Figura 43).

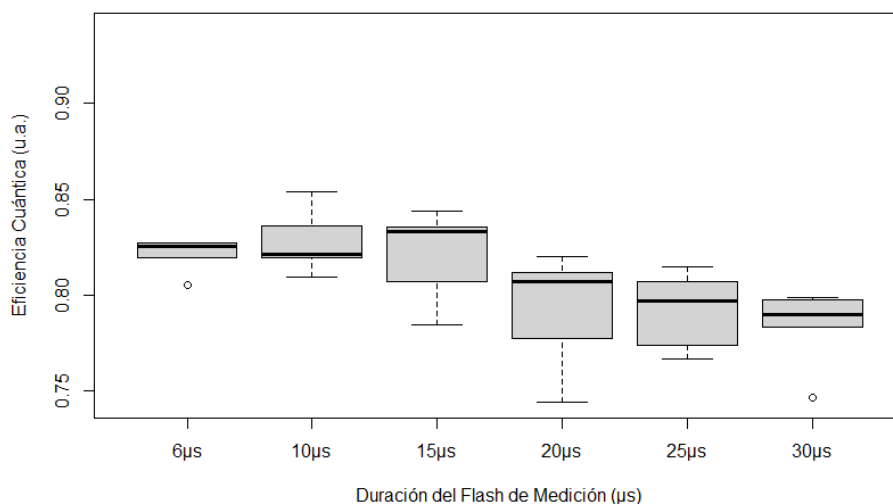


Figura 43. Eficiencia cuántica del PSII en relación con la duración de los pulsos de medición. La barra negra significa la mediana de cada grupo, por debajo se encuentra el cuartil 1 (25% de datos), y arriba de la media el cuartil 3 (75% de datos). Los círculos sin relleno son los datos atípicos. (n=5).

Fuente: Elaboración propia.

Para determinar si la duración del pulso de medición tiene un efecto en los parámetros fotosintéticos obtenidos, se realizó por cada parámetro un análisis ANOVA. Este análisis indica si existe una diferencia significativa entre las medias de los tratamientos en un experimento, en este caso calcula si existe una diferencia entre las medias en relación con la duración del pulso de medición ($H_0 =$ no existe diferencias entre las medias de las distintas duraciones del pulso respecto a F_v/F_m). Primeramente, se realizó un ANOVA para F_v/F_m , donde se obtuvo un P valor = 0.0104; esto indica que la duración del pulso de medición tiene un efecto significativo en el valor de F_v/F_m (Tabla 12), la H_0 es rechazada. Debido a que F_v/F_m se calcula a partir de F_o y F_m , se analizaron estos parámetros por separado para determinar si alguno o ambos parámetros son los responsables de la diferencia observada en F_v/F_m . Los análisis de ANOVA indicaron que la duración del pulso de medición tiene un efecto significativo sobre los valores de F_o y F_m , presentando valores P de 4.31E-08 y 5.46E-06, respectivamente (Tabla 13 y Tabla 14). En conclusión, las diferencias de ambos parámetros, F_o y F_m en relación a los pulsos de medición explican las diferencias en los valores de F_v/F_m .

Tabla 12. ANOVA de un factor, efecto de duración de pulso de medición en el valor de F_v/F_m .

| | Grados de libertad | Suma cuadrática | Media cuadrática | F | P valor |
|--------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------|----------|----------------|
| Pulso de medición | 1 | 0.00923 | 0.0018461 | 3.859 | 0.0104 |
| Residuos | 24 | 0.01148 | 0.0004784 | | |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 13. ANOVA de un factor, efecto de duración de pulso de medición en el valor de F_o .

| | Grados de libertad | Suma cuadrática | Media cuadrática | F | P valor |
|--------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------|----------|----------------|
| Pulso de medición | 5 | 0.0003629 | 7.26E-05 | 21.19 | 4.31E-08 |
| Residuos | 24 | 0.0000822 | 3.42E-06 | | |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 14. ANOVA de un factor, efecto de duración de pulso de medición en el valor de F_m .

| | Grados de libertad | Suma cuadrática | Media cuadrática | F | P valor |
|--------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------|----------|----------------|
| Pulso de medición | 5 | 0.00643 | 0.0012859 | 12.32 | 5.46E-06 |
| Residuos | 24 | 0.002505 | 0.0001044 | | |

Debido a que el efecto de la duración del pulso de medición sobre el valor de F_v/F_m , F_o y F_m , fue estadísticamente significativo, se procedió a realizar dos pruebas estadísticas post hoc: la prueba Tukey y la prueba de diferencia mínima significativa o método LSD. El análisis ANOVA nos ayuda a identificar si existe al menos una media diferente entre las medias de las diferentes duraciones del pulso de medición, pero no nos dice *cuáles* son las medias distintas entre ellas. Para saber cuáles grupos tienen las mayores diferencias se tienen que hacer pruebas de comparaciones múltiples, para examinar cuáles medias son diferentes y calcular su grado de diferencia (Minitab, 2019).

La prueba Tukey y la prueba LSD son ampliamente utilizadas en métodos estadísticos. Sin embargo, la prueba Tukey previene en mayor medida la tasa de error global, pues corrige la tasa de error global al hacer las comparaciones múltiples. Esta es la prueba más potente cuando se realizan comparaciones en parejas únicamente (Minitab, 2019). Mientras que la LSD es más flexible y por ello tiende a cometer con mayor medida el error tipo I en casos donde hay más de tres grupos comparándose. La prueba LSD tiene como ventajas de que es simple y consistentes cuando no se realizan tantas comparaciones y son grupos de tratamiento pequeños (Fallas, 2012).

El resultado de la prueba LSD en el valor F_v/F_m es que se tienen dos grupos “a” y “b” (alfa = 0.05), donde el grupo “a” lo conforman las duraciones de pulso de 6 μs , 10 μs y 15 μs . Las duraciones 20 μs , 25 μs y 30 μs conforman el grupo “b”, estos grupos son diferentes ya que sus medias no se sobrepone entre ellos. De esta manera se puede observar que existe una diferencia en el valor de F_v/F_m a partir de la duración de pulso de medición de 15 μs (Figura 44).

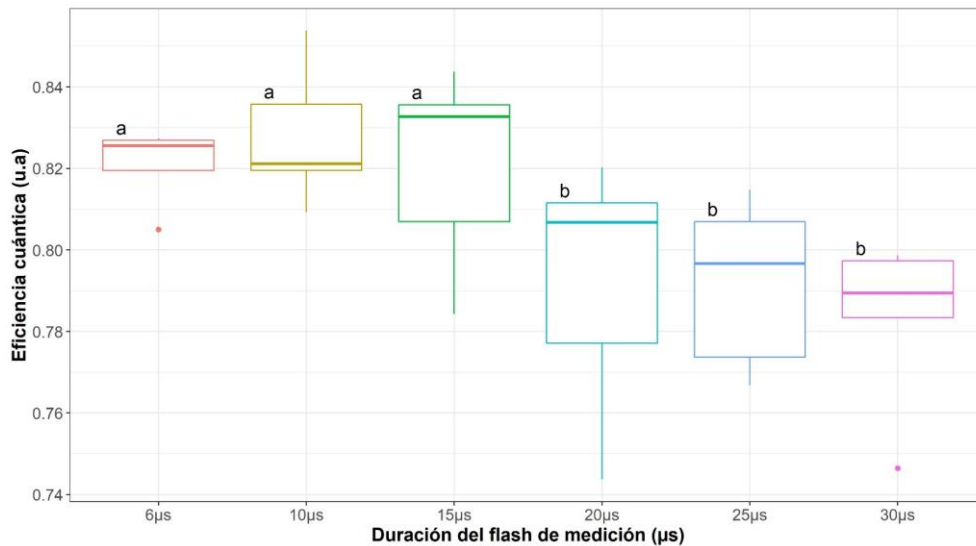


Figura 44. Resultados de prueba LSD para el valor de F_v/F_m .
Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, con la prueba Tukey en el valor F_v/F_m los grupos se identificaron los grupos “a” “ab” y “b” (alfa = 0.05), en este caso las diferencias entre grupos no son tan claras como con la prueba LSD. La cual es más permisible en el cálculo de la mínima diferencia entre medias. El grupo “a” tiene a la duración más larga de 30 μs , el grupo “ab” las duraciones de 25, 20, 25 y 6 μs . Y finalmente el grupo “b” cuyo único grupo es el de 10 μs .

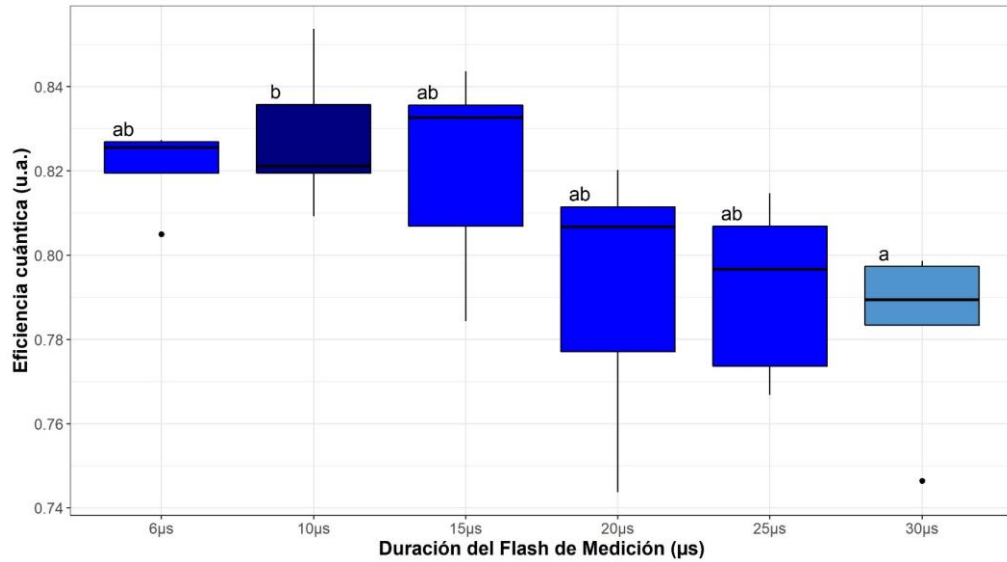


Figura 45. Resultados de prueba Tukey para el valor de F_v/F_m .
Fuente: Elaboración propia.

El valor de F_v/F_m es un resultado de los valores obtenidos en F_o y F_m . Por lo que se realizaron ambas pruebas estadísticas para ambos valores. Con la prueba LSD las medias de F_m se agrupan en los grupos “a”, “ab”, “bc”, “c” y “d” (alfa = 0.05). Se puede observar que la única media que no se sobrepone con otro grupo es el grupo “d” cuya duración de pulso es de 6 μs . La duración de 10 y 15 μs se sobreponen, y las duraciones restantes de 20, 25 y 30 μs se sobreponen entre ellas igualmente (Figura 46).

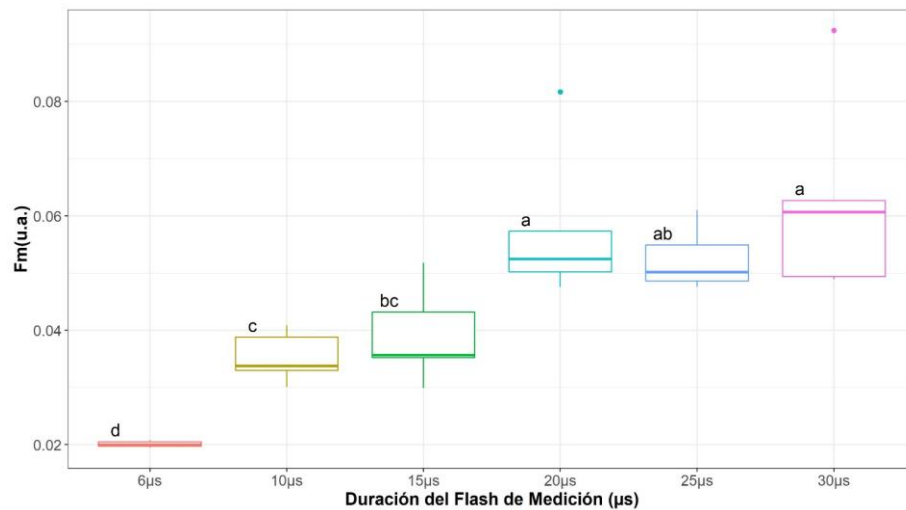


Figura 46. Resultados de prueba LSD para el valor de F_m
Fuente: Elaboración propia.

De manera análoga, con la prueba Tukey las medias de F_m se infirieron los grupos “a”, “ab”, “ac”, “cd”. “bcd” y “d” (alfa = 0.05). Con este análisis se puede ver que en este caso *todas* las medias de los grupos

se sobreponen en *algún* punto, en este caso no se puede ver que existan diferencias significativas específicas entre los grupos de duración del pulso de medición (Figura 47).

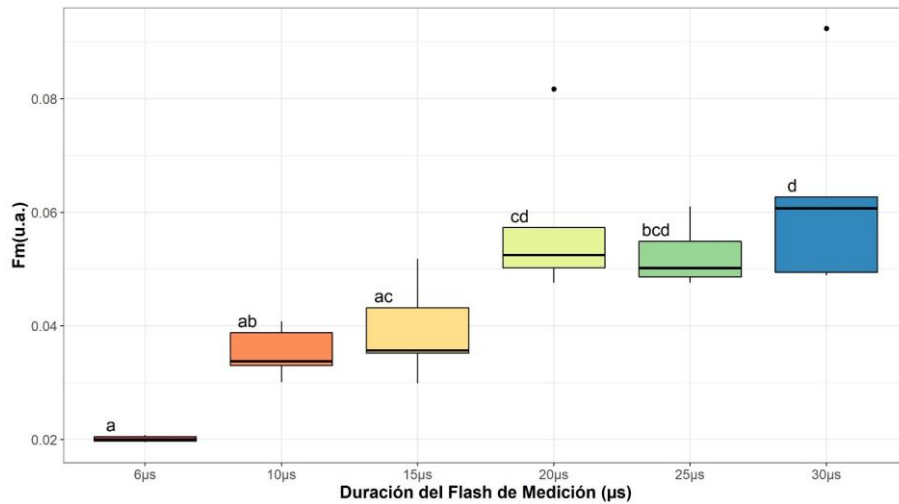


Figura 47. Resultados de prueba Tukey para el valor de F_m .
Fuente: Elaboración propia.

Con ambos análisis (LSD y Tukey) se puede observar que el valor de F_m cambia significativamente sólo en la duración de 6 μs con el análisis LSD respecto a los otros grupos que se sobreponen entre ellos “bc” con “c” y “ab” con “a”. Utilizando un análisis estadístico más estricto como lo es Tukey, podemos concluir que el valor de la media F_m no cambia entre grupos específicos de manera significativa.

Por otro lado, en el caso de F_o , con la prueba LSD se infirieron los grupos “a”, “ab”, “b”, “c” y “d”. Se puede determinar que las únicas medias que no se sobreponen son las medias “c”, “d” de duración de 6 μs y 10 μs respectivamente. Después las medias restantes de 20, 25 y 30 μs se sobreponen entre ellas.

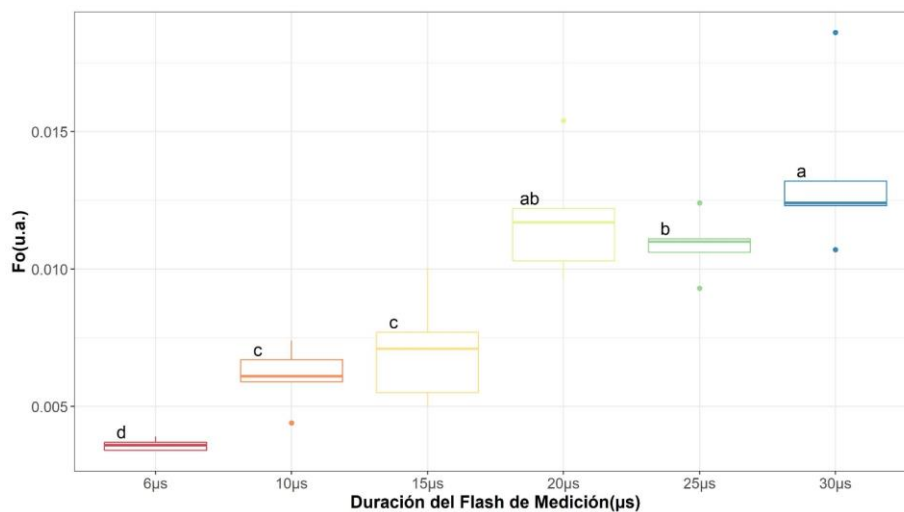


Figura 48. Resultados de prueba LSD para el valor de F_o .
Fuente: Elaboración propia.

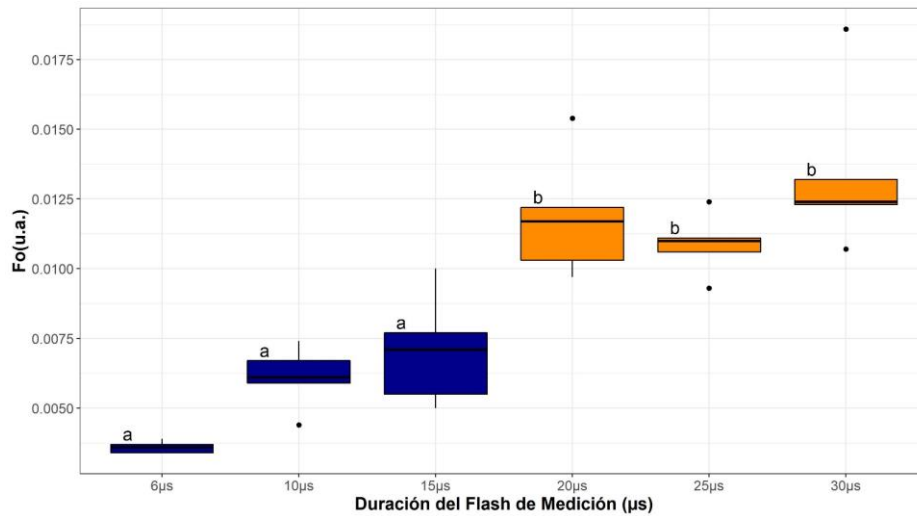


Figura 49. Resultados de prueba Tukey para el valor de F_o .
Fuente: Elaboración propia.

Con el análisis Tukey, para el valor de F_o se infieren dos grupos “a” y “b”. En este caso, las medias de ambos grupos no se sobreponen. El grupo “a” está conformado por la duración de 6, 10 y 15 μ s. Y el grupo “b” está conformado por las duraciones de 20, 25 y 30 μ s. Con ambos análisis el valor de F_o difiere significativamente entre grupos específicos, entre el grupo de las duraciones cortas (6, 10 y 15 μ s) y el grupo de duraciones largas (20, 25 y 30 μ s).

En conclusión, a diferencia del valor F_m , donde no se observan diferencias específicas entre grupos, el valor de F_o sí es afectado por la duración de pulsos cortos o largos utilizando ambas pruebas estadísticas (LSD y Tukey). La duración de los pulsos de medición influye de manera significativa en el parámetro de F_v/F_m utilizando una prueba estadística flexible como lo es la prueba LSD a partir de duraciones arriba de 15 μ s (Tabla 15).

Tabla 15. Resumen de los grupos inferidos estadísticamente con las pruebas post hoc.

| | LSD | Tukey |
|------------------------------------|-------------|------------------|
| F_v/F_m | a,b | a,ab,c |
| F_m | a,ab,bc,c,d | a,ab,ac,cd,bcd,d |
| F_o | a,ab,b,c,d | a,b |

Fuente: Elaboración propia.

Discusión

La hipótesis principal planteada para este proyecto era que el prototipo desarrollado midiera la eficiencia cuántica del PSII con igual o mayor calidad que otros equipos comerciales. Esta hipótesis se acepta debido a que nuestros valores de F_v/F_m son correctos porque: 1) se hizo una correcta adaptación de las muestras a la oscuridad, 2) se midieron longitudes correctas de fluorescencia en el espectro de emisión, 3) el pulso saturante tiene una intensidad adecuada, 4) el pulso para medir F_o es idóneo, y 5) los valores obtenidos para F_v/F_m coinciden con los reportados en la literatura previa para esta especie.

En las mediciones de fluorescencia de clorofila, las muestras deben adaptarse a la oscuridad de forma correcta previo a las mediciones. Cuando las muestras no son adaptadas correctamente a la oscuridad, el parámetro F_o puede ser sobrestimado, ya que el pool de Q_A puede no estar en su totalidad oxidada. Las muestras tienen que adaptarse por lo menos durante 20 minutos a la oscuridad para que las enzimas involucradas en la fotosíntesis sean desactivadas y el gradiente de protones se disipe. Por ejemplo, se sabe que la enzima Rubisco tarda de 2 a 4 minutos en desactivarse, la enzima FNR tarda en desactivarse de manera muy variable entre diferentes especies desde 15 minutos hasta 1 hora. Las otras cuatro enzimas participantes (ATP sintasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBP), fosforibuloquinasa y sedoheptulosa 1-7 bifosfatasa) son dependientes de tiorredoxina, por lo que tiene que existir una reoxidación de la tiorredoxina y el NADPH para que éstas cuatro enzimas sean nuevamente activadas. El ciclo de las xantófilas y los daños por fotoinhibición toman incluso más tiempo (en escala de horas) para su recuperación (Kalaji et al., 2014).

Los equipos comerciales utilizan clips para cubrir a las hojas y lograr una adaptación en la oscuridad. Sin embargo, los clips pueden ser insuficientes y mal utilizados, de manera que la luz incida principalmente en un ángulo paralelo a la hoja medida (Kalaji et al., 2014). En el prototipo desarrollado en lugar de implementar un clip, las plantas son medidas dentro de una cabina (Figura 40) con una adaptación a la oscuridad de al menos 20 minutos antes de las mediciones. La limitante de este procedimiento es que no se pueden hacer cambios a la planta u orientación de los pulsos una vez que la planta está dentro de la cabina.

La mayoría de los equipos de fluorescencia de clorofila miden la señal de fluorescencia en longitudes mayores a 700 nm. A temperatura ambiente, medir a estas longitudes de onda puede generar errores ya que el PSI se vuelve una importante fuente de emisión a estas longitudes de onda. La emisión del PSI comienza a ser mayor que la del PSII a estas longitudes de onda. Detectar la fluorescencia de clorofila debajo de 700 nm puede ayudar a reducir este problema; en equipos de medición continua, aunque se midan longitudes menores a 700 nm este problema no se resuelve, puesto que el pico de emisión de los LEDs es alrededor de 650 nm, como consecuencia las ondas de luz actínica pueden superponerse a las ondas de fluorescencia detectadas (Kalaji et al., 2014). El prototipo desarrollado evita este problema al ser un equipo tipo PAM, el cual puede distinguir entre la emisión inducida y la fluorescencia medida. Esta fluorescencia medida es detectada a través de un filtro de longitudes de onda mayores a 650 nm, de esta manera la fluorescencia medida es en su mayoría proveniente del PSII en lugar del PSI y a su vez el filtro evita medir en el pico de emisión del LED de 617 nm.

El pulso saturante debe ser lo suficientemente intenso para reducir toda la Q_A disponible en las hojas, de otra manera la medición de F_m puede ser subestimada. Según la literatura, la intensidad del pulso saturante debe alcanzar alrededor de $7,000 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Kalaji et al., 2012). Para especies tipo C_4 se pueden necesitar incluso mayores intensidades para saturar la cadena de transporte de electrones (Kalaji et al., 2014). El equipo construido incluso logra una intensidad de pulso saturante suficiente, a pesar de que existe una distancia de 4 cm desde el pulso saturante hasta las muestras, los LEDs naranjas emitieron una intensidad de hasta $20,000 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla 11). Por lo que se puede aceptar que el pulso saturante tiene una intensidad adecuada para las mediciones.

Uno de los parámetros más importantes a tomar en cuenta durante las mediciones es el valor de F_o , el cual se sobreestima fácilmente. Si el pulso de mediciones es débil, corto y espaciado, la totalidad de este pulso se usa para reducir al pool de Q_a pero no se logra establecer un gradiente de protones. Esto resulta en un valor de F_o bajo debido a que toda la energía proporcionada por el pulso de medición no puede regresar como fluorescencia ni disiparse como calor ya que el camino fotoquímico está totalmente abierto (Q_A totalmente oxidada). De esta forma se evita una subestimación de F_v/F_m (Pfündel, 1998; Schreiber & Ulrich, 2004).

Para obtener una F_o no sobreestimada, los cálculos se realizaron a una frecuencia baja de pulsos de medición (1Hz) y se probó la mínima duración posible del pulso, siendo esta de $6 \mu\text{s}$. La intensidad aparente de medición fue $0.0006 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el periodo de $6 \mu\text{s}$, ya que tenía una intensidad de $100 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ cuando se encendía continuamente. A partir de esta duración se midieron los parámetros fotosintéticos en las siguientes duraciones: $10 \mu\text{s}$, $15 \mu\text{s}$, $20 \mu\text{s}$, $25 \mu\text{s}$ y $30 \mu\text{s}$. Con este experimento se concluyó que la duración del pulso de medición debe ser menor a $15 \mu\text{s}$ para obtener un valor idóneo de F_o , menor a esta duración el valor de F_o ya no cambia sustancialmente en ambas pruebas estadísticas LSD y Tukey. (Figura 48 y Figura 49).

Para el valor de F_m , se encontró solo una media significativamente diferente ($6 \mu\text{s}$) en comparación a las otras medias, utilizando la prueba LSD. Con la prueba Tukey no se encontraron grupos específicos con medias significativamente diferentes. La duración del pulso de medición tiene un mayor efecto en F_o , lo cual es lo esperado porque en el cálculo de F_o es donde se puede inducir un gradiente de protones e inducir la fluorescencia incorrectamente y sobreestimar el valor de esta variable. Los pulsos de duración larga (mayores a $15 \mu\text{s}$) parecen subestimar F_o en ambas pruebas estadísticas. Por el contrario, en el caso de F_m las mediciones se realizan durante la máxima intensidad del LED naranja de pulso satura, cuando la cadena de transporte de electrones está máximamente reducida, el pulso de medición en medio de cada pulso saturante es mucho más corto y de menor intensidad que el pulso saturante, por ello los diferentes grupos de pulso de medición no tienen un efecto en este valor.

La eficiencia cuántica o F_v/F_m es calculada a través de F_o y F_m . El valor de F_m no tiene grupos específicos donde su media es significativamente diferente, más que la duración de $6 \mu\text{s}$ con la prueba LSD. Sin embargo, en el valor de F_o se logran inferir diferencias significativas entre los grupos con pulso de duración larga y pulsos de duración corta; con ambos valores (F_m y F_o) al determinar F_v/F_m utilizando un estadístico post

hoc más flexible como LSD obtenemos que la eficiencia cuántica es correctamente calculada con duraciones de pulso cortos menores a 15 μ s (grupo a), en comparación a pulsos largos (grupo b) (Figura 44). Esta diferencia entre grupos de duración larga y corta no se expresa de manera significativa con una prueba más estricta como lo es la prueba Tukey. Es importante notar, que esto puede deberse a que el número de mediciones es pequeño, pues se utilizaron únicamente un total de 5 plantas a medir (30 mediciones). Podría ser que, utilizando un número mayor de mediciones, se pueda establecer que la duración del pulso de medición debe ser menor a 15 μ s con una prueba estadística más estricta como Tukey (Figura 45).

La medición de F_v/F_m se ha realizado en diversas especies y *Euphorbia pulcherrima* no es la excepción; en un estudio por Faust & Enfield se utilizó F_v/F_m como un indicador en la disminución de la calidad en las plantas durante el almacenamiento de esta especie con diferentes tratamientos de temperatura. A la temperatura análoga a la temperatura en que se realizaron los experimentos en el presente trabajo, los valores de F_v/F_m obtenidos por Faust & Enfield tuvieron un promedio de 0.82, ellos utilizaron el equipo comercial OS5-FL modulated fluorometer, comercializado por la empresa Opti-Science Inc. Este equipo comercial se asemeja bastante al prototipo desarrollado en cuanto a las mediciones que realiza, ya es un equipo tipo PAM, utiliza LEDs y no hace las correcciones en los valores obtenidos de F_m' , al igual que nuestro equipo. (Opti-Science Inc., 2007) (Figura 40). La diferencia con este equipo es que para hacer el pulso saturante utilizan lámparas halógenas y calcula más parámetros que los calculados en el presente trabajo como F_s , ETR y PAR.

Conclusión

A pesar de que no fue posible introducir la técnica de pulso saturante MFP desarrollado por Loriaux et al. 2013, el prototipo construido mide la eficiencia fotoquímica máxima correctamente, ya que el valor de F_o fue calculado correctamente con pulsos de duración menores a 15 μ s para evitar la subestimación de F_v/F_m en la especie *Euphorbia pulcherrima* que se corrobora con la literatura previa (Faust & Enfield, 2010).

Perspectivas

Existen otra serie de mejoras que se podrían aplicar al equipo construido para aumentar su eficiencia. Primeramente, respecto al subsistema óptico, las fibras ópticas se van a sustituir por guías líquidas para una mejor conducción de la luz y aumentar la señal fluorescente. Respecto al subsistema de alimentación de los LEDs, se podría hacer una versión nueva del circuito para el LED blanco y así poder implementar la técnica MFP durante el pulso saturante. Para el subsistema de adquisición y control se debe crear otro programa basado en *Protocolo Rosina.vi*, en donde se simplifiquen las entradas para el usuario y se ejecute el control del subsistema de alimentación de los LEDs de manera sencilla. Por otro lado, se tienen que probar los programas construidos para el subsistema de interfaz gráfica para el usuario para el control del prototipo. Finalmente, también se tienen que probar y mejorar los programas hechos para el subsistema de control de temperatura.

Bibliografía

- Acuña, A. U., & Amat-Guerri, F. (2008). Early History of Solution Fluorescence : The Lignum nephriticum of Nicolás Monardes. *Springer Series on Fluorescence*.
https://doi.org/10.1007/4243_2007_006
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Beer, S., Vilenkin, B., Weil, A., Veste, M., Susel, L., & Eshel, A. (1998). Measuring photosynthetic rates in seagrasses by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *Marine Ecology Progress Series*. <https://doi.org/10.3354/meps174293>
- Bhattacharya, P., Fornari, R., & Kamimura, H. (2011). Comprehensive semiconductor science and technology. In *Comprehensive Semiconductor Science and Technology*.
<https://doi.org/10.1016/c2009-1-28364-x>
- Bitter, R., Mohiuddin, T., & Nawrocki, M. (2017). LabVIEW: Advanced programming techniques. CRC press.
- Chugani, M. L., Samant, A. R., & Cerna, M. (1998). LabVIEW signal processing. Pearson Education.
- Cifra, C., & Chandhoke, S. (2006). U.S. Patent No. 7,076,332. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Conde-Saavedra, G. (2018). El telescopio: una primera ventana al universo. *Revista Boliviana de Física*.
- Cruz, J. A., Savage, L. J., Zegarac, R., Hall, C. C., Satoh-Cruz, M., Davis, G. A., Kovac, W. K., Chen, J., & Kramer, D. M. (2016). Dynamic Environmental Photosynthetic Imaging Reveals Emergent Phenotypes. *Cell Systems*, 2(6), 365–377. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.06.001>
- Dron Control (s.f.). Estructura de la hoja. Recuperado de:
<http://www.droncontrol.com/index.php/es/servicios/aplicaciones-agricolas/51-agricola/165-estructura-de-la-hoja>

Edinburgh Instruments. (2020). Stokes Shift, Fluorescence Spectroscopy | Edinburgh Instruments.

Recuperado 9 de marzo de 2020, de <https://www.edinst.com/blog/what-is-the-stokes-shift/>

Fallas, J. (2012). Análisis de Varianza. Recuperado de:

http://www.ucipfg.com/Repositorio/MGAP/MGAP-05/BLOQUE-ACADEMICO/Unidad-2/complementarias/analisis_de_varianza_2012.pdf

Faust, J. E., & Enfield, A. L. (2010). Effect of temperature and storage duration on quality and rooting performance of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* 'Prestige Red') cuttings. *Acta Horticulturae*. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.877.247>

Fraknoi, A., Morrison, D., & Wolff, S. (2016). Astronomy. Recuperado de <https://openstax.org/books/astronomy/pages/1-introduction>

García A. (2016). ¿Qué es y cómo se utiliza un MOSFET? Recuperado de:

<http://panamahitek.com/que-es-y-como-funciona-un-mosfet/>

Govindjee. (2004). Chlorophyll a Fluorescence: A Bit of Basics and History In: Papageorgiou G, Govindjee (eds.), *Chlorophyll a Fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. . *Springer: Dordrecht*.

Guidi, L., & Calatayud, A. (2014). Non-invasive tools to estimate stress-induced changes in photosynthetic performance in plants inhabiting Mediterranean areas. *Environmental and Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.12.007>

Guo-jing, L. I., Zhu-jun, L. Y. H. Z., & Bao-geng, W. X. H. W. (2006). Effects of silicon and powdery mildew on chlorophyll fluorescence characteristics and activities of disease resistance--related enzymes in leaves of asparagus bean. *Acta Phytopylacica Sinica*, 33(1), 109-110.

Hansatech Instruments. (s. f.). Handy PEA+. Recuperado 10 de marzo de 2020, de

<https://www.hansatech-instruments.com/product/handy-pea/>

Harbinson, J. (2013). Improving the accuracy of chlorophyll fluorescence measurements. *Plant, Cell and Environment*. <https://doi.org/10.1111/pce.12111>

Houle, D., Govindaraju, D. R., & Omholt, S. (2010). Phenomics: The next challenge. In *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg2897>

Kalaji, H. M., Goltsev, V., Bosa, K., Allakhverdiev, S. I., Strasser, R. J., & Govindjee. (2012). Experimental in vivo measurements of light emission in plants: A perspective dedicated to

- David Walker. In *Photosynthesis Research*. <https://doi.org/10.1007/s11120-012-9780-3>
- Kalaji, H. M., Schansker, G., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Ferroni, L., Goltsev, V., Guidi, L., Jajoo, A., Li, P., Losciale, P., Mishra, V. K., Misra, A. N., Nebauer, S. G., Pancaldi, S., Penella, C., Pollastrini, M., Suresh, K., Tambussi, E., ... Bąba, W. (2017). Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. In *Photosynthesis Research*. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0318-y>
- Kalaji, H. M., Schansker, G., Ladle, R. J., Goltsev, V., Bosa, K., Allakhverdiev, S. I., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Dąbrowski, P., Elsheery, N. I., Ferroni, L., Guidi, L., Hogewoning, S. W., Jajoo, A., Misra, A. N., Nebauer, S. G., Pancaldi, S., Penella, C., ... Zivcak, M. (2014). Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: Practical issues. In *Photosynthesis Research*. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0024-6>
- Klughammer, C., & Schreiber, U. (2008). Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes*. <https://doi.org/citeulike-article-id:6352156>
- Kramer, D. M., Johnson, G., Kiirats, O., & Edwards, G. E. (2004). New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*. <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000015391.99477.0d>
- Lamb, J. J., Røkke, G., & Hohmann-Marriott, M. F. (2018). Chlorophyll fluorescence emission spectroscopy of oxygenic organisms at 77 K. In *Photosynthetica*. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0791-y>
- Lavergne, J., & Trissl, H. W. (1995). Theory of fluorescence induction in photosystem II: derivation of analytical expressions in a model including exciton-radical-pair equilibrium and restricted energy transfer between photosynthetic units. *Biophysical Journal*. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80429-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80429-7)
- LED Systems Reliability Consortium. (2017, abril). Department of Energy. Recuperado 14 de marzo de 2020, de https://www.energy.gov/sites/prod/files/2017/04/f34/lsrc_colorshift_apr2017.pdf
- Leipner, J. (2010). leipner photosynthesis consulting - applications - ozone damage. Recuperado 13 de marzo de 2020, de <https://www.photosynthesis.ch/fluorescence.htm>
- Licari, J., & Swanson, D. (2011). Adhesives Technology for Electronic Applications: Materials. In

Processing, Reliability: William Andrew. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-7889-2.10006-3>

- Lora, F. (11-04). Top Fotografía | LENTES ASFÉRICAS. Recuperado 9 de marzo de 2020, de <http://www.topfotografia.net/Fotografia/teoria-de-la-fotografia/lentes-asfericas/lentes-asfericas.html>
- Loriaux, S. D., Avenson, T. J., Welles, J. M., Mcdermitt, D. K., Eckles, R. D., Riensche, B., & Genty, B. (2013). Closing in on maximum yield of chlorophyll fluorescence using a single multiphase flash of sub-saturating intensity. *Plant, Cell and Environment*. <https://doi.org/10.1111/pce.12115>
- Lozano, P. (2015). El espejo dicroico | IDIS. Recuperado 9 de marzo de 2020, de <http://proyectoidis.org/el-espejo-dicroico/>
- Lutus, P. (2005). 12: Virtual Telescope I: Galilean. Recuperado 13 de marzo de 2020, de <https://arachnoid.com/raytracing/telescope1.html>
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence - A practical guide. In *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.345.659>
- Mercado V. (2012). ¿Qué diferencia hay entre carga eléctrica y corriente eléctrica? Recuperado de: <https://prezi.com/z-ujy-upab5m/que-diferencia-hay-entre-carga-electrica-y-corriente-electric/#:~:text=La%20corriente%20eléctrica%20se%20define,medida%20se%20conoce%20como%20Amperios%20>
- Minitab. (2019). Uso de comparaciones múltiples para evaluar las diferencias en las medias de grupo. Obtenido de: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/multiple-comparisons/using-multiple-comparisons-to-assess-differences-in-means/>
- Narayan, A., Misra, M., & Singh, R. (2012). Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology. In *Biophysics*. <https://doi.org/10.5772/35111>
- National Instruments. (s. f.-a). ¿Qué es la Serie X? - National Instruments. Recuperado 4 de abril de 2020, de <https://www.ni.com/es-mx/support/documentation/supplemental/09/what-is-ni-x-series-.html>
- National Instruments. (s. f.-b). What Is Data Acquisition? - National Instruments. Recuperado 13 de marzo de 2020, de <https://www.ni.com/data-acquisition/what-is/>

- NDT Resource Center. (s. f.). OHM'S LAW. Recuperado 13 de marzo de 2020, de <https://www.nde-ed.org/EducationResources/HighSchool/Electricity/ohmslaw.htm>
- Pedrós, R., Moya, I., Goulas, Y., & Jacquemoud, S. (2008). Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf. *Photochemical and Photobiological Sciences*. <https://doi.org/10.1039/b719506k>
- Pfündel, E. (1998). Estimating the contribution of Photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research*. <https://doi.org/10.1023/A:1006032804606>
- Pieruschka, R., & Schurr, U. (2019). Plant Phenotyping: Past, Present, and Future. *Plant Phenomics*. <https://doi.org/10.34133/2019/7507131>
- Prahl, S. (2017). Chlorophyll a. Recuperado 9 de marzo de 2020, de <https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/123.html>
- R documentation. (s. f.). TukeyHSD function | R Documentation. Recuperado 22 de abril de 2020, de <https://www.rdocumentation.org/packages/stats/versions/3.6.2/topics/TukeyHSD>
- Schreiber, U., & Ulrich, S. (2004). Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview. In *Chlorophyll a fluorescence*. https://doi.org/10.1300/j301v01n03_06
- Sparkfun. (s. f.). Analog vs. Digital. Recuperado 4 de abril de 2020, de <https://learn.sparkfun.com/tutorials/analog-vs-digital/all>
- Strasserf, R. J., Srivastava, A., & Govindjee. (1995). POLYPHASIC CHLOROPHYLL a FLUORESCENCE TRANSIENT IN PLANTS AND CYANOBACTERIA. *Photochemistry and Photobiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb09240.x>
- VL Lighting Solutions. HOW LED EFFICIENCY IS AFFECTED BY TEMPERATURE. Recuperado de: <https://vllightingsolutions.com/how-temperature-affects-led-efficiency/>
- Villamiel, P. (2015). Fundamentos de los telescopios para aficionados. Recuperado de http://aam.org.es/images/GCP/Fundamentos_de_teloscopios_para_aficionados.pdf
- Walter, A., Liebisch, F., & Hund, A. (2015). Plant phenotyping: From bean weighing to image analysis. In *Plant Methods*. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0056-8>
- Wilson, P. (2012). The Circuit Designer's Companion. In *The Circuit Designer's Companion*. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-66361-9>

Zhao, C., Zhang, Y., Du, J., Guo, X., Wen, W., Gu, S., Wang, J., & Fan, J. (2019). Crop phenomics: Current status and perspectives. In *Frontiers in Plant Science*.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00714>