

CONSTRUCCION DE SICROMETROS DE TERMOPAR PARA LA MEDICION DE POTENCIAL HIDRICO Y OSMOTICO EN PLANTAS

José L. Rodríguez Ontiveros¹ y José L. Espinoza Rivero²

INTRODUCCION

El estudio de los procesos fisiológicos en las plantas tiene como propósito un entendimiento más completo de los primeros, así como de su relación con el crecimiento y desarrollo de las segundas. Para los fitomejoradores, la comprensión de los fenómenos anteriormente señalados conducirá necesariamente a una interpretación más fundamentada de los efectos de los factores genéticos y ambientales sobre el crecimiento, desarrollo y rendimiento de las plantas en proceso de mejoramiento; ello a su vez dará como resultado una apreciación más completa de las interacciones entre el comportamiento de las plantas en distintos ambientes y coadyuvará a mejorar y ampliar los criterios de selección del mejorador.

Sin embargo, hasta ahora la información o conocimiento sobre aspectos fisiológicos no es fácilmente utilizable o aplicable por el fitomejorador, debido a que mucha de la instrumentación diseñada para tales estudios es costosa y/o no permite evaluar oportunamente a grandes poblaciones de plantas. Por eso, cuando se busca precisión en la cuantificación de procesos, efectos o respuestas a estímulos, se tiende a reducir el número de individuos a estudiar, en tanto que para mejoramiento se requiere de poblaciones relativamente grandes.

Ante esta situación se requiere pensar en conciliar en lo posible ambos intereses, por un lado mediante la adaptación del instrumental del fisiólogo para su uso en un mayor número de plantas, y por el lado del mejorador reducir al máximo las plantas necesarias para su trabajo; de esta manera se podrían combinar ambas disciplinas para un uso más eficiente del recurso genético disponible y la obtención de mejores variedades.

¹ Profesor Investigador del Centro de Genética, Colegio de Postgraduados. 56230 Montecillo, México.

² Laboratorista del Laboratorio de Resistencia a Sequía del Centro de Genética. Colegio de Postgraduados. 56230 Montecillo, México.

En condiciones limitantes de humedad, el estudio de las relaciones agua-planta es determinante para entender la respuesta de las plantas a tales condiciones. Los parámetros que expresan la condición hídrica de la planta son el potencial hídrico (Ψ) y sus componentes: potencial osmótico (Ψ_{π}) y potencial de turgencia (Ψ_p). Para la medición de estos parámetros uno de los instrumentos comúnmente utilizados es el sicrómetro de termopar tipo Peltier, que Spaner (1951) adaptó para este propósito.

Para la medición de estos parámetros se requiere un sicrómetro por planta; es decir, se requerirán tantos sicrómetros como plantas se desee evaluar. Así, en el mejoramiento genético se necesitaría un número relativamente grande de estos instrumentos para tener una muestra representativa y que las inferencias sobre la población sean confiables. Aunque en EEUU existen compañías que producen en serie estos sicrómetros y se pudieran adquirir los que se necesiten, su costo total sería prohibitivo para las instituciones nacionales interesadas en adquirirlos.

Es por esta razón que en el Laboratorio de Resistencia a Sequía del Centro de Genética del Colegio de Postgraduados (C.P.) nos dimos a la tarea de fabricarlos adquiriendo los elementos de que se componen, documentándonos en la literatura disponible al respecto y utilizando las facilidades que ofrecen los talleres de la institución, y de esta forma disponer de suficientes sicrómetros a un precio accesible.

El objetivo de este trabajo es divulgar esta tecnología y hacerla accesible a otras instituciones de investigación en el país, para que fabriquen sus propios sicrómetros a un precio económico y hacer factible la medición del potencial hídrico y sus componentes en un número relativamente grande de plantas.

Por otra parte, aunque existen una serie de técnicas para la fabricación de los termopares (Meyn y White, 1972; Moshin y Ghildyal, 1971; Lopushinsky, 1971; Newmann y Thurtell, 1971), aquí se propone una técnica diferente que nos parece más sencilla, fácil y rápida.

Descripción del sicrómetro

El sicrómetro es un cilindro metálico dividido en 2 partes, A y B, como se ilustra en la Figura 1; puede ser construido de aluminio, cobre o latón.

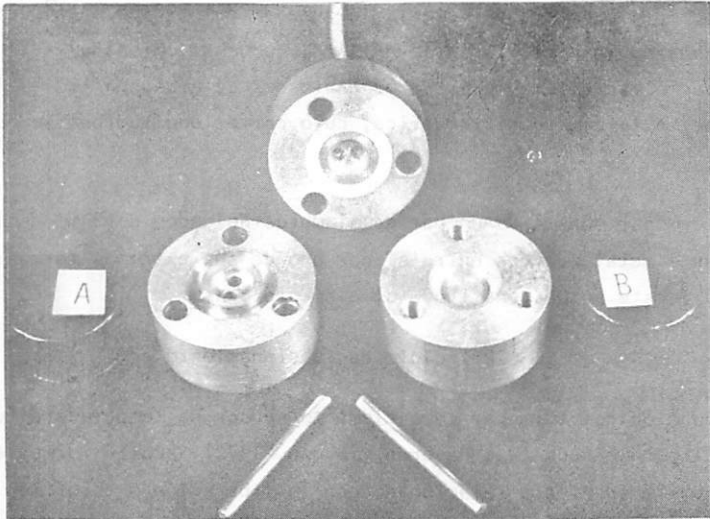


Figura 1. Partes constitutivas del sicrómetro de termopar. En la parte A se monta el elemento sensor y en la B se coloca la muestra de tejido.

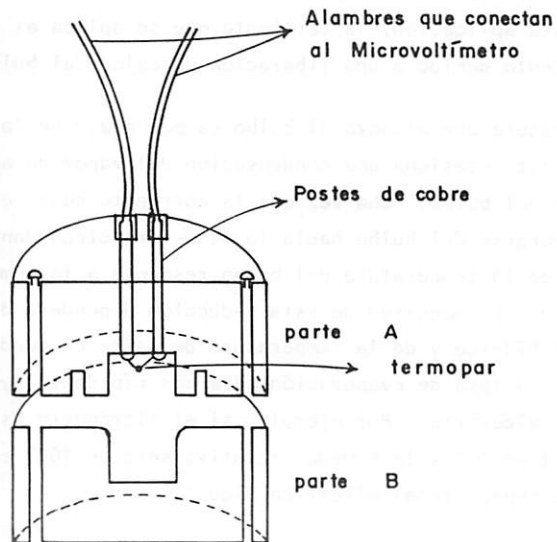


Figura 2. Corte longitudinal de un sicrómetro

La parte A tiene una cavidad concéntrica donde se monta el termopar, el cual funciona como el sensor que detecta la humedad del tejido. La parte B también contiene una cavidad similar a la de la A, donde se coloca el tejido o muestra cuyo potencial se quiere medir. Las cavidades de ambas partes al juntarse forman lo que es la cámara sicrométrica, cuyo corte longitudinal se observa en la Figura 2.

El termopar consta de un par de alambres delgados de 2 mm de longitud y de diferente metal, unidos entre sí por uno de sus extremos formando un bulbo (Figura 2); este bulbo constituye el elemento sensor.

Principio de funcionamiento

La función del termopar como elemento sensor de temperatura fue descubierta en 1821 por Seebeck (Van Haveren y Brown, 1972). Posteriormente Peltier en 1834 descubrió su efecto relacionado con la liberación o absorción de calor por la unión del termopar cuando una corriente fluye a través de dicha unión (Van Haveren y Brown, 1972); de ahí el nombre de efecto Peltier y Sicrómetro tipo Peltier. Más recientemente, Spanner (1951) descubrió la aplicación de este efecto para la medición del potencial hídrico en la planta. En el caso específico de esta aplicación, la corriente que se aplica al termopar (8 mA) causa un enfriamiento debido a una liberación de calor del bulbo del termopar.

La temperatura que alcanza el bulbo es por abajo de la temperatura de punto de rocío y esto ocasiona una condensación del vapor de agua dentro de la cámara alrededor del bulbo. Una vez que la corriente cesa, el agua condensada empieza a evaporarse del bulbo hacia la atmósfera circundante, causando una mayor reducción de la temperatura del bulbo respecto a la temperatura del ambiente en la cámara. La magnitud de esta reducción dependerá de la humedad relativa o potencial hídrico y de la temperatura del aire circundante. Entre más seco sea el aire la tasa de evaporación será más rápida y mayor la reducción de temperatura, y viceversa. Por ejemplo, si el sicrómetro es suspendido sobre agua pura, el Ψ será 0 y la humedad relativa será de 100% en la cámara, y por lo tanto no se genera señal eléctrica alguna.

Esta técnica se basa en el principio termodinámico de que el vapor de agua en equilibrio con el líquido a la misma temperatura, tendrá el mismo Ψ del líquido, en este caso el agua del tejido. Así, la presión de vapor de agua en

la cámara sicrométrica estima la condición del agua en la muestra de tejido dentro de dicha cámara. El sistema de medición consiste de: una unidad de control que incluye un microvoltímetro y una fuente de energía para suministrar corriente al sicrómetro para su enfriamiento, un sicrómetro de termopar tipo Peltier y un baño de agua (baño María) (Figura 3).

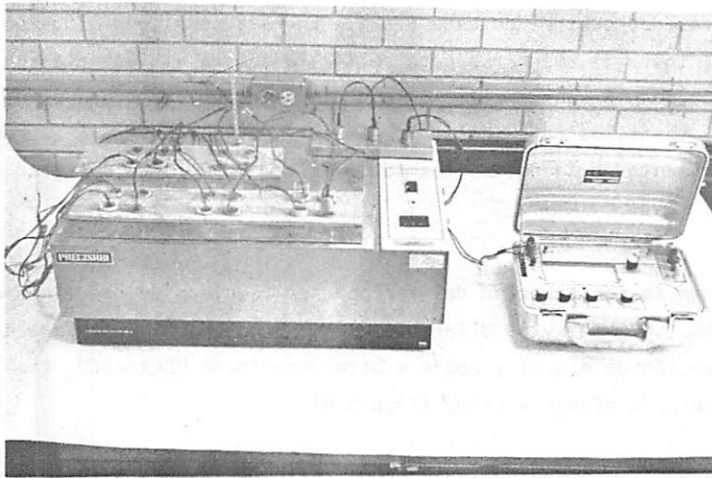


Figura 3. Partes del sistema de medición: baño María, microvoltímetro y sicrómetros.

CONSTRUCCION DEL SICROMETRO

Cámara

Como se indica en la Figura 1, el sicrómetro es de forma cilíndrica y consta de 2 partes, A y B, cuyas dimensiones son: diámetro de 22 mm y una altura o espesor de 10 mm; ambas partes tienen una cavidad concéntrica de 5.5 mm de diámetro y una profundidad de 1.5 mm, que al juntarse las 2 cavidades forman la cámara sicrométrica.

La parte A es donde se monta el termopar; por esto tiene 2 orificios diametralmente opuestos de 2 mm de diámetro, separados 1 mm entre sí. A través

de estos orificios se insertan 2 postes de alambre de cobre del número 14 (1.8 mm de diámetro) y de 30 mm de longitud. Los postes se colocan de tal manera que sus terminales sobresalgan ligeramente ($< .5$ mm) de la superficie del fondo de la cavidad central de la parte A (Figura 2), y además deben quedar aislados de esta pieza. Esto se logra con la película plástica y fina que cubre al alambre y con la cubierta de resina epoxy con que se fijan los postes a la cámara.

La parte A también lleva un canal concéntrico de 2 mm de ancho circundando la cavidad central de esta pieza. En este canal se coloca un empaque de sílicón (Figura 1) que sirve para sellar la cámara al juntarla con la parte B. Ambas partes llevan 3 orificios equidistantes en su margen exterior, donde se colocan tornillos para sellar la cámara. Las partes A y B fueron hechas de latón, mediante un torno, en los talleres del Colegio de Postgraduados.

Termopar

Para la construcción del termopar se requiere de dos alambres de diámetro muy fino (.025 mm) y de diferente metal: uno denominado "Constantan" que es una aleación de níquel y cobre y otro denominado "Chromel", también una aleación, pero de níquel y cromo (Figura 4).

En la literatura se indican una serie de métodos para la construcción de los termopares (Meyn y White, 1972; Moshin y Ghildyal, 1971; Lopushinsky, 1971; Newmann y Thurtell, 1971). En general, la técnica utilizada por estos autores es colocar los alambres cruzados en forma de X (Figura 4) y en algunos casos con 8 torceduras (Campbell *et al.*, 1968) formando la unión, para luego aplicar un pulso eléctrico que funde los alambres y logre la formación del bulbo. En nuestro laboratorio se obtuvieron mejores resultados colocando los alambres como se indica en la Figura 5a, ya que permite una unión de mayor tamaño que con la metodología sugerida por los autores mencionados. La fusión de los alambres para lograr un bulbo sensor de buen tamaño se realizó por medio de un pulso eléctrico de aproximadamente 18 volts.

El sistema eléctrico para lograr estos pulsos se ilustran en la Figura 6, y consta básicamente de los siguientes elementos: un transformador de corriente alterna que puede reducirla de 120 hasta 0 volts, 2 diodos rectificadores

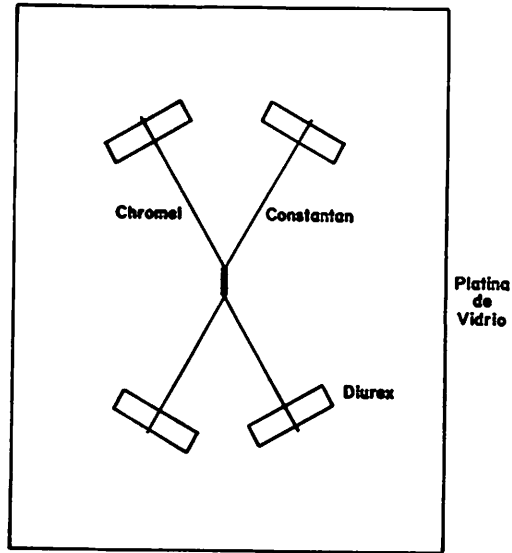


Figura 4. Colocación de los alambres para la obtención del bulbo, según el método tradicional

que cambian la corriente de alterna a directa; un condensador o capacitor de $10 \mu\text{F}$ que almacena la corriente rectificadada necesaria para el pulso; 2 electrodos: uno de grafito obtenido de un lápiz y otro de cobre de diámetro similar al de grafito, o sea del número 14 (1.8 mm de diámetro); y 2 pares de caimanes pequeños para fijar los electrodos.

La cantidad de energía más conveniente para lograr un buen bulbo se determina mediante la calibración del sistema. Ello implica hacer varias pruebas para detectar la corriente más adecuada; si la corriente es excesiva se rompe el alambre sin lograr la unión, y si es insuficiente la fusión de los alambres no se realiza y tampoco se logra la unión.

Una vez calibrado el sistema, se procede a colocar los alambres en forma de X sobre una platina de vidrio, como se indica en la Figura 5a, teniendo cuidado que los alambres hagan contacto en su parte media; luego se pone el electrodo de cobre en contacto con uno de los alambres y enseguida, con el electrodo de grafito se aplica el pulso al mismo nivel que el de cobre, pero en el otro alambre, para provocar el corto circuito y la fusión de ambos. Con este primer pulso se logra la fusión y el corte de los alambres en el punto de

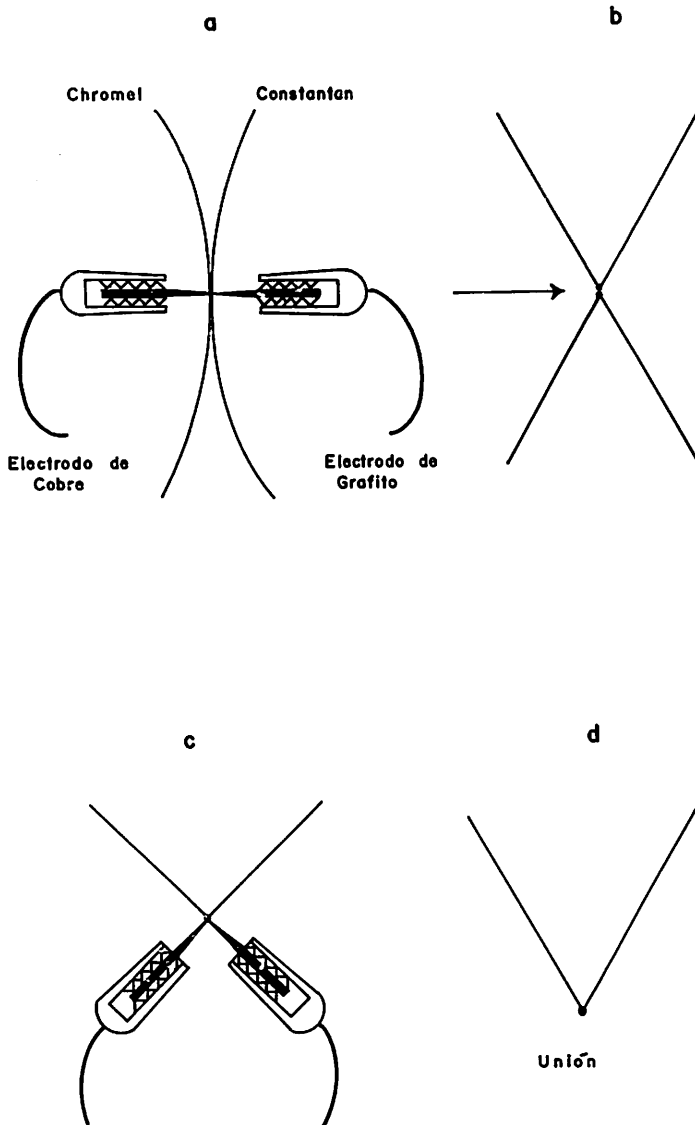


Figura 5. Proceso de fabricación del termopar con el método utilizado en el laboratorio de Resistencia a Sequía

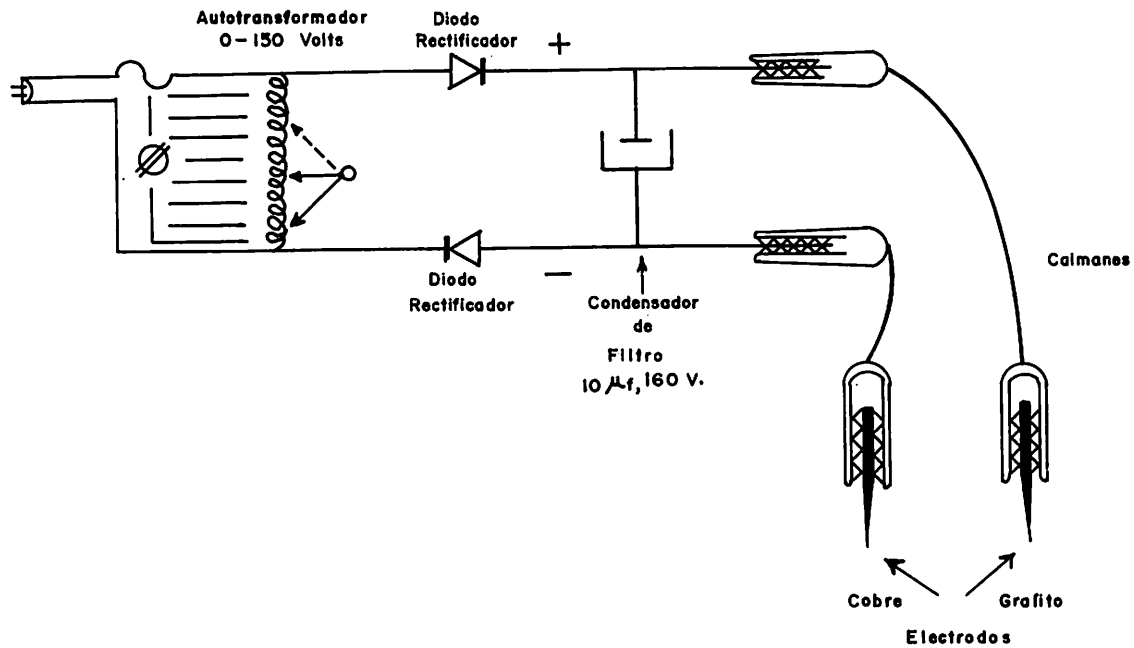


Figura 6. Sistema eléctrico para soldar el termopar

aplicación del pulso, obteniendo así 2 termopares (Figura 5b).

Los bulbos resultante: generalmente son pequeños; para incrementar su tamaño y lograr una buena unión sensora, se aplica otro pulso eléctrico (Figura 5c). Esta operación se realiza bajo el microscopio estereoscópico, colocando la unión de los alambres en aceite de inmersión para evitar oxidación del termopar. Una vez lograda la unión o bulbo (Figura 5d), se cortan los brazos del termopar a una longitud similar a partir de la unión, y ésta debe ser del tamaño suficiente (2 mm) para montarlos sobre los extremos de los postes de cobre que emergen de la superficie de la cavidad central de la parte A de la cámara (Figura 7).

MONTAJE DEL TERMOPAR

Los extremos de los brazos del termopar se colocan con la ayuda de pinzas y aguja de disección, sobre unas ranuras que previamente se hacen en las terminales de los postes de cobre (Figura 7a). Estas ranuras se hacen con navaja de un filo en la parte media de la terminal del poste, y deben quedar perfectamente alineadas entre sí para que los brazos del termopar queden en línea recta.

Bajo el microscopio se colocan los brazos del termopar dentro de las ranuras, se centra el termopar de tal manera que el bulbo quede en medio de la cavidad central de la parte A de la cámara. A continuación se procede a fijar los brazos presionando los bordes de la ranura con una aguja de disección o bisturí (Figura 7b); la maleabilidad del cobre permite cubrir con estos bordes los brazos del termopar dentro de las ranuras.

Ya fijado así el termopar (Figura 7c), hay que asegurarse de que éste y los postes de cobre estén totalmente aislados del sicrometro. Esta verificación se hace por medio de un multímetro, al indicar si existe o no resistencia alguna al colocar los electrodos, uno en cualquiera de los postes y el otro en la parte A del sicrometro.

También se debe medir la resistencia entre los brazos del termopar; para ello se colocan los electrodos del multímetro sobre las terminales de los postes de cobre donde está montado el termopar. Esta resistencia no debe ser mayor de 8 ohms para que las mediciones sean confiables. En nuestro laboratorio

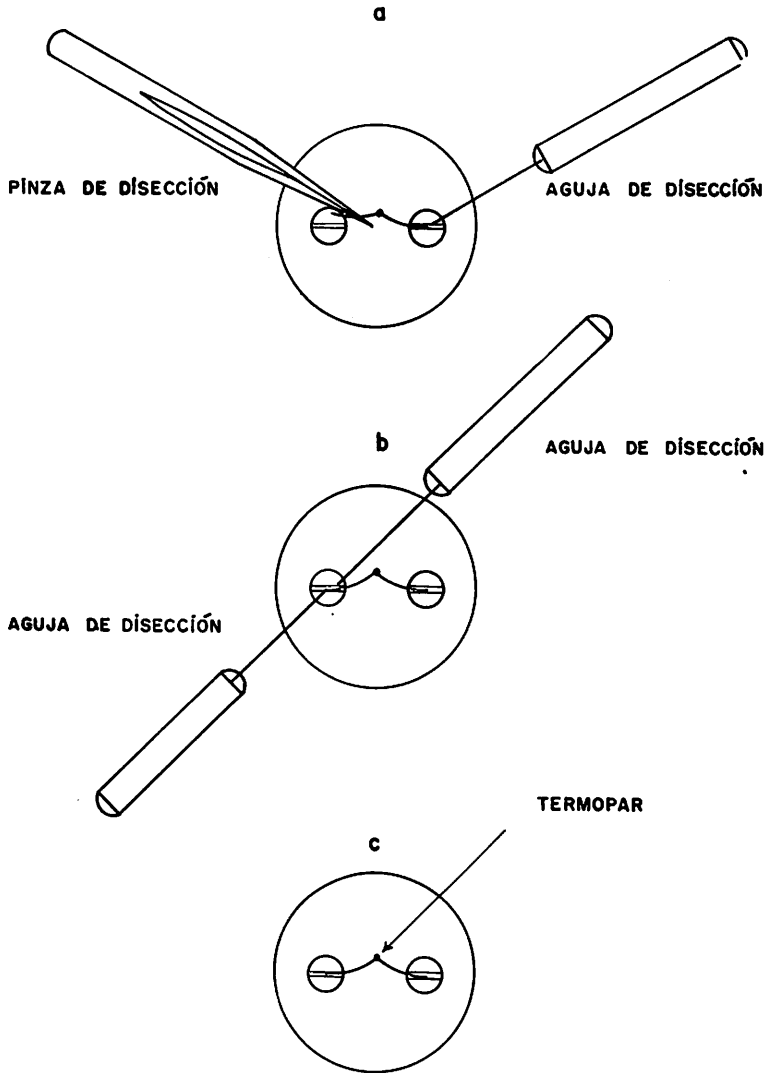


Figura 7. Montaje del termopar

los valores de esta resistencia oscilaron entre 2 y 3 ohms, indicando una buena calidad de los termopares.

Si estas pruebas resultan bien, se procede a cubrir las paredes de la cámara sicrométrica con parafina, con la finalidad de que la humedad proveniente del tejido a medir no se adhiera a las paredes. Para esto se calienta la parte A del sicrómetro por arriba del punto de fusión de la parafina y luego se colocan pequeños fragmentos de parafina dentro de la cavidad donde se encuentra el termopar, cuidando de no contaminarlo.

Finalmente, un par de cables de 1 mm de diámetro y de una longitud de 50 cm se sueldan a los extremos de los postes de cobre que emergen hacia el exterior de la parte A (Figura 8). Estos alambres son los que conducirán la señal eléctrica al microvoltímetro durante la medición.

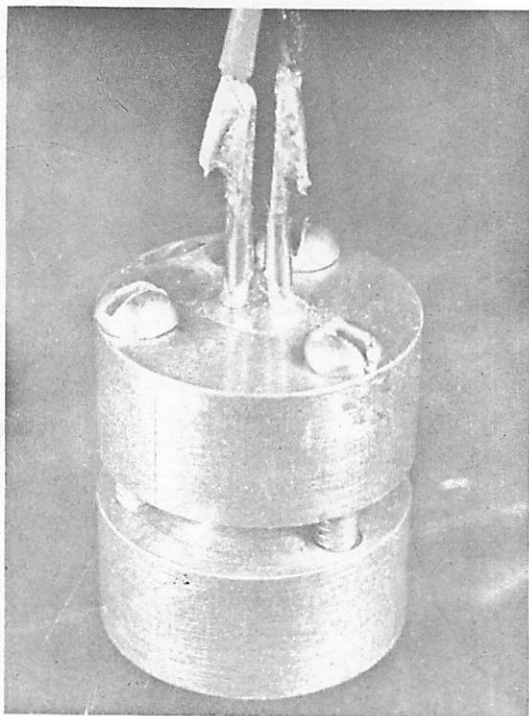


Figura 8. Sicrómetro mostrando la soldadura entre los cables que lo conectan al microvoltímetro y las partes de cobre donde se monta el termopar.

El microvoltímetro utilizado es el modelo HR-33T de la Wescor, Inc., el cual incluye, además del voltímetro, la fuente para aplicar la corriente al termopar y provocar así el enfriamiento de la unión sensora (efecto Peltier).

DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE ENFRIAMIENTO

Posteriormente, se procede a determinar el coeficiente de enfriamiento de cada sicrómetro construído. Este se define como "el diferencial de fuerza electromotriz en microvoltios, que resulta de la aplicación de la corriente óptima para el enfriamiento de la unión a una temperatura determinada". Para la determinación de este coeficiente, se coloca el sicrómetro cerrado a temperatura constante (25°C, por ejemplo), lo cual se logra colocándolo en un tubo de ensaye y éste a su vez se coloca en el baño de agua (baño Maríà) a temperatura constante.

En estas condiciones se mantiene el sicrómetro por 10 a 30 minutos para que alcance el equilibrio térmico; luego se conecta al microvoltímetro para aplicar una corriente de 8 mA por 15 segundos y provocar así el enfriamiento del bulbo del termopar por abajo de la temperatura de punto de rocío, después se aplica otra corriente que mantendrá el ambiente de la cámara a temperatura de punto de rocío. En esta condición se lee en la escala de 100 del cuadrante del microvoltímetro y ese será el coeficiente de enfriamiento para dicho termopar.

Se procede de igual forma con el resto de sicrómetros para determinar sus respectivos coeficientes de enfriamiento; éstos serán diferentes, pues aunque el procedimiento para su manufactura fue similar, el volumen de la unión y el tamaño de los brazos pueden diferir entre sicrómetros, y estas pequeñas diferencias resultan en diferencias notables en la señal eléctrica detectada por el microvoltímetro.

El coeficiente de enfriamiento se utiliza posteriormente para ajustar las señales de cada sicrómetro, en el momento de la determinación del Ψ o Ψ_{π} de la muestra de tejido. Los valores de los coeficientes de enfriamiento de los sicrómetros construídos en nuestro laboratorio oscilaron entre 77 y 84 microvoltios.

CALIBRACION

Esta consiste en la medición de soluciones de Ψ conocido a una temperatura determinada. En nuestro caso se utilizó una serie de soluciones de NaCl en un rango de concentraciones de 0 M a 2 M, a intervalos de una décima (0.1, 0.2, 0.3, ...), a 25°C. Tales concentraciones equivalen a un rango de Ψ que va de 0 a -98.8 bares (Cuadro 1), el cual cubre los Ψ que se observan en plantas anuales.

Una vez preparadas las soluciones de NaCl, se procede a colocar una muestra de cada una de ellas en los sicrómetros para obtener una lectura en microvoltios equivalente al Ψ en bares de las soluciones mencionadas. Para ello se utilizan discos de papel filtro del diámetro de los discos que se obtienen de una perforadora estándar. Se toma un disco, se humedece en la solución a medir y se coloca en la parte B del sicrómetro; éste se cierra y se mete en un tubo de ensaye, el cual a su vez se coloca dentro del baño María a una temperatura constante (25°C).

Los sicrómetros se dejan así por un período de 10 a 20 min para que se equilibre el sistema a la temperatura señalada; en este lapso ocurre evaporación del agua en el disco de papel filtro hasta que llega a un equilibrio; es decir, cuando cesa la evaporación dentro de la cámara sicrométrica. Enseguida se conectan los alambres de cobre al microvoltímetro y se procede a pasar una corriente de 8 mA por 15 seg, para lograr el enfriamiento del bulbo por abajo del punto de rocío. Al suspender el flujo de la corriente enfriadora, la temperatura de la unión tiende a subir pero se le mantiene en punto de rocío por medio del control que para este fin tiene el microvoltímetro.

Se hace entonces la lectura en el cuadrante del microvoltímetro, ajustándolo con el valor del coeficiente de enfriamiento. Este valor en microvoltios corresponde a la depresión de temperatura del bulbo seco o temperatura de referencia, en relación a la temperatura de punto de rocío; esta depresión será a su vez función del Ψ de la solución que se está midiendo.

Con las lecturas obtenidas en microvoltios de la serie de soluciones, se procede a hacer una gráfica para cala sicrómetro ubicando los microvoltios en la ordenada y en la abscisa a los bares correspondientes a las concentraciones analizadas (Figura 9). Con estas gráficas de calibración se convierte a Ψ la

Cuadro 1. Potenciales hídricos en bares de soluciones de NaCl a temperaturas entre 0 y 40°C obtenidos por Lang (Van Haveren y Brown, 1972)

Molalidad	0°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
0.05	- 2.14	- 2.18	- 2.22	- 2.26	- 2.30	- 2.34	- 2.38	- 2.42	- 2.45
0.10	- 4.23	- 4.31	- 4.39	- 4.47	- 4.54	- 4.62	- 4.70	- 4.77	- 4.85
0.20	- 8.36	- 8.52	- 8.68	- 8.84	- 9.00	- 9.15	- 9.30	- 9.46	- 9.61
0.30	-12.47	-12.72	-12.97	-13.21	-13.44	-13.68	-13.91	-14.15	-14.57
0.40	-16.58	-16.93	-17.27	-17.59	-17.91	-18.23	-18.55	-18.86	-19.17
0.50	-20.70	-21.15	-21.58	-22.00	-22.41	-22.81	-23.22	-23.62	-24.02
0.60	-24.84	-25.39	-25.93	-26.44	-26.94	-27.44	-27.94	-28.43	-28.91
0.70	-29.01	-29.67	-30.30	-30.91	-31.51	-32.10	-32.70	-32.28	-33.85
0.80	-33.20	-33.98	-34.72	-35.43	-36.12	-36.82	-37.51	-38.18	-38.85
0.90	-37.43	-38.32	-39.17	-39.98	-40.79	-41.58	-43.27	-43.14	-43.90
1.00	-41.69	-42.70	-43.66	-44.59	-45.50	-46.40	-47.29	-48.15	-49.01
1.10	-45.99	-47.13	-48.20	-49.24	-50.26	-51.27	-52.26	-53.22	-54.18
1.20	050.32	-51.60	-52.78	-53.94	-55.07	-56.20	-57.30	-58.35	-59.41
1.30	-54.70	-56.11	-57.42	-58.69	-59.94	-61.39	-61.39	-63.54	-64.71
1.40	-59.12	-60.68	-62.10	-63.50	-64.87	-66.23	-67.54	-68.80	-70.06
1.50	-63.59	-65.29	-66.84	-68.37	-69.87	-71.34	-72.76	-74.11	-75.48
1.60	-68.11	-69.96	-71.63	-73.30	-74.91	-76.52	-78.05	-79.50	-80.07
1.70	-72.60	-74.60	-76.40	-78.20	-80.00	-81.70	-83.30	-84.90	-86.50
1.80	-77.30	-79.40	-81.30	-83.30	-85.20	-87.00	-88.80	-89.40	-92.10
1.90	-81.90	-94.30	-86.30	-88.40	-90.40	-92.40	-94.30	-96.00	-97.80
2.00	-86.70	-89.20	-91.30	-93.60	-95.70	-97.80	-99.80	-101.60	-103.50

lectura de cualquier muestra de tejido vegetal que se procese en los sicrómetros.

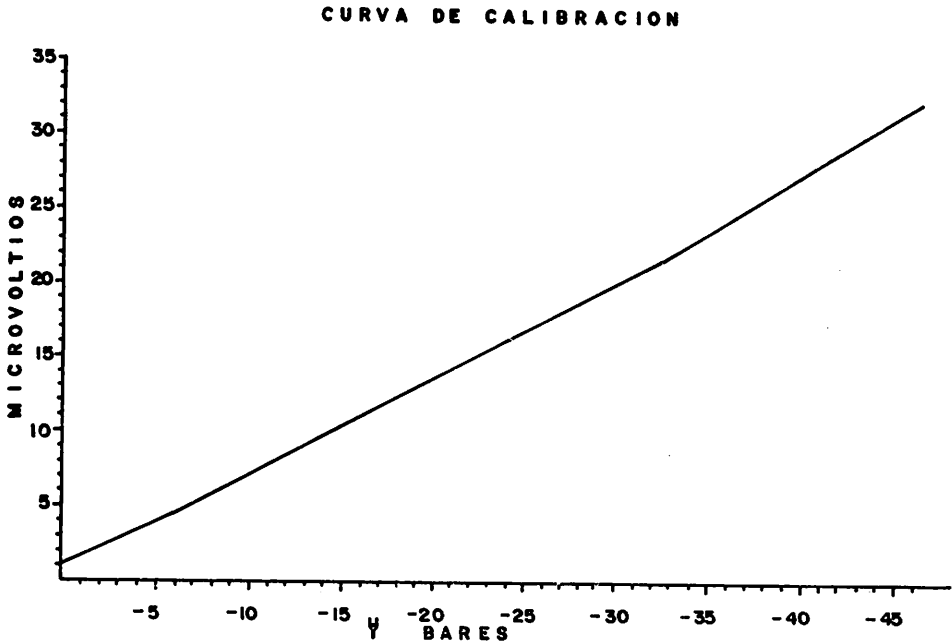


Figura 9. Ejemplo de curva de calibración de un sicrómetro a 25°C.

Medición del Ψ_{π}

Con estos sicrómetros se puede medir también el Ψ_{π} . Para esto, lo que se hace después de haber obtenido la lectura del Ψ del tejido vivo, es sumergir la misma muestra en nitrógeno líquido (-196°C) con la finalidad de romper las membranas celulares, es decir el plasmalema y el tonoplasto, y de esta manera eliminar el Ψ_p . De acuerdo con la fórmula $\Psi = \Psi_{\pi} + \Psi_p$, si $\Psi_p = 0$ entonces $\Psi = \Psi_{\pi}$ o sea, la lectura que se obtenga del tejido muerto será igual al Ψ_{π} .

BIBLIOGRAFIA

- Campbell, G.S., J.W. Trull, and W.H. Gardner. 1968. A welding technique for Peltier psychrometers. *Soil. Sci. Soc. Amer. Proc.* 32:887-889.
- Lopushinsky, W. 1972. A microwelder for the construction of thermocouple functions of Peltier effect thermocouple psychrometers. *In: Psychrometry in Water Relations Research.* R.W. Brown and B.P. Van Haveren (eds.). pp. 84-87. Utah Agric. Exp. Sta. Utah State University.
- Meyn, R.L. and R.S. White. 1972. Calibration of thermocouple psychrometers: A suggested procedure for development of a reliable predictive model. *In: Psychrometry in Water Relations Research.* R.W. Brown and B.P. Van Haveren (eds.). pp. 56-63. Utah Agric. Exp. Sta. Utah State University.
- Moshin, M.A. and B.P. Ghildyal. 1972. Design criteria of thermocouple psychrometers for water potential measurements in plants. *In: Psychrometry in Water Relations Research.* R.W. Brown and B.P. Van Haveren (eds.). pp. 68-73. Utah Agric. Exp. Sta. Utah State University.
- Neuman, H.H. and G.W. Thurtell. 1972. A Peltier cooled thermocouple dewpoint hygrometer for *in situ* measurement of water potentials. *In: Psychrometry in Water Relations Research.* R.W. Brown and B.P. Van Haveren (eds.). pp. 103-112. Utah Agric. Exp. Sta. Utah State University.
- Spanner, D.C. 1951. The Peltier effect and its use in the measurement of suction pressure. *J. Exp. Bot.* 11:145-168.
- Van Haveren, B.P. and R.W. Brown. 1972. The properties and behavior of water in the soil-plant-atmosphere continuum. *In: Psychrometry in Water Relation Research.* R.W. Brown and B.P. Van Haveren (eds.). pp. 1-27. Utah Agric. Exp. Sta. Utah State University.