

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA Y FISIOLÓGICA DEL GERMOPLASMA
SEXUAL DE *Paspalum dilatatum*, EN CUANTO A SU CAPACIDAD
FOTOSINTÉTICA Y CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS

por

Agustín DETJEN BERTOLETTI

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2022

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. MSc. Luis Viega

Lic. MSc. Gastón Quero

Ing. Agr. MSc. Ana González

Fecha:

03 de noviembre de 2021

Autor:

Agustín Detjen Bertoletti

AGRADECIMIENTOS

A todos los docentes del Laboratorio del Fisiología Vegetal en especial a Luis Viega y Gastón Quero por su gran apoyo y constancia.

A los docentes y ayudantes del Laboratorio de Botánica, en especial a Ana Gonzáles por permitirme trabajar con sus instrumentos, darme consejos y por sus constantes palabras de motivación.

A mi familia, que fueron un gran apoyo para continuar con la tesis.

Con mucho cariño y agradecimiento, les dedico este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
 I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	 1
A. OBJETIVOS.....	1
1. <u>Objetivo general</u>	1
2. <u>Objetivos específicos</u>	1
 II. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	 2
A. BASE FORRAJERA.....	2
B. OFERTA ANUAL DE FORRAJE	2
C. GRUPO DILATA	3
1. <u>Biotipos sexuales</u>	6
2. <u>Anatomía foliar</u>	7
3. <u>Producción de forraje y calidad</u>	8
4. <u>Fisiología y características asociadas</u>	9
D. FLUORESCENCIA DE LAS CLOROFILAS	10
1. <u>Utilización de la energía en el fotosistema II</u>	12
2. <u>Modelo funcional para cuantificar</u>	12
3. <u>Efecto o curva de Kautsky</u>	13
4. <u>Apagamiento no fotoquímico</u>	14
 III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	 17
A. COLECCIÓN.....	17
B. CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA	18
1. <u>Espesor del tejido foliar</u>	18
2. <u>Conteo de estomas</u>	19
C. PARTICIÓN DE LA ENERGÍA.....	20
1. <u>Diseño experimental y estadístico</u>	21
 IV. <u>RESULTADOS</u>	 23
A. ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA.....	23
B. ANATOMÍA FOLIAR.....	26
1. <u>Corte transversal</u>	26
2. <u>Levantado de epidermis</u>	27

C. MEDICIONES DE LA HOJA.....	28
1. <u>Nervio medio</u>	28
2. <u>Lámina</u>	29
3. <u>Densidad de estomas</u>	30
V. <u>DISCUSIÓN</u>	32
A. ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA.....	32
B. ANATOMÍA DE HOJA.....	34
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	35
VII. <u>RESUMEN</u>	36
VII. <u>SUMMARY</u>	37
VII. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	38

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Fórmulas genómicas y sistemas reproductivos de los miembros del grupo Dilatata de paspalum.....	5
2. Parámetros de fluorescencia de clorofila	16
3. Biotipos de paspalum con sus correspondientes orígenes.....	16
4. Análisis de fluorescencia y relajación para los biotipos de paspalum, variando la luz actínica.....	25
Figura No.	
1. Sección transversal de la hoja de <i>Panicum coloratum</i>	8
2. Cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II en la fase rápida y su relación con las reacciones en la cadena transportadora de electrones.....	11
3. Ejemplo de perfil de medición de fluorescencia mediante análisis de quenching y de relajación con fluorómetro PAM.....	13
4. Tipos de cortes transversales.....	18
5. Levantado de epidermis.....	19
6. Corte transversal de la zona del nervio medio para todos los biotipos.....	26
7. Levantado de epidermis para cada biotipo	27
8. Espesor del parénquima incoloro del nervio medio.....	28
9. Espesor del parénquima de la lámina.....	30

10. Densidad de estomas	31
-------------------------------	----

I. INTRODUCCIÓN

El grupo Dilata dentro del género *Paspalum* comprende un grupo de especies de gran interés como recurso forrajero para los sistemas pastoriles del país. *Paspalum dilatatum* dentro del grupo de forrajeras estivales tiene un buen balance entre producción estival y calidad, siendo además muy resistente al daño por heladas (Rowley et al., 1975).

Como principales limitantes a la incorporación de esta gramínea en el sistema, se destaca su variabilidad en la producción de semillas, asociado a la susceptibilidad de muchos biotipos al hongo claviceps (Glison et al., 2017), y a su variabilidad al momento de la implantación, debido a que muchas semillas presentan alta dormición impidiendo el rápido establecimiento de las plantas en el campo (Glison et al., 2017).

En este trabajo se abordarán aspectos anatómicos y fisiológicos que permitan un mayor conocimiento de estos biotipos de *Paspalum dilatatum* para su mejoramiento y domesticación.

A. Objetivos

1. Objetivo general

Caracterizar anatómica y fisiológicamente al germoplasma sexual de *Paspalum dilatatum*, en cuanto a su capacidad fotosintética y características asociadas.

2. Objetivos específicos

Caracterizar anatómicamente al germoplasma sexual analizando la distribución de sus estomas, y espesor del nervio medio y lámina.

Caracterizar fisiológicamente al germoplasma sexual analizando partición de energía del PSII.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A. BASE FORRAJERA DEL PAÍS

En los años 50' luego de un estancamiento productivo en el rubro ganadero y lechero, se modifica la base forrajera del país, donde dominaba el campo natural como base forrajera. Este progreso se logra incorporando el modelo neozelandés, con implantación de praderas artificiales con especies exóticas que rápidamente fueron incorporadas al sistema de producción (Bertino et al., 2001). El objetivo de esta tecnología era solucionar los problemas de estacionalidad de la producción forrajera y mejorar la calidad energética de la dieta.

Las praderas artificiales en Uruguay se han implantado siguiendo al modelo neozelandés (Bertino et al., 2001) con presencia de especies de ciclo C3 que aportan buena producción otoño-inverno-primaveral de excelente calidad, pero no incluyen especies de ciclo estival que produzcan suficiente forraje en el período de reposo del verano (Carámbula, 2002).

B. OFERTA ANUAL DE FORRAJE

La base forrajera del Uruguay está compuesta por campo natural y praderas artificiales con buena aptitud agroclimática para la producción de forraje, pero con limitantes (Carámbula, 2002). La disponibilidad de forraje, en cantidades suficientes, a lo largo de todo el año es uno de los principales problemas de la producción ganadera en Uruguay. El período estival con la posibilidad de estrés hídrico y altas temperaturas, y el período invernal con bajas temperaturas y presencia de heladas, representan un problema para la producción forrajera en Uruguay.

En Uruguay las especies perennes cultivables dominantes en los sistemas pastoriles son en su mayoría invernales determinando que las mayores acumulaciones de forraje se den en primavera y otoño, en el cual las temperaturas, horas de luz y balance hídrico son óptimas para la producción de materia seca, permitiendo maximizar la producción ganadera o lechera. Durante el invierno y el verano las temperaturas, horas de luz y nivel hídrico del suelo se alejan del óptimo, generando un déficit forrajero que se debe solucionar para mantener la producción estable a lo largo del año (Milot, 1969).

Para complementar estas especies ya presentes en los sistemas de producción existe la posibilidad de incorporar especies perenes de ciclo estival y metabolismo C4, tolerantes al frío y competitivas dentro de una pastura mezcla (Dall'Agnol y Gomes 1987, Campbell 1999). En este sentido, el grupo *Dilatata* es un complejo que cumple todas las características deseadas, mejorando y estabilizando la producción forrajera a lo largo del año, y también aumentando la persistencia de la pastura ya que se generarían menos espacios para la ocupación de malezas dentro de la pastura (Santiñaque y Carámbula, 1981).

En Uruguay con un clima templado y templado cálido, la presencia de especies estivales de metabolismo C4 juega un rol fundamental en la estabilidad ecológica del sistema debido a la complementariedad de los ciclos de crecimiento entre las gramíneas invernales y estivales (Jonhston 1996, Campbell et al. 1999). Uruguay ocurren heladas entre los meses de abril y octubre, que afecta a las especies estivales (De Mello, 2013).

C. GRUPO DILATATA

El grupo *Dilatata* es un complejo aloploiploide en el cual existen biotipos apomícticos y biotipos sexuales. El mejoramiento convencional de esta especie no es posible en aquellos biotipos apomícticos, por lo que es muy importante la inclusión de los biotipos sexuales para la generación de variabilidad (Sandro, 2014). Los biotipos sexuales se destacan por su mejor producción de semillas y baja infección por el hongo *claviceps*, esto vinculado a su sistema reproductivo, determina que el estudio del complejo de especies y biotipos vinculados a *Paspalum dilatatum* sea de gran interés para el mejoramiento de los sistemas de producción forrajera (Schrauf y Blanco, 2003).

Como principales limitantes a la incorporación de esta gramínea en el sistema, se destaca su variabilidad en la producción de semillas, asociado a la susceptibilidad de muchos biotipos al hongo *claviceps* (Speranza, 2017), y a su variabilidad al momento de la implantación, debido a que muchas semillas presentan alta dormición impidiendo el rápido establecimiento de las plantas en el campo (Glison et al., 2017).

Este género está compuesto por cerca de 330 especies (Clayton y Renvoize, 1986) y presenta una extensa distribución geográfica (Aliscioni, 2000).

Las características morfológicas que definen el género son:

- Inflorescencias en panojas de racimos con espiguillas insertas unilateralmente
- Espiguillas plano-convexas
- El dorso de la lema superior en posición adaxial
- Espiguillas con una sola flor fértil
- Ausencia de gluma inferior y pálea inferior

En el grupo Dilatata existen entidades apomíticas y sexuales. La relación entre ellas es compleja, los rangos taxonómicos formalmente reconocidos son arbitrarios, y se los refiere como “biotipos” (Speranza, 2005).

A nivel taxonómico se reconocen formalmente cuatro especies:

- “*P. urvillei* Steud.,
- *P. dasypleurum* Kunze ex Desv.,
- *P. pauciciliatum* (Parodi) Herter,
- *P. dilatatum* Poir, con dos subespecies, diferenciadas por la pigmentación de las anteras
 - *P. dilatatum* ssp. *flavescens* que incluye los biotipos Vacaria, Virasoro y Flavescens, todos de anteras amarillas y diferenciados por su lugar de origen y
 - *Paspalum dilatatum* ssp. *dilatatum* que es un clon apomítico de anteras violetas” (Zuloaga y Morrone, 2005).

Clasificando las entidades por su fórmula genómica, se distinguen seis biotipos tetraploides de fórmula genómica IIJJ, bien diferenciados geográfica, genética y morfológicamente: cinco de ellos sexuales (*Paspalum dasypleurum*, *Paspalum dilatatum* ssp *flavescens*, *Paspalum dilatatum* “Virasoro”, *Paspalum dilatatum* “Vacaria” y *Paspalum urvillei*), uno apomítico (*Paspalum pauciciliatum*), todos de anteras amarillas; un pentaploide apomítico de fórmula genómica IIJJX (*Paspalum dilatatum* ssp. *dilatatum*) del cual se derivan además varios biotipos apomíticos monoclonales de diferentes niveles de ploidía, y tres biotipos hexaploides de fórmula genómica IIJJXX (*Paspalum dilatatum* “Chirú”, *Paspalum dilatatum* “Uruguaiana”, *Paspalum dilatatum* “Torres” todos de anteras violetas (Speranza, 2005).

Los miembros del grupo con su correspondiente fórmula genómica y su sistema reproductivo se enumeran en el siguiente cuadro:

Cuadro No. 1. Fórmulas genómicas y sistemas reproductivos de los miembros del grupo Dilatata de paspalum

Especies Biotipos	o 2n (x =10)	Fórmula genómica	Autores de la fórmula genómica	Sistema reproductivo
<i>Paspalum dilatatum</i> ssp "flavescens "	40	IIJJ	Burson et al. (1973)	Sexual
<i>Paspalum dasyleurum</i>	40	IIJJ	Quarin y Caponio (1995)	Sexual
<i>Paspalum urvillei</i>	40	IIJJ	Burson (1979)	Sexual
<i>Paspalum dilatatum</i> "Virasoro"	40	IIJJ	Caponio y Quarin (1987)	Sexual
<i>Paspalum dilatatum</i> "Vacaria"	40	IIJJ	Quarin et al. (1993)	Sexual
<i>Paspalum pauciciliatum</i>	40	—		Apomixis
<i>Paspalum dilatatum</i> ssp. <i>Dilatatum</i>	50	IIJJX	Burson (1983)	Apomixis
	60	IIJJXX	Burson et al. (1991)	Apomixis
<i>Paspalum</i>	60	IIJJXX2	Burson (1992)	Apomixis

<i>dilatatum</i>			
"Uruguiana"			
Paspalum	60	–	Apomixis
<i>dilatatum</i>			
Torres			

Fuente: adaptado de Speranza (2009).

Burson et al. (1991), Burson (1992), destacan a los biotipos sexuales como fuente de variabilidad para el mejoramiento, aunque para paspalum los cruzamientos han sido poco frecuentes y la cruzabilidad dentro de los sexuales y apomíticos o entre ambos no han tenido éxito. Speranza (2009) menciona: “la posibilidad de lograr variabilidad es mayor entre biotipos sexuales, que entre biotipos de reproducción apomítica, por lo que son los primeros los que pueden utilizarse con fines de mejoramiento”.

1. Biotipos sexuales

A continuación, se mencionan la distribución geográfica y las principales características genotípicas y reproductivas de los materiales estudiados:

- *Paspalum dilatatum* spp. *flavescens*

Paspalum dilatatum spp. *flavescens* se encuentra en la región Sur de Uruguay y Noreste de la provincia de Buenos Aires, Argentina (Rosengurtt et al., 1970). Es altamente autógeno y las poblaciones están compuestas por una sola línea pura o grupo de líneas puras (Speranza, 2009).

- *Paspalum dilatatum* “Virasoro”

Paspalum dilatatum “Virasoro” fue descrito por primera vez en la localidad de Gobernador Virasoro en la República Argentina y se lo caracterizó por tener espiguillas de mayor tamaño, y con más nervaduras en lema y pálea que la subespecie *flavescens* (Caponio y Quarín, 1987). Es sexual con un sistema reproductivo autógeno (Hickenbick y Flores 1992, Speranza 2009), y tiene un menor nivel de dormición de sus semillas que la subespecie *flavescens* (Glison et al., 2017).

- *Paspalum dilatatum* “Vacaria”

Paspalum dilatatum “Vacaria” es originario de la región de “Campos de Cima da Serra” en la provincia de Rio Grande del Sur y el Planalto Catarinense y se hibrida espontáneamente con *P. urvillei* (Valls y Pozzobon, citados por Speranza, 2009).

- *Paspalum urvillei*

Paspalum urvillei es nativa de Argentina, Brasil y Uruguay (Sánchez, 1981). Tiene una gran resistencia frente al hongo *Claviceps* (Madina y Schrauf, 1999).

- *Paspalum dasypleurum*

Paspalum dasypleurum se encuentra en la zona centro y Sur de Chile (Zuloaga y Morrone, 2005). Su sistema reproductivo posiblemente sea menos autógeno que el de otras especies (Speranza, 2009).

En términos de escritura para simplificar la nomenclatura se nombrará a los genotipos como *Flavescens*, *Virasoro*, *Vacaria*, *Urvillei* y *Dasypleurum*, respectivamente.

2. Anatomía foliar

Existen diversas posturas en cuanto a la anatomía foliar de los genotipos de *Paspalum*. Aliscioni y Arriaga (1998) realizaron un estudio histofoliar, analizando las especies más representativas de *paspalum*, estableciendo que es un grupo heterogéneo. Sin embargo, Türpe (1967) menciona a *paspalum*: “*como un género homogéneo y establece que existe una gran relación entre los caracteres anatómicos y las condiciones ecológicas del medio*”.

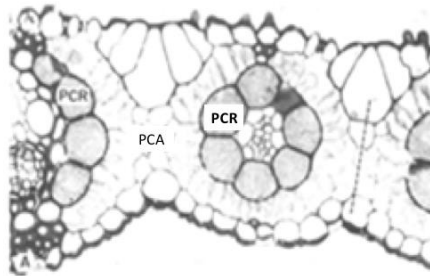
El mesófilo de *paspalum* se compone por parénquima clorofiliano compacto, con disposición radiada, con un solo ciclo de células alrededor de los haces vasculares y estomas distribuidos en ambas epidermis (Aliscioni, 2000).

En relación a su vía fotosintética, el género *Paspalum* es del tipo C4 con anatomía Kranz, de tipo bioquímico NADP-ME, siendo la enzima málico descarboxilasa dependiente de NADP encargada de la descarboxilación de la molécula de 4 átomos de carbono (Hattersley y Watson, 1976).

Anatómicamente, el ciclo del ácido C4 tiene una coordinación espacial dentro de las láminas foliares.

El primer paso del ciclo es la carboxilación del fosfoenolpiruvato, en el mesófilo de la hoja (PCA) y el segundo paso es la descarboxilación del ácido C4, en la vaina del haz parenquimatoso (PCR, Hattersley, 1983).

En la figura No. 1 se muestra un corte transversal de la lámina foliar de *Panicum coloratum* gramínea cuyo tipo bioquímico es igual a paspalum, donde se observa el mesófilo (PCA) y la vaina parenquimática (PCR) que rodea a cada haz vascular.



PCA, Células del mesófilo; PCR, Células del haz de la vaina.

Figura No. 1. Sección transversal de la hoja de *Panicum coloratum*

Fuente: adaptado de Hattersley (1983).

La ruta fotosintética C4 presenta una bomba de CO₂ que aumenta su concentración en regiones cercanas a los haces vasculares, permitiendo un suministro constante de CO₂ en el aparato fotosintético (Pearcy y Ehleringer, 1984). Esto le permite una ruta fotosintética más rápida y eficiente, mayor temperatura óptima y mayor rango de saturación de luz del proceso fotosintético y mayor eficiencia en el uso de agua y nitrógeno, brindándole notables ventajas competitivas, mayormente en veranos cálidos y húmedos (Campbell, 1999).

3. Producción de forraje y calidad

Saldanha et al. (2017) cuantificaron la producción y distribución estacional de materia seca (MS), y las características estructurales de genotipos de *Paspalum dilatatum* ssp. *dilatatum* y ssp. *flavescens*, *Paspalum urvillei*, y un cultivar producto de la retrocruza entre *Paspalum dilatatum* biotipo *Virasoro* y *Paspalum urvillei*, entre otros materiales. Se cuantificó una mayor producción inicial de *Paspalum dilatatum* Chirú (21 kg MS/ha/día) y *Paspalum urvillei*, no habiendo en los años siguientes, diferencias significativas en la producción de MS entre todos los biotipos estudiados.

En cuanto a sus características estructurales se evidenciaron ciclos reproductivos bien diferentes, siendo Chirú y Urvillei más tardíos en el inicio de floración que el resto de los genotipos (Saldanha et al., 2017).

Quintans y Speranza (2017) constataron una mayor producción de MS de “Chirú” con respecto a Flavescens en dos localidades evaluadas en el segundo año de vida en primavera-verano-otoño del periodo 2011-2012.

Asimismo, Chirú tuvo una producción más primaveral que Flavescens cuya producción fue más estival.

Estas características determinan la complementariedad que tendría cada genotipo con respecto a los otros componentes de una pastura mezcla, en cuanto a su ciclo productivo (Quintans y Speranza, 2017).

En cuanto al % de láminas y la calidad del forraje ofrecido (lámina, vaina y tallo) en la materia seca Chirú tuvo una mayor proporción de láminas con respecto a Flavescens en todo el ciclo y no se encontraron diferencias significativas entre ambos biotipos para calidad, evaluada por proteína cruda (PC), fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA, Quintans y Speranza, 2017).

4. Fisiología y características asociadas

El grupo Dilatata tiene limitantes productivas debido a la baja producción de semilla asociado a su susceptibilidad al hongo *Claviceps* que infecta los ovarios de las flores (Skerman y Riveros, 1992), a la alta variabilidad en la proporción de semillas llenas en los lotes cosechados y a la dormición prolongada de las semillas, que impide su rápido establecimiento luego de ser sembradas (Glison 2013, Glison et al. 2015).

Crush y Rowarth (2007) mencionan como principales limitantes para la utilización de las especies de este grupo, *“la poca tolerancia al frío y su baja calidad en comparación a las especies templadas C3”*.

Baars (1976) realizó un trabajo comparativo entre *Paspalum* y *raigrás*, sugiriendo una temperatura promedio de al menos 15 °C para que las tasas de crecimiento de *Paspalum* excedieran a *raigrás*, observándose una respuesta casi lineal del crecimiento a temperaturas de entre 15 ° C y 29 ° C para *Paspalum*, lo que se corresponde con el comportamiento esperado para especies C4 con respecto a C3.

En cuanto a la calidad se observó diferencias claras en azúcares solubles y digestibilidad, teniendo valores menores *Paspalum* con respecto a *raigrás* (Forde et al., 1976).

En relación a la respuesta ante niveles variables de CO₂, Kellogg et al. (1999) verificaron un aumento en la biomasa desde 350 a 700 $\mu\text{mol. mol}^{-1}$ siendo esta respuesta variable entre especies dentro de la subfamilia *Panicoideae*. En base a esto sugiere que esta *“variabilidad en la respuesta al incremento de CO₂ atmosférico estaría reflejando la diversidad en regulación, en lugar de aclimatación o cambios en la asignación de carbono fuente-sumidero”*.

D. FLUORESCENCIA DE CLOROFILA

En la fase fotoquímica de la fotosíntesis la energía de la luz incidente es absorbida por las clorofilas (P680) de los fotosistemas, para luego ser utilizada en la fase bioquímica del proceso fotosintético. El proceso de conversión de energía durante la fotosíntesis comienza cuando la energía almacenada en un fotón es canalizada a través de los centros de reacción del fotosistema II (PSII) y pasa a transformarse en energía química que es retenida en moléculas denominadas plastoquinonas. En la figura No. 2, se detalla el primer sistema molecular capaz de absorber la luz denominado fotosistema II. Aquí es donde se dan los procesos de absorción, transmisión y conversión de energía luminosa en energía química.

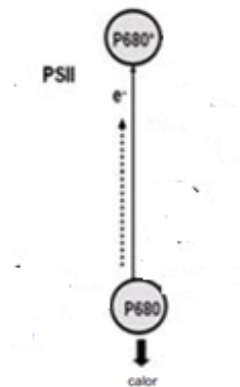


Figura No. 2. Cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema dos en la fase rápida

Fuente: adaptado de González et al. (2008).

Durante este proceso de conversión una parte de la energía absorbida se pierde como calor y otra parte es re-emitida como energía luminosa bajo forma de fluorescencia. Esta distribución de la energía ocurre simultáneamente, de tal forma que el aumento en uno de los procesos resulta en la disminución de los otros dos. Con esta relación se puede obtener información de la eficiencia fotoquímica (González et al., 2008). Por tanto, la conversión de energía lumínica en energía química en la fotosíntesis, puede ser estimado a

partir de la fluorescencia de clorofilas, principalmente de aquellas que conforman el complejo antena del PSII (Baker, 2008). La disipación como fluorescencia se utiliza en el análisis de extinción que permite analizar tanto la capacidad fotosintética como la forma en que utilizan la energía las distintas especies fotosintéticas, en este caso los biotipos de paspalum. Este análisis evalúa cambios en el PSII, en el flujo de electrones y en la forma de disipar el exceso de energía en las plantas.

La energía que se disipa en forma de calor es aquella que sobrepasa la capacidad de utilización de la cadena transportadora de electrones, siendo necesario su disipación para evitar una acumulación de excitación que sería dañino para el aparato fotosintético (Del Carmen, 2000).

La fluorescencia emitida por la clorofila de las plantas (fluorescencia de clorofila) refleja la actividad fotosintética, por lo que su medición constituye una herramienta poderosa en fisiología (Krause y Weis, 1984).

1. Utilización de la energía en el fotosistema II

La energía que pasa por el PSII es utilizada para excitar los electrones y comenzar el flujo de electrones lineal (LEF) que será luego utilizada en el fotosistema I (PSI) para producir ATP y NADPH que alimentarán al ciclo de Calvin.

Baker (2008) señala que: *“El indicador orientativo de este proceso es el rendimiento cuántico, ya que por su definición es el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas”*.

2. Modelo funcional para cuantificar fluorescencia

Butler (1978) propone al uso de fluorescencia de clorofila como herramienta para examinar el rendimiento fotosintético y el estrés en algas y plantas, formulando varios parámetros cuantitativos de fluorescencia para evaluar el rendimiento fotosintético in vivo e identificar variables que inciden en los cambios en la fotosíntesis y rendimiento en las plantas. En base a esto

desarrolla un modelo simple en donde la fotoquímica del proceso fotosintético compite con los procesos de fluorescencia y calor emitido.

Las mediciones se realizan en la clorofila asociados al PSII, antes de la transferencia de electrones al aceptor primario de quinona del PSII (Baker, 2008).

Los caminos de la energía que se cuantifican son tres:

- Procesos de fotoquímica
- Fluorescencia de clorofila
- Pérdida de calor

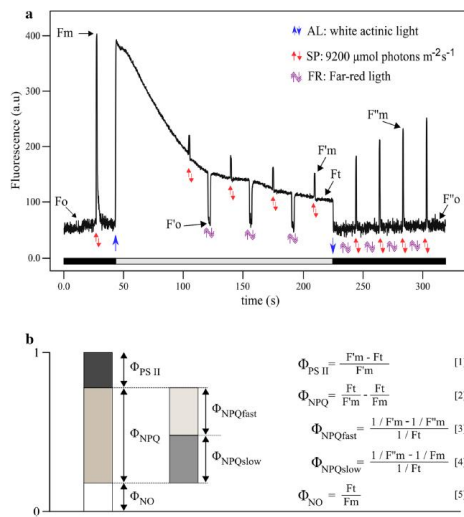
Estos procesos compiten directamente por la energía de excitación, que se produce por la adición de luz que incide en las hojas (Baker, 2008).

Los aparatos utilizados son fluorímetros que utilizan haces de medición moduladas, con fases y frecuencias establecidas que permiten detectar cambios de fluorescencias. Esto permite la determinación rutinaria, no destructiva y cuantitativa de los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos en hojas mediante la aplicación de pulsos de luz saturante (menos de 1 s, Butler, 1978).

1. Efecto o curva de Kautsky

La emisión de fluorescencia presenta una curva característica denominada “curva de Kautsky”, cuyos parámetros son utilizados en la interpretación del rendimiento cuántico del PSII (Zúñiga, 2003).

El modelo de la curva se presenta en la figura No. 3:



a. La barra de la parte inferior indica si la luz actínica se encuentra apagada (barra negra) o encendida (barra gris). La barra gris se corresponde con el análisis de quenching y la segunda barra negra con el análisis de relajación. Flechas hacia arriba y abajo indican encendido y apagado de luz Actínica (AL), pulsos saturantes (SP) y rojo lejano (FR). b. Relación entre rendimientos cuánticos y determinación de ecuaciones.

Figura No. 3. Ejemplo de perfil de medición de fluorescencia mediante análisis de quenching y de relajación con fluorómetro de clorofila modulada en amplitud de pulso

Fuente: adaptado de Quero et al. (2019).

Esta curva describe la emisión de fluorescencia en función del tiempo a distintas intensidades de luz. La fluorescencia variable es un valor indicativo de la capacidad del PSII para realizar fotoquímica primaria (Baker, 2008). La disminución de la fluorescencia más allá de su valor máximo hasta llegar a F_0 y responde a la activación de los procesos, relacionados con la transformación de la energía en el PSII y la cadena transportadora de electrones. A partir de los valores de fluorescencia se pueden estimar tres parámetros que caracterizan el proceso fotoquímico. Estos parámetros son:

- Φ_{Po} o F_v/F_m , que se correlaciona con el rendimiento cuántico máximo del PSII (Baker, 2008).
- Apagamiento fotoquímico (Φ_{PSII}) que se correlaciona con el rendimiento operativo del PSII.

- Apagamiento no fotoquímico (Φ_{NPQ}) que se correlaciona con la disipación térmica de la energía. Que no es utilizada en el proceso fotoquímico.

Los dos últimos parámetros describen la distribución de la energía, y ambos representan los rendimientos cuánticos principales.

3. Apagamiento no fotoquímico (Φ_{NPQ})

El apagamiento fotoquímico (Φ_{PSII}) es efectivamente la proporción de la energía que se absorbe y es utilizado en el PSII. En cambio, el apagamiento no fotoquímico (Φ_{NPQ}) representa ese exceso de energía que la planta debe eliminar en forma de calor (Constanza et al., 2015).

Esta forma de disipar la energía es la parte no fotoquímica del proceso. Existen dos tipos de extinción:

- Constitutiva basal
- Inducida por luz

La primera forma de disipar la energía es la que se utiliza para mantener el fotosistema estable, y la segunda se utiliza cuando la energía absorbida puede causar daño en el aparato fotosintético de la planta (Baker, 2008).

Las disipaciones inducidas por luz se cuantifican dentro del coeficiente Φ_{NPQ} , que se disocian en " $\Phi_{NPQ.fast}$ " y " $\Phi_{NPQ.slow}$ ".

El primero corresponde a procesos dentro de la hoja que controlan el exceso de energía, siendo un proceso regulado dentro del ciclo de las xantofilas. Y el segundo representa realmente el daño en la hoja que la planta no puede controlar y es inducida por luz respectivamente (Pérez, 2000).

En el cuadro No. 2, se describen los parámetros de fluorescencia de clorofila.

Cuadro No. 2. Parámetros de fluorescencia de clorofila

Parámetros	Descripción
Φ_{P_0}	Rendimiento máximo antes de las pérdidas
Φ_{Pot}	Rendimiento cuántico potencial, descuenta la pérdida de calor. Determina cuanta energía está disponible para los procesos fotosintéticos
Φ_{PSII}	Energía que se usa en el fotosistema II para transferir electrones. Rendimiento cuántico del PSII
Φ_{NO}	Disipación basal del sistema (forma parte de la estructura de los cloroplastos). Proceso disipativo no regulado por la planta. Puede ser por daño o por estructura del mecanismo fotosintético
Φ_{NPQ}	Disipación de calor controlada para evitar daño
$\Phi_{NPQ.fast}$	Mecanismo de regulación de calor (protección lumínica), ciclo de xantofila (proteína proceso regulado con el fin de controlar el exceso de energía)
$\Phi_{NPQ.slow}$	Mecanismo de regulación de calor, representa el calor que la planta no puede controlar y provoca daño a la hoja.

Fuente: adaptado de Quero et al. (2019).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. COLECCIÓN

El trabajo se realizó con 5 biotipos de distintos orígenes según se ve en el cuadro No. 3.

Cuadro No. 3. Biotipos de paspalum con sus correspondientes orígenes

Biotipo	Origen
<i>Paspalum dilatatum</i> spp. <i>flavescens</i>	línea pura 1S
<i>Paspalum dilatatum</i> “ <i>Virasoro</i> ”	Corrientes, Argentina
<i>Paspalum dilatatum</i> “ <i>Vacaria</i> ”	Planalto, Rio Grande do Sul
<i>Paspalum urvillei</i>	Sur de Uruguay
<i>Paspalum dasypleurum</i>	Chile

Fuente: adaptado de Speranza (2009).

Estos materiales se obtuvieron como resultado de una prospección realizada por el grupo disciplinario Botánica y Recursos Fitogenéticos para diversos estudios posteriores.

Los biotipos estaban instalados en canteros dentro de la Facultad de Agronomía, sede Sayago. Se obtuvieron tres plantas por biotipo por división de matas a partir de estas y se mantuvieron en invernáculo, en macetas de 22 cm de diámetro con un volumen aproximado de 8 litros de tierra preparada.

El experimento fue instalado bajo un diseño completamente al azar, con tres repeticiones por biotipo (*Flavescens*, *Virasoro*, *Vacaria*, *Urvillei* y *Dasypleurum*).

Las muestras colectadas fueron utilizadas para la colecta de fragmentos de hoja, estudios anatómicos y para la lectura de parámetros fisiológicos.

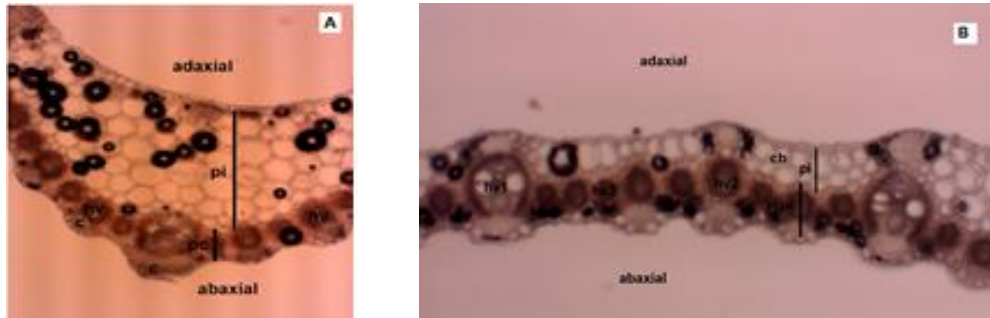
B. CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA

Para la caracterización anatómica, en cada planta la zona de muestreo fue estandarizada, tomándose la segunda hoja desarrollada de un macollo, de la que se extrajo un fragmento de la parte media. Estos fragmentos fueron fijados en una solución de FAA (formol, ácido acético y alcohol etílico) durante 48hs y luego de enjuagadas en agua destilada se conservaron en alcohol 70° hasta el momento del corte (Zarlavsky, 2014). La visualización se realizó con una cámara digital modelo Dino Eye 2.0, acoplada en un microscopio Nikon E100. Las imágenes se tomaron con un aumento de 40X para espesor del tejido foliar y 100X para conteo de estomas.

1. Espesor del tejido foliar

Se realizaron cortes transversales en la zona media de la lámina y del nervio medio en tres plantas por biotipo. En estas regiones del tejido foliar se midió espesor del parénquima total, incoloro y clorofiliano. Las medidas tomadas fueron en micrómetros (μm). Se tomaron imágenes a través del microscopio, a lo largo de todo el ancho de la hoja, desde el nervio medio hasta el final de la lámina. Las medidas para nervio medio se tomaron en el centro de la misma y para lámina en la primera imagen en que el espesor se hacía homogéneo.

A continuación, se muestran imágenes tomadas con el microscopio con la descripción de los componentes del tejido foliar.



A. Nervio medio B. Parte lateral de la lámina. Referencias: pi, parénquima incoloro; pc, parénquima clorofiliano; hv1-3, haces vasculares primer a tercer orden; c, costillas; cb, células buliformes. Imagen obtenida con un aumento de 40X.

Figura No. 4. Regiones de la lámina observadas en el corte transversal

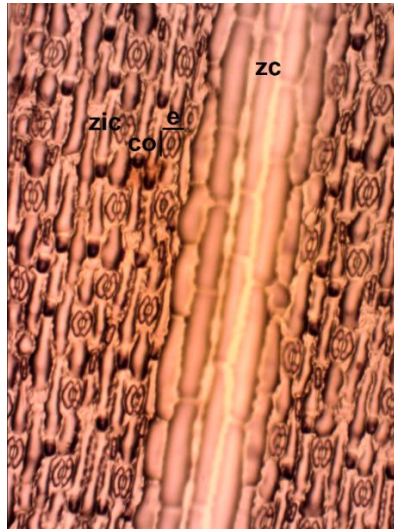
En la figura No. 4 se detallan costillas y células buliformes en grupos extensos, característico de este tipo de tejido.

2. Conteo de estomas

Para observar la cantidad de estomas en el tejido foliar se hicieron levantados de epidermis en la zona abaxial del fragmento de hoja, conservado en alcohol 70. Se utilizó esmalte sintético con el objetivo de lograr una fina película sobre la superficie foliar que al ser retirada muestra la impresión del relieve de las células, lo que permite identificar los diferentes tipos celulares presentes y contar los estomas por unidad de superficie.

Se tomaron cinco fotografías a lo largo del fragmento muestreado, de 5 plantas por biotipo, con las mismas herramientas de visualización mencionadas anteriormente.

A continuación, se muestra una imagen tomada con el microscopio con la descripción de los componentes del tejido foliar.



e, estomas; co, células oclusivas; zic, zona intercostal; zc, zona costal. Imagen obtenida con un aumento de 100X.

Figura No. 5. Levantado de epidermis

Para calcular la densidad estomática se calculó el área de visualización a través de la cámara del microscopio. La metodología consiste en colocar un porta objeto calibrado en el área de visualización del microscopio, se le saca una foto y luego se orienta para medir ancho y largo de la imagen que se está analizando, determinando el área del objetivo. Con el aumento 100X se observó 48 divisiones de largo y 36,5 divisiones de altura, lo que corresponde a 0,48 mm por 0,365 mm respectivamente, siendo un área de visualización de 0,17 mm², para llevar el valor a un área de 1 mm² se debe multiplicar por el factor 5,88.

C. PARTICIÓN DE LA ENERGÍA

La fluorescencia de clorofilas se cuantificó con un fluorometro de pulso de amplitud modulada (PAM, FMS1 Hansatech®). Se seleccionó una hoja por cada maceta repitiendo este método en tres macetas distintas por cada biotipo. Las plantas estaban en estado vegetativo, y las hojas se encontraban ya desarrolladas sin daño de patógenos o en senescencia. Para cuantificar la partición de la energía en PSII, primero se realizó un análisis de enfriamiento

(plantas adaptadas a la luz), seguido de un análisis de relajación, (adaptado a la oscuridad después del periodo de luz, Quero et al., 2019).

Este análisis se basa en la idea de que la suma de todos los procesos disipativos de energía absorbida por PSII es igual a 1.

$$\Phi_{PSII} + \Phi_{NPQ} + \Phi_{NO} = 1$$

Las ecuaciones que permiten llegar a los valores de Φ_{PSII} , Φ_{NPQ} y Φ_{NO} se detallan en la figura No. 3, en las ecuaciones [1], [2] y [5], respectivamente.

Φ_{PSII} es el rendimiento cuántico de PSII, Φ_{NPQ} es el enfriamiento no fotoquímico y Φ_{NO} es el rendimiento cuántico de los procesos de disipación no fotoquímica constitutivos no reguladores (basales u oscuros, Quero et al., 2019).

Las plantas de cada maceta se sometieron a tres intensidades de luz 255, 778 y 1500 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para analizar la fluorescencia y así poder estimar la capacidad del fotosistema II en realizar fotoquímica primaria.

El rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica del PSII para un estado adaptado a la oscuridad, Φ_{Po} , se calculó como:

$$\Phi_{Po} = F_m - F_o / F_m = F_v / F_m$$

El rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica de PSII para el estado adaptado a la luz, $\Phi_{PSII.pot}$, se calculó como:

$$\Phi_{PSII.pot} = F'_m - F'_o / F'_m = F'_v / F'_m.$$

1. Diseño experimental y estadístico

El experimento fue instalado bajo un diseño completamente al azar, con 3 repeticiones por biotipo (Flavescens, Virasoro, Vacaria, Urvillei y Dasyleurum). El tratamiento queda definido por la interacción entre los niveles del factor biotipo y nivel de luz actínica.

Para el análisis estadístico de las variables de fluorescencia se usó un modelo lineal general con arreglo factorial. Luego de la verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza se realizó un análisis de

varianza (ANOVA) para establecer si hubo efecto significativo de alguno de los factores. Luego se realizó un análisis de contrastes para establecer diferencias entre las medias de los tratamientos identificados como significativos por el ANOVA. El análisis estadístico se realizó con el software libre R (R Core Team, 2017). Los contrastes ortogonales se realizaron con el paquete de R emmeans (Russell et al., 2022).

El modelo lineal general fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + LA_i + B_j + (LA*B)_{ij} + Error_{ij}$$

Donde,

LA_i es el efecto del i -ésimo nivel de actínica (255, 778 y 1500 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). B_j es el efecto del j -ésimo nivel de biotipo (Flavescens, Virasoro, Vacaria, Urvillei y Dasyleprium). $(LA*B)_{ij}$ es la interacción entre el i -ésimo nivel de LA y el j -ésimo nivel de B. $Error_{ij}$ es el error asociado a cada unidad experimental.

Para el análisis estadístico de las variables anatómicas se usó un modelo lineal general. Luego de la verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para establecer si hubo efecto significativo del factor analizado. Luego se realizó un análisis de contrastes para establecer diferencias entre las medias de los diferentes niveles del factor. El análisis estadístico se realizó con el software libre R (R Core Team, 2017). Los contrastes ortogonales se realizaron con el paquete de R emmeans (Russell et al., 2022).

El modelo lineal general fue el siguiente:

$$Y_j = \mu + B_j + Error_{ij}$$

Donde,

B_j es el efecto del j -ésimo nivel de biotipo (Flavescens, Virasoro, Vacaria, Urvillei y Dasyleprium). $Error_{ij}$ es el error asociado a cada unidad experimental

IV. RESULTADOS

A. ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA

En el cuadro No. 4 se muestra la división de energía incidente en sus principales componentes.

En promedio para todos los genotipos, para 255 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, entre el 50 al 58 % de la energía incidente se utilizó en los procesos fotoquímicos. A este nivel de radiación del 26 al 35 % de la energía total se disipa como calor de manera regulada. Mientras que solo del 15 al 16 % se disipa de manera no regulada.

A 778 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la energía que se utiliza en los procesos fotoquímicos baja, y se ubica en un rango de 22 % a 30 %, en cambio a estos niveles de luz actínica incidente aumenta la disipación de calor en forma regulada, tomando valores de 53 % a 63 % respectivamente.

A 1500 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entre el 13 y el 16 % de la luz actínica se utiliza para procesos fotoquímicos, el resto se disipa en forma de calor. La disipación en forma de calor regulada tomo valores que van desde 67 al 71 %, siendo destacable este aumento en la disipación de calor en forma regulada.

Se destaca la perdida basal de calor (ΦNO) que varía muy poco ante cambios en la luz actínica, ya que los valores tomados fueron desde un 13 % a un 19 %.

En general, a medida que aumenta la cantidad de luz actínica incidente, la proporción de luz que se utiliza para los procesos fotoquímicos baja, aumentando la proporción de luz que se disipa como calor, destinándose esta pérdida hacia un proceso regulatorio de disipación ($\Phi \text{NPQ. fast}$), que también aumenta en el mismo sentido.

Analizando los resultados de partición de energía del PSII por genotipo se destaca que la mayoría tuvieron el mismo comportamiento mencionado.

Virasoro tuvo un comportamiento distinto a 778 y 1500 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ya que no tuvo diferencias en la proporción de luz utilizada para los

procesos fotoquímicos, y obtuvo los mayores valores de disipación de calor, 63 %y 71 %, respectivamente.

Cabe destacar que *Dasyleurum* tuvo un comportamiento similar a *Virasoro* pero sin diferencias significativas y por lo tanto, sigue la misma tendencia que el resto de los genotipos.

Urvillei en cambio tuvo diferencias en relación al comportamiento del resto de los genotipos en la disipación basal de calor (Φ_{NO}), siendo distinto en todos los valores de luz actínica y tomando los mayores valores de disipación de calor no regulada (Φ_{NPQ} . Slow).

Cuadro No. 4. Análisis de fluorescencia y relajación para los biotipos de paspalum, variando la luz actínica.

Biotipo	Luz Act.	Análisis de quenching					Análisis de relajación	
		Φ_{P_0}	$\Phi_{PS II, pot}$	Φ_{PSII}	Φ_{NPQ}	Φ_{NO}	$\Phi_{NPQ. Slow}$	$\Phi_{NPQ. fast}$
Dasylepium	255	0,83 a	0,61 b	0,51 c	0,33 a	0,16 a	0,02 a	0,31 a
	778	0,82 a	0,49 a	0,23 b	0,60 b	0,16 a	0,03 ab	0,57 b
	1500	0,85 a	0,50 a	0,13 a	0,71 c	0,16 a	0,05 b	0,66 c
Flavescens	255	0,83 a	0,66 b	0,58 c	0,26 a	0,16 a	0,02 a	0,24 a
	778	0,80 a	0,46 a	0,28 b	0,57 b	0,15 a	0,04 a	0,52 b
	1500	0,84 a	0,47 a	0,16 a	0,70 c	0,14 a	0,05 a	0,65 c
Urvillei	255	0,85 b	0,64 b	0,55 c	0,31 a	0,15 ab	0,03 a	0,27 a
	778			0,30 b				
	1500	0,81 a	0,50 a	0,18 a	0,53 b	0,17 b	0,08 b	0,46 b
Vacaria	255	0,84 b	0,65 b	0,52 c	0,31 a	0,17 a	0,01 a	0,30 a
	778			0,26 b				
	1500	0,80 a	0,50 a	0,14 a	0,55 b	0,19 a	0,04 a	0,51 b
Virasoro	255	0,82 ab	0,59 b	0,50 b	0,35 a	0,16 a	0,03 a	0,32 a
	778	0,80 a	0,44 a	0,22 a	0,63 b	0,15 a	0,06 b	0,56 b
	1500	0,84 b	0,49 a	0,13 a	0,71 b	0,16 a	0,06 ab	0,65 c

B. ANATOMÍA FOLIAR

1. Corte transversal

Analizando la figura No. 6 se observa la presencia de parénquima incoloro hacia la cara adaxial en la zona del nervio medio; éste es de forma aquillada en *Flavescens*, *Vacaria* y *Virasoro* con el dorso pronunciado, mientras que en *Urvillei* y *Dasypleurum* es más redondeado; la epidermis es lisa.

En la zona abaxial en ambos cortes existen haces vasculares de primer, segundo y tercer orden de contorno circular, también costillas en mayor cantidad que la zona adaxial.

A continuación, se muestra imágenes del nervio medio para todos los biotipos.

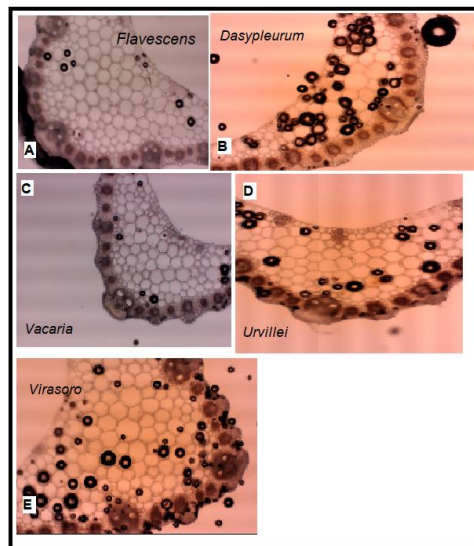


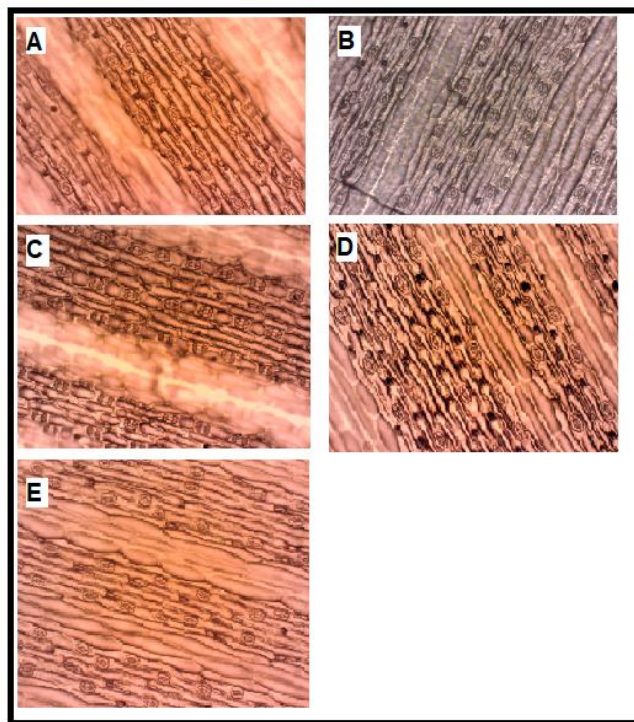
Imagen obtenida con un aumento de 40X.

Figura No. 6. Corte transversal de la zona del nervio medio para todos los biotipos

2. Levantado de epidermis

Analizando la figura No. 7 se observa que las zonas costales e intercostales son distinguibles, la primera formada por 4-5 células de ancho, y la zona intercostal con mayor variabilidad en la cantidad de células. Los estomas se encuentran alineados en la zona intercostal.

A continuación, se muestra imágenes del levantado de epidermis para cada biotipo.



A. Flavescens B. Dasyleurum C. Vacaria D. Urvillei E. Virasoro. Imagen obtenida con un aumento de 100X.

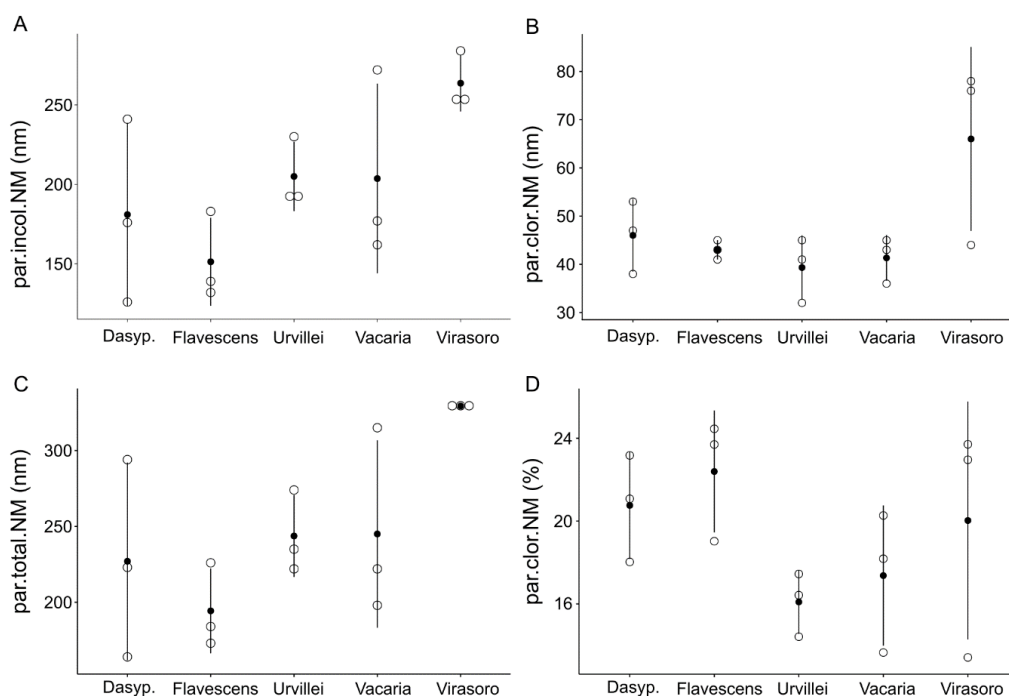
Figura No. 7. Levantado de epidermis para cada biotipo

C. MEDICIONES DE HOJA

Los resultados de las medidas tomadas en la hoja correspondiente a espesor de la lámina, nervio medio y número de estomas, se muestran en las figuras No. 8, No. 9 y No. 10.

1. Nervio medio

En la figura No. 8 se muestran los resultados para espesor del parénquima clorofiliano, parénquima incoloro y parénquima total del nervio medio y la proporción del parénquima clorofiliano en relación al total.



(A), clorofiliano (B), parénquima total (C) y proporción del parénquima clorofiliano en relación al total (D).

Las medidas están en μm en A, B, C y en proporción con respecto al nervio medio Total en D.

Figura No. 8. Espesor del parénquima incoloro del nervio medio

En la figura No. 8 analizando todas las variables, el nervio medio tuvo un espesor similar en todos los genotipos, excepto Virasoro que mostró los mayores valores de parénquima incoloro (figura No. 8A) y parénquima clorofiliano (figura No. 8B), aunque esta última con mayor variabilidad.

La suma de ambas variables determinó que también sea quien tenga mayor espesor del nervio medio (figura No. 8C).

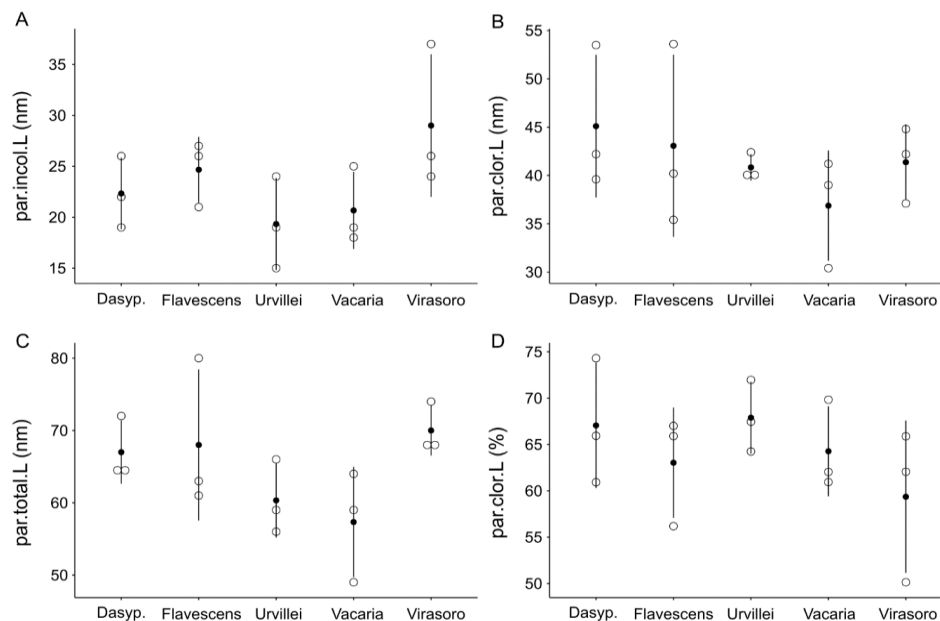
La proporción de parénquima clorofiliano en el total del nervio medio es distinta entre algunos genotipos. Los valores que toman los genotipos van desde 15 % a 24 % de parénquima clorofiliano en relación al parénquima total.

Flavescens mostró diferencias en esta variable con respecto a Urvillei, siendo menor el espesor de parénquima total y parénquima incoloro, e igual en parénquima clorofiliano, siendo en proporción más importante el parénquima clorofiliano en relación al parénquima total.

2. Lámina

En la figura No. 9 se muestran los resultados para espesor del parénquima clorofiliano, parénquima incoloro y parénquima total de la lámina.

Virasoro es quien tiene mayor espesor de parénquima incoloro y parénquima total en la lámina, el resto de los genotipos tiene un espesor similar. El grado de superposición de las medidas requeriría realizar mayor cantidad de determinaciones para poder concluir si hay diferencias en estas variables entre los distintos genotipos



(A), incoloro (B), clorofiliano (C) y proporción del parénquima clorofiliano en relación al total (D). Las medidas están en μm en A, B, C y en proporción con respecto a la lámina en D.

Figura No. 9. Espesor del parénquima de la lámina

Se destaca el mayor porcentaje de parénquima clorofiliano de la lámina en relación al mismo parénquima en la zona del nervio medio.

3. Densidad de estomas

En la figura No. 10 se muestran los resultados de densidad de estomas correspondiente al número de estomas en un área de 1 mm^2 .

La densidad estomática fue muy variable, con un alto grado de dispersión, siendo Vacaría el biotipo que mostró mayor dispersión. Dasyleurum (Dasyp.) tiene mayor número de estomas que Flavescens, para el resto de los biotipos no existen diferencias significativas en las medidas realizadas. El número de estomas por mm^2 va desde 264 estomas/ mm^2 en Urvillei a 117/ mm^2 estomas en Vacaria.

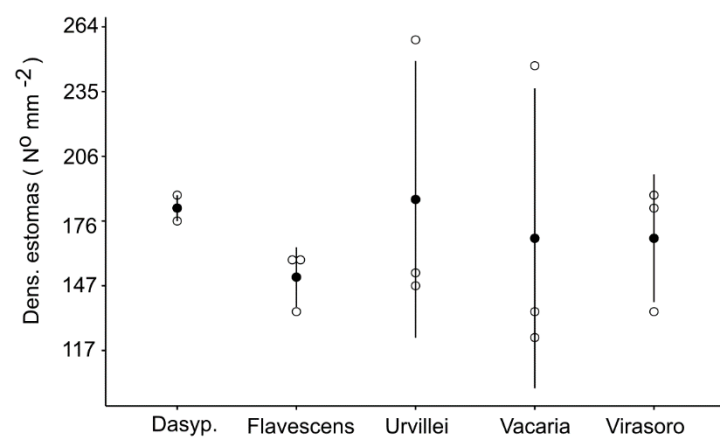


Figura No. 10. Densidad de estomas

V. DISCUSIÓN

A. ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA

La partición de energía se midió a través de fluorescencia, determinando la eficiencia de uso de la luz y el reparto energético a nivel fotoquímico.

Analizando el cuadro No. 1 en forma general se destaca que ante aumentos del flujo de fotones los procesos de transferencia de electrones y de disipación de calor compiten entre sí.

Al aumentar el flujo de fotones la tasa de transferencia de electrones en el PSII disminuye, aumentando la disipación de energía no fotoquímica, bajo forma de calor.

En relación a los biotipos se destacan *Urvillei* y *Flavescens* ya que obtuvieron en todos los flujos de fotones, los mayores valores de transferencia de electrones hacia procesos fotoquímicos y los mayores valores de disipación de energía en forma regulada, reflejando su buen funcionamiento.

En base a estos resultados estos biotipos tendrían un aparato fotosintético más eficiente, con mayor transferencia de electrones hacia la fase bioquímica y frente a excesos de luz son los que mejor controlan la energía, llevando este exceso hacia procesos que lo regulan y no generan daño al aparato fotoquímico.

En cuanto a los valores de disipación de energía en forma de calor todos los biotipos controlaron las pérdidas, siendo muy bajo en proporción la pérdida de energía no controlada, siendo esto destacable para el grupo de *paspalum*.

En todos los biotipos la eficiencia cuántica baja ante aumentos en la cantidad de luz incidente, reflejando la menor capacidad del aparato fotosintético de aceptar electrones por parte de los aceptores en el fotosistema II.

A 225 cmol el biotipo *Flavescens* es quien tiene el mayor rendimiento cuántico, pero este ranking se modifica ante aumentos en el flujo de electrones. El biotipo *Urvillei* pasa a tener el mayor rendimiento cuántico.

Este comportamiento determina diferencias en la capacidad del aparato fotosintético a distintos niveles de flujo de electrones, y existe diferencias entre biotipos en la adaptación a distintos rangos de luz. La caída del rendimiento cuántico en función del flujo de electrones, con lleva a que los excesos de electrones se desvíen hacia vías alternas, para que no se provoque un daño en el aparato fotosintético. Esta capacidad de controlar el exceso de electrones, se disipa como calor o fluorescencia ya que son mecanismos que compiten con la fase fotoquímica, siendo estas vías, formas de disipación de la energía.

Este proceso se refleja en los coeficientes “apagamiento no fotoquímico” (Φ .NPQ) y en la “disipación basal” (Φ .NO).

Lo primero a destacar es el aumento del Φ .NPQ ante aumentos en el flujo de electrones, indicando que una de las vías de disipación de la energía es bajo forma de calor controlada. Este valor indica la proporción de luz que está dirigiéndose a la vía de disipación por calor, pudiendo estar relacionado con la protección del aparato fotosintético a partir del ciclo de las zeaxantinas.

En este coeficiente todos los biotipos se comportan en forma similar, pero existe diferencia entre ellos. Destacándose Virasoro con las mayores proporciones en todos los rangos de luz actínica.

Virasoro tuvo un comportamiento distinto, teniendo las menores proporciones de rendimiento cuántico, reflejando la menor capacidad del aparato fotosintético de realizar fotosíntesis y según el cuadro redirige ese exceso de luz que no puede procesar, a procesos que le permiten disipar ese exceso de luz, en concordancia con las mayores proporciones de Φ .NPQ con respecto al resto.

Dentro del “apagamiento no fotoquímico”, se destaca los altos valores del Φ NPQ. fast y los muy bajos valores del Φ NPQ. slow aunque no despreciables y reflejando diferencias entre biotipos.

En función de esto se puede deducir que paspalum es capaz de llevar ese exceso de energía a procesos que lo controlan limitando los daños que pueden provocar al aparato fotosintético el exceso de luz incidente.

Como debería esperarse las proporciones de estos coeficientes aumentan ante aumentos en el flujo de electrones. El Φ NPQ. fast es el proceso que cuantifica la proporción del exceso de energía que es controlada por la planta, y sus valores arrojaron algunas diferencias entre biotipos. Dasyleprium

y Virasoro tuvieron las mayores proporciones destinadas a este proceso, y Urvillei el menor.

En el caso de Φ NPQ. slow con bajos valores, pero como se mencionó en párrafos anteriores con diferencias. Se destaca Urvillei con los mayores valores a 778 cmol y 1500 cmol, en concordancia con lo mencionado anteriormente con respecto al NPQ fast.

En cuanto a la disipación basal del aparato fotosintético permanece estable frente a aumentos en el flujo de electrones en todos los biotipos y sin diferencias claras entre ellos, y sin un patrón claro frente a aumentos en el flujo de electrones.

Otro aspecto a destacar es Urvillei con un comportamiento opuesto a Virasoro. Es el de mayor rendimiento cuántico a los rangos de 778 cmol y 1500 cmol, pero con las menores proporciones en Φ NPQ. fast y mayor Φ NPQ. slow con respecto al resto de los biotipos. Se destaca la buena capacidad del aparato fotosintético de realizar fotosíntesis y aun así presenta un menor control del exceso de energía, con la posibilidad que ocasione daños en la planta, por el mayor Φ NPQ. slow con respecto al resto de los biotipos.

B. ANATOMÍA DE HOJA

No hubo diferencias en el espesor del nervio medio, el espesor de la lámina y el conteo de estomas entre los biotipos. Los rangos observados van entre 100-300 μ m para el parénquima total del nervio medio, de 50 a 80 μ m para el parénquima total de la lámina y entre 264 a 117 estomas por mm², para todos los biotipos estudiados.

El espesor del parénquima clorofiliano en el nervio medio representa una proporción menor que en la lámina, reflejando la función más de sostén por parte del nervio medio, teniendo la lámina la función principal de fotosíntesis, y asimilación de CO₂.

VI. CONCLUSIONES

El objetivo era caracterizar fisiológicamente y anatómicamente biotipos sexuales de *paspalum*. Estos datos extraídos pueden ser fuente de mejoramiento, ya que son parámetros que se pueden utilizar para comparar en términos fisiológicos y anatómicos con otras especies de interés, siendo una fuente de información más para los procesos de mejoramiento y selección de biotipos para su domesticación e incorporarlos al proceso productivo.

1. Los biotipos de *paspalum* tienen diferencias en cuanto a su capacidad fotosintética y la forma en que controlan el exceso de luz incidente.

2. En todos los biotipos con el aumento de luz incidente, la energía utilizada para los procesos fotoquímicos baja y aumentan los mecanismos de regulación, siendo el comportamiento esperado.

3. *Urvillei* y *Flavescens* son los biotipos con mayor energía absorbida para transferencia de electrones, y los que mejor controlan el exceso de energía, siendo por lo tanto más eficientes en el uso de la energía a mayores intensidades.

4. No existió diferencias claras en los parámetros anatómicos analizados, estando todos los biotipos en un mismo rango de variación.

VII. RESUMEN

Se caracterizaron cinco biotipos sexuales de *Paspalum* de diferentes orígenes. El objetivo del trabajo fue caracterizar anatómicamente y fisiológicamente al germoplasma sexual analizando la distribución de sus estomas, espesor foliar (lámina y nervio medio) y la partición de energía del PSII. Los biotipos estaban instalados en canteros, se analizaron tres plantas por biotipo por división de matas y se mantuvieron en invernáculo. Para la caracterización anatómica, en cada planta la zona de muestreo fue estandarizada, tomándose la segunda hoja desarrollada de un macollo, de la que se extrajo un fragmento de la parte media. Se midió, por una parte, espesor del nervio medio y la lámina mediante corte transversal del tejido foliar y, por otra parte, se realizó un conteo de estomas mediante un levantado de epidermis. Para la caracterización fisiológica se seleccionó una hoja por cada maceta repitiendo este método en tres macetas distintas por cada biotipo. Las plantas estaban en estado vegetativo, y las hojas se encontraban ya desarrolladas sin daño de patógenos o en senescencia. Se cuantificó la partición de energía en el PSII utilizando tres intensidades de luz actínica (255, 778 y 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y se ajustó un protocolo de medición. La partición se calculó con los indicadores ΦPSII , ΦNPQ , ΦNO , $\Phi\text{NPQ.fast}$ y $\Phi\text{NPQ.slow}$ mediante análisis de quenching. En los parámetros anatómicos analizados no hubo diferencias entre los biotipos, estando todos en un mismo rango de medición. Los rangos observados van entre 100-300 μm para el parénquima total del nervio medio, de 50 a 80 μm para el parénquima total de la lámina y entre 264 a 117 estomas por mm^2 , para todos los biotipos estudiados. En todos los biotipos ante aumentos en la intensidad de luz incidente la energía utilizada para los procesos fotoquímicos bajo y aumento los mecanismos de regulación. Existió diferencias en cuanto a su capacidad fotosintética y la forma en que se controló el exceso de luz incidente. *Urvillei* y *Flavescens* fueron los biotipos con mayor energía absorbida para transferencia de electrones, y los que mejor controlaron el exceso de energía, siendo por lo tanto más eficientes en el uso de la energía a mayores intensidades.

Palabras clave: *Paspalum*; Fotosíntesis; Partición; Anatomía foliar.

VIII. SUMMARY

Five *Paspalum* sex biotypes of different origins were characterized. The objective of the work was to characterize the sexual germplasm anatomically and physiologically by analyzing the distribution of its stomata, leaf thickness (lamina and midrib) and the energy partition of the PSII. The biotypes were installed in flowerbeds, three plants per biotype were analyzed by division of bushes and they were kept in a greenhouse. For the anatomical characterization, in each plant the sampling area was standardized, taking the second developed leaf of a tiller, from which a fragment of the middle part was extracted. On the one hand, the thickness of the midrib and the lamina was measured by cross section of the leaf tissue and, on the other hand, a stomata count was performed by lifting the epidermis. For the physiological characterization, a leaf was selected for each pot, repeating this method in three different pots for each biotype. The plants were in a vegetative state, and the leaves were already developed without damage from pathogens or in senescence. The energy partition in the PSII was quantified using three actinic light intensities (255, 778 and 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and a measurement protocol was adjusted. The ranges observed go between 100-300 μm for the total parenchyma of the median nerve, from 50 to 80 μm for the total parenchyma of the lamina and between 264 and 117 stomata per mm^2 , for all the biotypes studied. In all biotypes, when the intensity of incident light increases, the energy used for the photochemical processes lowers and increases the regulation mechanisms. There were differences in terms of their photosynthetic capacity and the way in which excess incident light was controlled. *Urvillei* and *Flavescens* were the biotypes with the highest energy absorbed for electron transfer, and the ones that best controlled excess energy, being therefore more efficient in the use of energy at higher intensities.

Keywords: *Paspalum*; Photosynthesis; Partition; Leaf anatomy.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Aliscioni, S.; Arriaga, M. O. 1998. Estudio histofoliar de las especies de los grupos Virgata y Quadrifaria del género *Paspalum* L. (Poaceae, Panicoideae, Paniceae). *Candollea*. 53:333-348.
2. _____. 2000. Anatomía ecológica de algunas especies del género *Paspalum* (Poaceae, Panicoideade, Paniceae). *Darwiniana*. 38(3-4):187-207.
3. Baker, N. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Physiology*. 59:89-113.
4. Bertino, M.; Bertoni, R.; Tajam, H.; Yaffe, J. 2001. El cambio estructural a través de los sectores. Montevideo, Instituto de Economía. 48 p. (Serie Documentos de Trabajo DT 6/01).
5. Burson, B.; Voigt, P.; Evers, G. 1991. Cytology, reproductive behavior, and forage potential of hexaploid dallisgrass biotypes. *Crop Science*. 31 (30):636-641.
6. _____. 1992. Cytology and reproductive behavior of hybrids between *Paspalum urvillei* and two hexaploid *P. dilatatum* biotypes. *Genome*. 35:1002-1006.
7. Butler, W. 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*. 29:345-378.
8. Campbell, B.; Mitchell, N.; Field, O. 1999. Climate profiles of temperate C3 and subtropical C4 species in New Zealand pastures. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 42(3):223-233.
9. Campbell, L. R. 1999. *Paspalum dilatatum* and *Axonopus affinis* in Australia. In: Loch, D. S.; Ferguson, J. eds. Forage seed production. Wallingford, CABI. v.2, pp. 325-333.
10. Caponio, I.; Quarín, C. 1987. El sistema genético de *Paspalum simplex* y de un híbrido interespecífico con *P. dilatatum*. *Kurtziana*. 19:35-45.

11. Carámbula, M. 2002. Pasturas y forrajes: potenciales y alternativas para producir forraje. Montevideo, Hemisferio. Sur. t.1, 357 p.
12. Clayton, W. D.; Renvoize, S. A. 1986. Genera graminum grasses of the world. Kew Bulletin. 12:196-211.
13. Constanza, S.; Humberto, O.; Helber, E. 2015. Fluorescencia como indicador de estrés en *Helianthus annuus* L. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. 9(1):149-160.
14. Crush, J. R.; Rowarth, J. S. 2007. The role of C4 grasses in new zealand pastoral systems. New Zealand Journal of Agricultural Research. 50(2):125-137.
15. Dall'Agnol, M.; Gomes, K. 1987. Avaliação inicial da produção de matéria seca de espécies do gênero *Paspalum*. In: Encontro Internacional sobre Melhoramiento Genético de *Paspalum* (1987, Nova Odessa). Anais. Nova Odessa, São Paulo. BR, Instituto de Zootecnia. cap. 1, pp. 15-21.
16. De Mello, S. 2013. Estudio climatológico y regionalización de heladas meteorológicas en Uruguay. Licenciatura en Ciencias de la Atmósfera. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Ingeniería. 94 p.
17. Forde, B.; Slack, C.; Roughan, P.; Whitehead, H. 1976. Growth of tropical and temperate grasses at Palmerston North. I. Warm season yields with and without irrigation. New Zealand Journal of Agricultural Research. 19:135-142.
18. Glison, N. 2013. Variabilidad en el comportamiento germinativo y en la dormición por cubiertas entre diferentes genotipos de *Paspalum dilatatum* Poir. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 78 p.
19. _____; Viega, L.; Cornaglia, P.; Gutiérrez, L.; Speranza, P. 2015. Variability in germination behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir. seeds is genotype dependent. Grass and Forage Science. 70(1):144-153.

20. _____.; _____.; Speranza, P. 2017. Variabilidad en la respuesta germinativa y en la dormición de semillas entre diferentes genotipos de *Paspalum dilatatum*. In: Speranza, P. ed. Utilización de gramíneas forrajeras del género *Paspalum* en Uruguay. Montevideo, INIA. pp. 36-42 (FPTA no. 61).
21. González, M.; Sergio, P.; Vela, H.; Salcedo, A.; Martha O. 2008. La fluorescencia de la clorofila como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. Revista de Educación Bioquímica. 27 (4):119-129.
22. Hattersley, P.; Watson, L. 1976. C4 grasses: an anatomical criterion for distinguishing between NADP-malic enzyme species and PCK or NAD-me enzyme species. Australian Journal of Botany. 24:297-308.
23. _____. 1983. Characterization of C4 Type Leaf anatomy in grasses (Poaceae). Mesophyll: Bundle Sheath Area Ratios. Annals of Botany. 53:163-179.
24. Hickenbick, M.; Flores, A. 1992. Mode of reproduction and seed production in *Paspalum dilatatum* Poir. Virasoro biotype-dilatata Group (Gramineae). Revista Brasileira de Genética. 15(1):85-102.
25. Johnston, W. H. 1996. The place of C4 grasses in temperate pastures in Australia. New Zealand Journal of Agricultural Research. 39(4):527-540.
26. Kellogg, E. A.; Farnsworth, E. J.; Russo, E. T.; Bazzaz, F. 1999. Growth responses of C4 grasses of contrasting origin to elevated CO2. Annals of Botany. 84:279-288.
27. Krause, G. H.; Weis, E. 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. Interpretation of fluorescence signals. Photosynthesis Research. 5:139-157.
28. Millot, J. C. 1969. Mejoramiento de gramíneas forrajeras. In: Reunión Técnica Producción y Conservación de Forraje (5ª., 1969, Colonia). Trabajos presentados. Montevideo, MAP/CIAAB. pp. 101-110.

29. Pearcy, R. W.; Ehleringer, J. 1984. Comparative ecophysiology of C3 and C. plants. *Plant, Cell and Environment*. 7:1-13.
30. Pérez, M. 2000. El ciclo de las xantofilas en plantas sometidas al estrés nutricional o climático. Tesis doctoral en Ciencias. Zaragoza, España. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Estación Experimental de Aula Dei. 249 p.
31. Quero, G.; Bonnetarrère, V.; Fernández, S.; Silva, P.; Simondi, S.; Borsani, O. 2019. Light-use efficiency and energy partitioning in rice is cultivar dependent. *Photosynthesis Research*. 140:51-63.
32. Quintans, I.; Speranza, P. 2017. Evaluación agronómica primaria de una colección de *P. dilatatum*. In: Speranza, P. ed. Utilización de gramíneas forrajeras del género *Paspalum* en Uruguay. Montevideo, INIA. pp. 55-63 (FPTA no. 61).
33. R Core Team. 2017. R: a language and environment for statistical computing. (en línea). Vienna, Austria, The R Foundation Statistical Computing. s.p Consultado 30 mar. 2021. Disponible en <https://www.r-project.org/>
34. Rosengurtt, B.; Arrillaga, B. R.; Izaguirre, P. 1970. Gramíneas uruguayas. Montevideo, Uruguay, Universidad de la República. pp. 347-383.
35. Rowley, J. A.; Tunnicliffe, C. G.; Taylor, A. 1975. Freezing sensitivity of leaf tissue of C4 grasses. *Australian Journal of Plant Physiology*. 2(2):447-451.
36. Russell, V.; Buerkner, P.; Herve, M.; Jung, M.; Love, J.; Miguez, F.; Riebl, H.; Singmann, H. 2022. Emmeans: estimated marginal means, aka leastsquares means. R package version 1.2.1. (en línea). Melbourne, Australia, Monash University. 91 p. Consultado 30 mar. 2022. Disponible en <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>.
37. Saldanha, S.; Viega, L.; Speranza, P. 2017. Comparación productiva de tres especies de *Paspalum* en Uruguay. In: Speranza, P. ed. Utilización de gramíneas forrajeras del género *Paspalum* en Uruguay. Montevideo, INIA. pp. 11-15 (FPTA no. 61).

38. Sandro, P. 2014. Caracterización genotípica y fenotípica de una colección de *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 46 p.
39. Santiñaque, F.; Carámbula, M. 1981. Productividad y comportamiento de distintas mezclas forrajeras. Investigaciones Agronómicas. no. 2:16-21.
40. Schrauf, G.; Blanco, M. 2003. Ergot resistance in plants of *Paspalum dilatatum* incorporated by hybridisation with *Paspalum urvillei*. Tropical Grasslands. 37:182-186.
41. Skerman, P.; Riveros, F. 1992. Gramíneas tropicales. Roma, Italia, FAO. 849 p. (FAO. Producción y Protección vegetal no. 3).
42. Speranza, P. 2005. Los desafíos de la exploración de los recursos genéticos en plantas apomícticas: lecciones del caso de *Paspalum dilatatum*. (en línea). Agrociencia (Uruguay). 9(1-2):73-76. Consultado 13 mar. 2019. Disponible en <http://www.fagro.edu.uy/~agrociencia/index.php/directorio/article/view/280>.
43. _____. 2009. Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae). Plant Systematics and Evolution. 282(1-2):43-56.
44. Túrpe, A. 1967. Histotaxonomía de las especies argentinas del género *Paspalum*. Lilloa. 32:35-49.
45. Zarlavsky, G. 2014. Técnicas histológicas básicas: fijación. In: Zarlavsky, G. ed. Histología vegetal: técnicas simples y complejas. Buenos Aires, Sociedad Argentina de Botánica. pp. 13-28.
46. Zuloaga, F.; Morrone, O. 2005. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral (Argentina, Bolivia, Sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). St. Louis, Missouri Botanical Garden. 297 p. (Monographs in Systematic Botany v. 102).

47. Zuñiga, R. 2003. Cambios en la eficiencia fotoquímica primaria del PS II en *Deschampsia antarctica* Desv. Bajo condiciones de estrés frío y lumínico. Tesis Licenciado en Bioquímica. Valdivia, Chile. Universidad austral de Chile. Facultad de Ciencias. 58 p.