

## Determinación semicuantitativa del punto de compensación para el CO<sub>2</sub> en plantas C3 y C4 como práctica experimental en la docencia de Ecofisiología Vegetal

Asma Boujenna – Universidad AbdelMalek Essâadi – Tetuan, Marruecos

 0000-0002-0023-7759

Vanessa Martos Núñez – Universidad de Granada

 0000-0001-6442-7968

Belén García del Moral Garrido – Universidad de Almería

 0000-0001-9803-9939

Luis F. Garcia del Moral – Universidad de Granada

 0000-0002-0533-2915

Recepción: 08.04.2022 | Aceptado: 18.04.2022

Correspondencia a través de **ORCID**: Luis F. García del Moral



**0000-0002-0533-2915**

Boujenna A, Martos Núñez, V, García del Moral, B y García del Moral, LF (2022). Determinación semicuantitativa de puntos de compensación para el CO<sub>2</sub> en plantas C3 y C4 como práctica experimental en la docencia Ecofisiología Vegetal. *REIDOCREA*, 11(21), 239-244.

Financiación: (opcional): Grupo de investigación AGR123 de la Junta de Andalucía y proyecto "SUSTAINABLE" funded by the European Union's Horizon 2020 Project H2020-MSCA-RISE-2020, Grant Agreement 101007702.

Área o categoría del conocimiento: Fisiología Vegetal

**Resumen:** El punto de compensación para el CO<sub>2</sub> ( $\Gamma_{CO_2}$ ) es el límite mínimo de CO<sub>2</sub> atmosférico necesario para una asimilación fotosintética positiva. Por debajo de este límite los procesos respiratorios predominan sobre los fotosintéticos, la fotosíntesis neta tiene valores negativos y el crecimiento se detiene, con consecuencias negativas sobre el rendimiento y la productividad. Las diferencias en  $\Gamma_{CO_2}$  se han utilizado para seleccionar genotipos con una mayor capacidad de captación de CO<sub>2</sub> y con mejor productividad. El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento práctico, por parte del alumnado de una asignatura de Ecofisiología Vegetal, de cómo se puede calcular el valor del  $\Gamma_{CO_2}$  y su interés para evaluar la eficiencia en la captación de CO<sub>2</sub> por plantas con metabolismo fotosintético C3 o C4.

**Palabra clave:** Fotosíntesis C3 y C4

***Semiquantitative determination of compensation point for CO<sub>2</sub> in C3 and C4 plants as an experimental practice in the teaching of Plant Ecophysiology***

**Abstract** The compensation point for CO<sub>2</sub> ( $\Gamma_{CO_2}$ ) is the minimum limit of atmospheric CO<sub>2</sub> necessary for positive photosynthetic assimilation. Below this limit, respiratory processes predominate over photosynthetic ones, net photosynthesis has negative values and growth stops, with negative consequences on yield and productivity. Differences in  $\Gamma_{CO_2}$  have been used to select genotypes with a higher CO<sub>2</sub> uptake capacity and better productivity. The objective of this work is to contribute to the practical knowledge, by students of a Plant Ecophysiology course, of how the value of  $\Gamma_{CO_2}$  can be calculated and its interest in evaluating the efficiency of CO<sub>2</sub> uptake by plants with C3 or C4 photosynthetic metabolism.

**Keywords:** C3 and C4 photosynthesis

### Introducción

En una hoja iluminada tienen lugar dos procesos metabólicos antagónicos, fotosíntesis con absorción de CO<sub>2</sub> y respiración con desprendimiento de CO<sub>2</sub>, manifestándose aquel que en ese momento actúe con mayor intensidad (Lambers *et al.*, 2008; Taiz *et al.*, 2015). Bajo suficiente iluminación, generalmente, la captación de CO<sub>2</sub> debida a la fotosíntesis es mayor que su liberación por los fenómenos respiratorios, por lo que se manifiesta una pérdida neta de CO<sub>2</sub> desde la atmósfera hacia la hoja; pérdida que es despreciable en condiciones naturales, debido a que la turbulencia del aire mantiene una concentración constante de CO<sub>2</sub> alrededor de la hoja. En un recipiente cerrado, por el contrario, la concentración de CO<sub>2</sub> disminuye a medida que es retirado por los tejidos verdes, ya que no existe aporte desde el exterior. No obstante, dado que la intensidad de la fotosíntesis depende de la cantidad de CO<sub>2</sub> presente en el aire, llegará un momento en que la velocidad de captación de este gas por la hoja se iguale con la de cesión por los fenómenos respiratorios, y la

concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera del recipiente permanezca constante. En esta situación se dice que se ha alcanzado el punto de compensación para el CO<sub>2</sub> ( $\Gamma_{CO_2}$ ), es decir, aquella concentración de CO<sub>2</sub> en el aire que provoca que la intensidad de la fotosíntesis se iguale con la de la respiración (Lambers *et al.*, 2008; Taiz *et al.*, 2015). El desprendimiento de CO<sub>2</sub> bajo condiciones de iluminación se debe, en su mayor parte —si no completamente—, a la fotorrespiración y no a la respiración mitocondrial que no se manifiesta en hojas iluminadas (Taiz *et al.*, 2015). Por ello, el punto de compensación indica la eficiencia de captación de CO<sub>2</sub> de una planta en relación con su respiración, es decir, es una medida indirecta de su capacidad fotosintética y de su potencial productivo. No obstante, el valor de  $\Gamma_{CO_2}$  en una misma planta se ve notablemente influido por los factores ambientales y especialmente por las variaciones de temperatura que modifican las tasas de fotorrespiración y respiración mitocondrial (Smith *et al.*, 1976).

En relación con la fijación fotosintética del CO<sub>2</sub>, los vegetales con metabolismo fotosintético C3 realizan una sola carboxilación en el estroma del cloroplasto a través del enzima ribulosa bifsosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), que sintetiza inicialmente una molécula de tres átomos de carbono, el ácido 3-fosfoglicérico. En estas plantas el CO<sub>2</sub> se mueve en forma gaseosa por difusión a través de un gradiente de concentración, desde la atmósfera hasta el estroma del cloroplasto, donde también hay O<sub>2</sub> procedente tanto del aire como del desprendido por la Fotosíntesis. Por ello, las plantas C3 presentan fotorrespiración aparente y su punto de compensación se encuentra entre 40 y 100  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  (Goldsworthy y Day, 1970; Krenzer *et al.*, 1975; Taiz *et al.*, 2015). Las plantas con metabolismo C4 realizan dos carboxilaciones separadas en el espacio, una en las células más externas del mesofilo a través del enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP) que produce ácidos orgánicos de cuatro átomos de carbono (malato y aspartato, principalmente). Estos ácidos son transportados por un mecanismo unidireccional hacia otras células especializadas que rodean los haces vasculares (células de la vaina), donde son descarboxilados y liberan CO<sub>2</sub>, que ahora es usado por la RuBisCO que está concentrada en estas células y que trabaja, por tanto, con una concentración óptima de CO<sub>2</sub>. A estas células, además, no llega prácticamente O<sub>2</sub> atmosférico al estar más hundidas en la epidermis y porque las paredes de las células de la vaina son impermeables al O<sub>2</sub>. Por esta razón las plantas C4 no tienen fotorrespiración aparente y, su punto de compensación se sitúa entre 0-10  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  (Goldsworthy y Day, 1970; Krenzer *et al.*, 1975; Taiz *et al.*, 2015).

### **Objetivo**

Determinar el punto de compensación para el CO<sub>2</sub> en distintas especies de plantas C3 y C4 como medida indirecta de su capacidad de captación de CO<sub>2</sub> y de su capacidad fotosintética, como práctica experimental en un curso de Ecofisiología Vegetal.

### **Método**

Esta práctica se basa en un método semicuantitativo para comparar la eficiencia en la captación de CO<sub>2</sub> por distintas especies en atmósferas cerradas (Coombs, 1985). Como cámara de experimentación se utilizará un Erlenmeyer de 250 ml con tapón hermético, al cual se añaden 20 ml de una solución 5 mM de HKCO<sub>3</sub> recientemente preparada y 5 gotas de indicador universal de pH. El material vegetal consistirá en plántulas de garbanzo y judía como plantas con metabolismo fotosintético tipo C3 y maíz y sorgo como plantas C4.

Situar suficientes semillas de las 4 especies en vermiculita húmeda para proceder a su germinación. Con una cuchilla bien afilada, cortar bajo el agua los tallitos con hojas de las plantas germinadas y, sin sacar el corte del agua, introducirlos por su base en un vial de vidrio de 5 ml. Es importante cortar las plántulas bajo el agua para que no entre aire en los

vasos del xilema y no se cierran los estomas, de modo que la fotosíntesis pueda seguir funcionando tras el corte. Escurrir el agua sobrante, pero cuidando que los tallos siempre queden sumergidos en agua. Pasar un hilo alrededor de cada vial y, con cuidado, introducirlo en el Erlenmeyer sin que se derrame. Sujetar el hilo al tapón de modo que el vial con las hojas quede suspendido a unos pocos cm por encima de la solución de  $\text{KHCO}_3$ , pero sin llegar a tocarla (tal como indica la Figura 1).

Dado que un perfecto aislamiento resulta un requisito básico, conviene asegurarse de la perfecta hermeticidad del dispositivo mediante la aplicación de un sello de plastilina o similar alrededor del tapón y protegerlo, asimismo, con una lámina de Parafilm. Preparar tres Erlenmeyer para cada tipo de planta y anotar el pH inicial de la solución mediante la estala universal de pH de la Figura 3. La secuencia de intercambios que tendrá lugar en cada Erlenmeyer se presenta en la Figura 2, donde se aprecia que a medida que las hojas consumen el  $\text{CO}_2$  del interior del Erlenmeyer, se produce un desplazamiento del  $\text{CO}_2$  disuelto en la solución de  $\text{KHCO}_3$  hacia la atmósfera del frasco, lo que ocasionará la alcalinización de la solución y una subida de pH.

Para medir la temperatura de la solución de  $\text{KHCO}_3$ , colocar junto a los Erlenmeyer un vaso de precipitado lleno de agua con un termómetro. Anotar el pH inicial de la solución de cada Erlenmeyer mediante la escala colorimétrica de la Figura 3. Situar cada cámara a 50 cm aproximadamente de 2 lámparas incandescentes de 150 W y dejarlas equilibrar durante tres horas. Registrar la temperatura cada 10 minutos. Pasadas las tres horas determinar, con una aproximación de 0.5 unidades, el aumento de pH de la solución sin abrir el Erlenmeyer, mediante la comparación de su color con el de la escala universal de pH de la Figura 3.

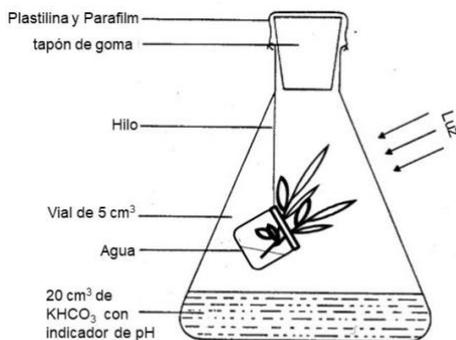


Figura 1.- Cámara de experimentación para la medida del punto de compensación para el  $\text{CO}_2$  en plantas  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$

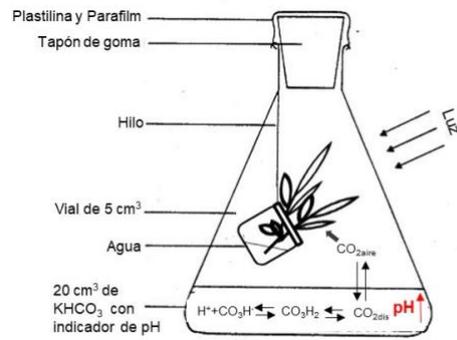


Figura 2.- Ilustración de los intercambios de  $\text{CO}_2$  que tienen lugar durante la medida del punto de compensación.

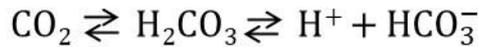


Figura 3.- Escala colorimétrica para medida del pH de las soluciones

## Resultados

### **Cálculo del punto de compensación**

A partir del pH de la solución final de bicarbonato puede obtenerse la concentración de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera del Erlenmeyer, es decir el punto de compensación para el  $\text{CO}_2$  de la planta estudiada. En efecto, el  $\text{CO}_2$  disuelto como ácido carbónico se disocia para formar iones hidrógeno y bicarbonato:



Por definición, la constante de disociación ( $K_1$ ) para este equilibrio es (en moles):

$$K_1 = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}$$

Dado que, bajo condiciones normales, la cantidad de ácido carbónico no disociado es menor del 1% puede considerarse que:

$$K_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]}$$

de donde:

$$[\text{H}^+] = \frac{K_2 [\text{CO}_2]}{[\text{HCO}_3^-]}$$

- Por definición:  $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ ,
- Similarmente:  $\text{pK} = -\log [\text{K}]$

Tomando log en la ecuación anterior:

$$\text{pH} = \text{pK}_2 - \log \left( \frac{[\text{CO}_2]}{[\text{HCO}_3^-]} \right) = \text{pK}_2 - (\log [\text{CO}_2] - \log [\text{HCO}_3^-])$$

de donde:

$$\log [\text{CO}_2] = \text{pK}_2 + \log [\text{HCO}_3^-] - \text{pH}$$

Esta ecuación permite conocer la concentración molar de  $\text{CO}_2$  en la disolución teniendo en cuenta que  $\text{pK}_2 = 0.637$  para la disociación del ácido carbónico y asumiendo que la disminución de la concentración de  $\text{CO}_3\text{H}^-$  es despreciable, ya que se ha puesto una concentración muy elevada. Por tanto, desde estos datos, la concentración de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera del Erlenmeyer puede calcularse mediante:

$$\Gamma_{\text{CO}_2} = \frac{22,4 \times [\text{CO}_2]}{\alpha} \times 10^6$$

donde,

- $\Gamma_{\text{CO}_2}$  = punto de compensación o concentración molar de  $\text{CO}_2$  en el aire ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ).
- 22,4 = volumen molar normal de un gas.
- $[\text{CO}_2]$  = concentración molar de  $\text{CO}_2$  en la disolución ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ).
- $\alpha$  = solubilidad del  $\text{CO}_2$  en  $\text{m}^3 \text{CO}_2/\text{m}^3 \text{H}_2\text{O}$  para una temperatura dada, cuyo valor en función de la temperatura se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Valores de la solubilidad del  $\text{CO}_2$  ( $\alpha$ ) en función de la temperatura.

Temperatura °C	$\alpha$ ( $\text{m}^3 \text{CO}_2/\text{m}^3 \text{H}_2\text{O}$ )
15	0.988
17	0.926
19	0.871
21	0.822
23	0.777
25	0.730
27	0.699
29	0.663
31	0.631
33	0.600

## Discusión

La adquisición de  $\text{CO}_2$  siempre constituye un problema para las plantas, problema que unas especies solucionan mejor que otras. El punto de compensación para el  $\text{CO}_2$  ( $\Gamma_{\text{CO}_2}$ ) es el límite mínimo de  $\text{CO}_2$  atmosférico necesario para una asimilación fotosintética positiva y, por tanto, para el crecimiento adecuado de una planta. Por debajo de este límite los procesos respiratorios predominan sobre los fotosintéticos, la fotosíntesis neta tiene valores negativos y el crecimiento se detiene, con consecuencias negativas sobre el rendimiento y la productividad (Dippery *et al.*, 1995; Tissue *et al.*, 1995). Existen variaciones inter- e intraespecíficas para el  $\Gamma_{\text{CO}_2}$ , especialmente entre plantas  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$  (Goldsworthy y Day, 1970; Krenzer *et al.*, 1975), pero también entre las especies  $\text{C}_3$  (Bauer y Martha, 1981; Bauer *et al.*, 1983), principalmente causadas por diferencias en la conductividad estomática, en la estructura y permeabilidad al  $\text{CO}_2$  de las células del mesófilo, en la actividad de los enzimas del Ciclo de Calvin, y especialmente en la intensidad de la fotorrespiración, determinada por la proporción entre la actividad carboxilasa y oxigenasa de la RuBisCO (Tissue *et al.*, 1995; Lambers *et al.*, 2008; Taiz *et al.*, 2015). Actualmente se está investigando sobre la posibilidad de reducir la fotorrespiración en plantas  $\text{C}_3$  introduciendo de manera estable múltiples copias de los genes para RuBisCO o induciendo cambios conformacionales en el centro catalítico del enzima para disminuir su actividad oxigenasa (García del Moral y Boujenna, 2020). Precisamente, una de las causas del mayor rendimiento fotosintético de las plantas  $\text{C}_4$  se debe a que su RuBisCO se localiza en las células perivasculares, en las que la concentración de  $\text{CO}_2$  se encuentra localmente elevada debido al transporte, dependiente de energía, de ácidos de cuatro átomos de carbono desde las células del mesófilo (Lambers *et al.*, 2008; Taiz *et al.*, 2015). Esta liberación de  $\text{CO}_2$  en las células de la vaina, sumada a la menor concentración de  $\text{O}_2$  (debido a encontrarse más alejadas del aire atmosférico), provoca la disminución de los efectos inhibidores del  $\text{O}_2$  sobre la asimilación fotosintética y, por ello, las plantas  $\text{C}_4$  se caracterizan por su actividad fotorrespiratoria relativamente baja. Estas observaciones han sugerido la posibilidad de utilizar las técnicas de ingeniería de proteínas para eliminar la actividad oxigenásica de la RuBisCO, pero todavía en la actualidad se discute la viabilidad del procedimiento, ya que la fotorrespiración ejerce un papel protector de la fotosíntesis bajo condiciones de estrés y cierre de estomas en condiciones de elevada iluminación (Taiz *et al.*, 2015; García del Moral y Boujenna, 2020).

Las diferencias en  $\Gamma_{\text{CO}_2}$  entre plantas  $\text{C}_3$  en atmósferas de baja concentración de  $\text{CO}_2$  se han utilizado para seleccionar genotipos con una mayor capacidad de captación de  $\text{CO}_2$  y con mejor productividad (Medrano *et al.*, 1995). Aunque la cuantificación exacta del  $\Gamma_{\text{CO}_2}$  requiere de instrumentos basados en la absorción de  $\text{CO}_2$  en el infrarrojo cercano (Pearcy *et al.*, 2007), la técnica que se presenta en este artículo puede utilizarse para poner de manifiesto las diferencias fisiológicas entre plantas  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$  en la intensidad de la fotorrespiración y para comparar la eficiencia en términos relativos en la captación de  $\text{CO}_2$  entre especies  $\text{C}_3$  (Coombs, 1985).

### Cuestiones para el alumnado

- Explicar la secuencia de intercambios que tienen lugar entre la solución de bicarbonato y la atmósfera del Erlenmeyer.
- Este método proporciona una medida semicuantitativa del punto de compensación para el  $\text{CO}_2$ , permitiendo la comparación entre diferentes especies. ¿Por qué resulta sólo semicuantitativa? ¿Cómo podría convertirse en cuantitativa?
- Asumiendo un aumento de pH de 8 a 9 con una temperatura media de 25 °C, calcular el correspondiente  $\Gamma_{\text{CO}_2}$ .
- Explicar a que se deben las diferencias de  $\Gamma_{\text{CO}_2}$  entre plantas  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$ .
- Indicar otros tipos de puntos de compensación de la fotosíntesis explicando su significado fisiológico.

### Conclusión

La técnica presentada en este artículo permite realizar una determinación semicuantitativa del punto de compensación para el  $\text{CO}_2$  que puede usarse para comparar en una clase práctica de Ecofisiología Vegetal la eficiencia en términos relativos de la captación de  $\text{CO}_2$  entre especies de plantas con metabolismo fotosintético  $\text{C}_3$  o  $\text{C}_4$ .

### Referencias

- Coombs J (1985). Carbon Metabolism. In: Coombs J, Hall DO, Long SP Scurlock JMO (eds.), *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*, 2<sup>nd</sup> ed. (pp 139-157). Pergamon Press, Oxford.
- Bauer H, Martha P (1981). The  $\text{CO}_2$  compensation point of C-3 plants - A reexamination. 1. Interspecific variability. *Z Pflanzenphysiol*, 103, 445-450. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(81\)80167-5](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(81)80167-5).
- Bauer H, Martha P, Kirchner-Heiss B, & Mairhofer, I (1983). The  $\text{CO}_2$  compensation point of C-3 plants - A reexamination 2. Intraspecific Variability. *Z Pflanzenphysiol*, 109, 143-154. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(83\)80203-7](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(83)80203-7).
- Dippery JK, Tissue DT, Thomas RB, & Strain BR (1995). Effects of low and elevated  $\text{CO}_2$  on C3 and C4 annuals 1. Growth and biomass allocation. *Oecologia*, 101, 13-20. <https://doi.org/10.1007/BF00328895>.
- García del Moral, LF, & Boujenna, A (2020). Biotechnological approaches to improve carbon fixation in agricultural crops. *Mod Concept Devel Agrono*, 7(3), 721-724. <https://doi.org/10.31031/MCDA.2020.07.000661>.
- Goldsworthy A, & Day PR (1970). A Simple Technique for the Rapid Determination of Plant  $\text{CO}_2$  Compensation Points. *Plant Physiol*, 46, 850-851. <https://doi.org/10.1104/pp.46.6.850>.
- Krenzer EG, Moss DN, & Crookston RK (1975). Carbon dioxide compensation points of flowering plants. *Plant Physiol*, 56, 194-206. <https://doi.org/10.1104/pp.56.2.194>
- Lambers H, Stuart Chapin F, & Pons Th L (2008). *Plant physiological ecology*. 2nd edition (pp 5409). Springer, New York.
- Medrano H, Keys AJ, Lawlor DW, Parry MAJ, Azcon-Bieto J, Delgado E (1995). Improving plant production by selection for survival at low  $\text{CO}_2$  concentrations. *J Exp Bot*, 46, 1389-1396. [https://doi.org/10.1093/jxb/46.special\\_issue.1389](https://doi.org/10.1093/jxb/46.special_issue.1389).
- Pearcy RW, Ehleringer JR, Mooney H, & Rundel PW (2007). *Plant Physiological Ecology: Field methods and instrumentation* (pp 472). Springer, New York, Berlin.
- Smith EW, Tolbert NE, & Ku HS (1976). Variables affecting  $\text{CO}_2$  compensation point. *Plant Physiol*, 58, 143-146. <https://doi.org/10.1104/pp.58.2.143>
- Tissue DT, Griffin KL, Thomas RB, & Strain BR (1995). Effects of low and elevated  $\text{CO}_2$  on C3 and C4 annuals. 2. Photosynthesis and leaf biochemistry. *Oecologia*, 101, 21-28. <https://doi.org/10.1007/BF00328894>