

# GUIA DE TRABAJOS PRACTICOS DE FISIOLOGIA VEGETAL

Laboratorio 517 – 5<sup>to</sup> piso  
Departamento de Agronomía  
Universidad Nacional del Sur  
Bahía Blanca

TE: 4595126 interno 4390



## Docentes a cargo:

*Dr. Roberto Brevedan - Profesor Consulto*

*Dr. Néstor Curvetto - Profesor Titular*

*Lic. Sandra Baioni - Asistente*

*Lic. Mariela Fioretti – Asistente*

*Ing.Agr. Ivana Fernández Moroni – Ayudante*

*Marcos Bongiovanni*

## HORARIOS DE CLASE:

**TEÓRICAS:** Martes, de 10 a 12 hs, aula 5 (Complejo aulas nuevas)

Miércoles, de 11 a 13 hs, aula 1 (Anexo Agronomía)

**PRACTICAS:** Martes, de 14 a 18 hs, laboratorio nuevo (Agronomía)

**CRONOGRAMA DE TRABAJOS PRACTICOS Y PARCIALES**  
**DE FISIOLOGIA VEGETAL**

FECHA	ACTIVIDAD	TEMA
17/8	<b>REUNION INFORMATIVA</b>	
24/8	Trabajo Práctico N° 1 Trabajo Práctico N° 2 Trabajo Práctico N° 3 Seminario	<i>Ensayo de Viabilidad de Semillas mediante la técnica del trifeníl-tetrazolio (TTC). Ensayo de Germinación. Imbibición de semillas Discusión de resultados. Ensayo de TTC en semillas de diferentes especies. Reglas ISTA.</i>
31/8	Trabajo Práctico N° 4 Trabajo Práctico N° 5 Trabajo Práctico N° 6 Seminario	<i>Ruptura de dormición de semillas de leguminosas: escarificación mecánica y química. Estratificación de semillas. Efecto del potencial osmótico del medio en la germinación: Ensayo con PEG 6000. Diferentes métodos de ruptura de dormición en malva.</i>
7/9	Trabajo Práctico N° 7 Trabajo Práctico N° 8 Seminario	<i>Determinación del pot. agua por mét. de Chardakov. Desarrollo de presión de turgencia producida por ósmosis Estado hídrico. Discusión y explicación teórica I.</i>
14/9	Trabajo Práctico N° 9 Trabajo Práctico N° 10	<i>Métodos de determinación del potencial osmótico: método plasmolítico y psicrómetros a termocupla (osmómetro). Determinación del estado hídrico mediante contenido relativo de agua (CRA) y potencial agua foliar con bomba de presión.</i>
28/9	Trabajo Práctico N° 11 Trabajo Práctico N° 12 Seminario	<i>Medición de la transpiración por el método del lisímetro. Medición de la transpiración mediante el uso del porómetro. Integración de los resultados obtenidos y evaluación de datos.</i>
<b>5/10</b>	<b>PRIMER PARCIAL</b>	
12/10	<b>RECUPERATORIO PRIMER PARCIAL</b>	
19/10	Trabajo Práctico N° 13 Trabajo Práctico N° 14 Seminario:	<i>Gravitropismo. Dominancia apical. Abscisión foliar. Curvatura del tallo. Respuesta de las raíces a la gravedad.</i>
26/10	Trabajo Práctico N° 15 Trabajo Práctico N° 16 Seminario:	<i>Aplicación de ác. giberélico en plantas genéticamente enanas. Efecto de los herbicidas sobre plantas mono y dicotiledóneas. Modo de acción de los herbicidas.</i>
2/11	Trabajo Práctico N° 17 Trabajo Práctico N° 18 Trabajo Práctico N° 19	<i>Efecto del etileno en la germinación: triple respuesta. Efecto del etileno en la maduración de frutos. Envejecimiento floral en clavel provocado por etileno</i>
9/11	Trabajo Práctico N° 20 Trabajo Práctico N° 21	<i>Ensayo de los discos flotantes para evidenciar los fenómenos de fotosíntesis y respiración. Clase práctica con aparatos: mediciones sobre cultivos.</i>
16/11	Trabajo Práctico N° 22 Trabajo Práctico N° 23	<i>Cinética de crecimiento en monocotiledóneas. Nutrición Mineral: síntomas de deficiencia de nutrientes y uso de clave para su determinación.</i>
<b>23/11</b>	<b>SEGUNDO EXAMEN PARCIAL – ENCUESTA</b>	
30/11	<b>EXAMEN RECUPERATORIO</b>	

### **Reglamento de Cursado - 2010**

Se trabajará en comisiones de 4 personas los días martes de 14 a 18 hs. aproximadamente, en el Laboratorio (nuevo) del Departamento de Agronomía – UNS.

La asistencia a los trabajos prácticos es obligatoria y sólo podrá ausentarse quien cuente con autorización.

**Cuestionarios:** Se tomará un cuestionario al comienzo de cada trabajo práctico. El cuestionario constará de **5 preguntas de elección múltiple**, con una sola respuesta correcta, la aprobación se obtiene con **3 respuestas correctas**. Los cuestionarios desaprobados no se recuperan. Un cuestionario desaprobado equivale a un ausente y es necesario reunir el 80% de la asistencia/aprobación (máximo 2 ausentes/desaprobados).

**Informes:** Los informes se realizan en el cuaderno solicitado durante la clase de trabajos prácticos y se entregan al finalizarla, a razón de **un informe por comisión**. La desaprobación de un informe equivale a media falta para cada integrante de la comisión. Durante la primera clase de trabajos prácticos se darán los lineamientos para la confección de los informes.

**Exámenes parciales:** Se tomarán 2 exámenes parciales con fechas: **5 de octubre** el primero y aproximadamente el **23 de noviembre** el segundo. Los parciales se aprueban con **6 puntos sobre 10**. Los alumnos que obtuvieran un puntaje menor a seis en cada parcial deberán rendir el correspondiente recuperatorio, en fecha a convenir con los auxiliares, y obtener un puntaje no menor a seis puntos para aprobarlo.

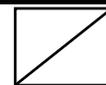
### **MATERIALES NECESARIOS**

Las comisiones deberán asistir a los trabajos prácticos con los siguientes materiales:

- una caja de zapatos
- un cuaderno chico de 24 hojas.
- hojas de papel milimetrado
- hilo piolín o de otro tipo, no extensible de color claro.
- film adherente
- cuchillo filoso
- hoja de afeitar o bisturí
- aguja histológica
- pinza
- trapo
- papel absorbente (servilletas, o rollo papel cocina)
- detergente
- 1 paquete de algodón
- marcador al solvente con punta fina
- cinta de papel engomada (de enmascarar) ó etiquetas autoadhesivas

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR							
BAHIA BLANCA - ARGENTINA							
DEPARTAMENTO DE: AGRONOMIA							
PROGRAMA DE: FISIOLOGIA VEGETAL IA						CODIGO : 563	
						AREA: PRODUCCION VEGETAL	
HORAS CLASE				PROFESOR RESPONSABLE			
TEORICAS		PRACTICAS		Dr. NESTOR R. CURVETTO			
P/SEMANA	P/ CUATRIM.	P/SEMANA	P/ CUATRIME				
3	48	3	48				
ASIGNATURAS CORRELATIVAS PRECEDENTES							
APROBADAS				CURSADAS			
QUIMICA ORGANICA FUNDAMENTAL				QUIMICA BIOLOGICA GENERAL			
MORFOLOGIA VEGETAL				FISICA I A			
<b>DESCRIPCION:</b>							
<p>El objetivo de este curso es la presentación y elucidación de los principios y leyes que rigen las funciones de las plantas.</p> <p>Se trata de explicar todos los procesos del vegetal a través de principios físicos y químicos y cómo la fisiología vegetal provee del enlace entre los aspectos bioquímicos y ecológicos de la vida del vegetal.</p> <p>Con énfasis en las plantas superiores se examinan los procesos básicos del vegetal para mostrar cómo la planta entera funciona dentro de su ambiente. Se consideran los factores que influyen en la vida del vegetal desde las estructuras básicas de órganos y tejidos a los efectos de las sustancias de crecimiento. Se muestra cómo todos aquellos hechos biológicos y químicos actúan en conjunto en el crecimiento vegetativo y reproductivo.</p>							
<b>PROGRAMA SINTETICO:</b>							
<ol style="list-style-type: none"> <li>1- Concepto de Fisiología Vegetal. Historia.</li> <li>2- Importancia del agua para las plantas.</li> <li>3- Transporte de sustancias inorgánicas.</li> <li>4- Transporte de sustancias orgánicas.</li> <li>5- Transpiración.</li> <li>6- Nutrición mineral.</li> <li>7- Asimilación de nutrientes minerales.</li> <li>8- Fotosíntesis.</li> <li>9- Efecto de factores ambientales sobre la fotosíntesis.</li> <li>10- Respiración.</li> <li>11- Crecimiento y desarrollo.</li> <li>12- Fisiología de las semillas.</li> <li>13- Reguladores de crecimiento: concepto. Auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico, sustancias inhibidoras y otros reguladores.</li> <li>14- Cultivo de tejidos vegetales.</li> <li>15- Fitocromo y fotomorfogénesis.</li> <li>16- Reloj biológico y ciclos de vida.</li> <li>17- Floración.</li> <li>18- Fisiología de los cultivos.</li> </ol>							
VIGENCIA AÑOS	2004	2005	2006	2007			

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
BAHIA BLANCA - ARGENTINA



DEPARTAMENTO DE: AGRONOMIA

PROGRAMA DE : **Fisiología Vegetal IA**

CODIGO : **563**

PROGRAMA ANALÍTICO

- 1- *La Fisiología Vegetal*: concepto y postulados básicos. La Fisiología Vegetal y su importancia para la comprensión de los procesos vitales en las plantas. Fisiología de las plantas cultivadas, importancia agronómica.  
Conceptos elementales: la célula vegetal: estructura, procesos básicos; soluciones y coloides; enzimas: importancia en los procesos de transporte y metabolismo.
- 2- *Importancia del agua para las plantas*: El agua: estructura, propiedades e importancia del agua para los vegetales. Procesos de transporte a corta y larga distancia; difusión y flujo masal. Vías apoplástica y simplástica. Energía libre, potencial químico y potencial agua. El agua en el continuo suelo-planta-atmósfera. Absorción y transporte de agua en la planta, conductancia.  
Métodos de determinación del estado del agua en la planta. Potencial agua versus contenido relativo de agua.
- 3- *Transporte de sustancias inorgánicas*. Membranas: estructura y composición. El transporte de solutos. Transporte activo y pasivo. Rol de las enzimas en el transporte a través de las membranas. Ecuación de Nernst. Ecuación de Goldman. Transporte electrogénico de protones. Potencial electroquímico. Efecto Donnan. Absorción de moléculas de gran tamaño.
- 4- *Transporte de sustancias orgánicas*: transporte por floema, estructura del floema y transporte de solutos orgánicos. Patrones de traslocación: relación fuente-destino, cambios durante la ontogenia. Mecanismo de flujo por presión: teoría de Münch. Distribución y mecanismos de control. Velocidad de transporte. Carga y descarga del floema: requerimientos energéticos, especificidad y selectividad. Solutos transportados. Forma en que se transportan los azúcares. Transporte de sustancias nitrogenadas por floema y su relación con el transporte por xilema. Almacenamiento, utilización y transporte del carbono fijado en la planta.
- 5- *Transpiración*: rol de la transpiración en las plantas, fuerzas que la gobiernan. Estomas: estructura y función. Paradoja de los poros. Mecanismo de control estomático. Efecto de la luz sobre el estoma. Rol del ABA como antitranspirante.  
Capa límite y factores ambientales que afectan la transpiración. Importancia agronómica: uso conservativo del agua por los cultivos. Punto de marchitez permanente y temporario.
- 6- *Nutrición mineral*: nutrientes, concepto de elemento esencial. Macro y micronutrientes en la materia seca. Agentes quelantes. Absorción de nutrientes por la raíz, zonas de absorción. Absorción de cationes y de aniones. Efecto del pH. Síntomas de deficiencias. Requerimientos cuantitativos. Análisis de tejido vegetal. Métodos de estudio de la nutrición mineral: hidroponía. Micorrizas.
- 7- *Asimilación de nutrientes minerales*. Asimilación de nitrógeno: ciclo del nitrógeno, vías de asimilación del nitrógeno y del amonio. Reducción del nitrato e incorporación del amino en compuestos orgánicos. Fijación simbiótica del N<sub>2</sub> en plantas leguminosas y no leguminosas. Productos de la fijación: amidas y ureídos. Transformaciones del nitrógeno durante el desarrollo de la planta. Asimilación de azufre: reducción e incorporación en compuestos orgánicos. Asimilación de fósforo: vía de formación del ATP. Asimilación de oxígeno. Suministro de elementos minerales por el suelo. Disponibilidad de iones en el suelo. Absorción de iones por las raíces.
- 8- *Fotosíntesis*. La luz: características, naturaleza corpuscular y ondulatoria. Irradiancia. Estructura fotosintética de la hoja, cloroplastos, pigmentos y espectros. Antenas y reacciones fotoquímicas. Efecto de los pigmentos accesorios. Mecanismos de transporte electrónico y protónico. Complejo emisor de oxígeno y oxidación del agua: Reacción de Hill. Fotosistemas, descubrimiento: efecto Emerson. Transporte de electrones. Etapas clara y oscura. Productos: fotofosforilación y producción de compuestos reductores. Ciclo de Calvin (C3): carboxilación, reducción y regeneración. Ciclo C<sub>2</sub>: oxidación de la Rubisco, competencia. Ciclo C4: mecanismos de concentración del CO<sub>2</sub>, tipos de plantas C4. Características anatómicas de las plantas C4, Plantas crasuláceas (MAC): otro mecanismo concentrador de CO<sub>2</sub>. Adaptaciones.  
Conceptos de rendimiento cuántico y eficiencia cuántica. Punto de compensación de luz y de CO<sub>2</sub>. Productos de la fijación del CO<sub>2</sub>: Síntesis de sacarosa y almidón. Fructanos. Lugares de síntesis y competencia. Partición de productos fotosintéticos.

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
BAHIA BLANCA - ARGENTINA

DEPARTAMENTO DE: **AGRONOMIA**

PROGRAMA DE: **Fisiología Vegetal IA**

CODIGO : **563**

- 9- Efecto de los factores ambientales sobre la fotosíntesis: luz, CO<sub>2</sub>, temperatura, agua. Efectos originados en factores internos. Consideraciones fisiológicas y ecológicas de la fotosíntesis. Arquitectura foliar. Competencia por la luz. Disipación de calor por las hojas. Adaptaciones al ambiente radiativo de hojas y plantas. Fotosíntesis en la comunidad de plantas. Tasa de fotosíntesis y productividad. Fotosíntesis foliar. Fotosíntesis de la canopia.
- 10- *Respiración*: mitocondrias. Glucólisis, fermentación y Ciclo de Krebs. Fosforilación oxidativa y transporte de electrones. Cociente respiratorio y formación de hexosas a partir de las reservas. Control bioquímico y factores que afectan la respiración. Respiración resistente al cianuro en las plantas. Respiración en la planta entera. Fotorrespiración. Efecto Warburg. Ventajas. Vía de la fotorrespiración. Importancia de estos procesos en la economía del carbono. Punto de compensación de CO<sub>2</sub>.
- 11- *Crecimiento y desarrollo*. Desarrollo: crecimiento y diferenciación. Zonas de crecimiento. Crecimiento primario y secundario. Cinética del crecimiento: curvas. Crecimiento de órganos. Morfogénesis: totipotencia, juvenilidad. Ontogenia.
- 12- *Fisiología de las semillas*: origen y desarrollo de las semillas. Germinación: procesos involucrados. Fisiología y regulación de la germinación. Factores que regulan la emergencia y establecimiento de la plántula. Viabilidad. Dormición: mecanismos, tipos, ventaja adaptativa. Métodos de ruptura de dormición. Longevidad de las semillas. Efecto del frío y la luz. Rol del fitocromo. Inhibidores endógenos. Determinantes de la productividad primaria y del rendimiento. Índices.
- 13- *Reguladores del crecimiento*: concepto de hormona y acción hormonal.
- *Auxinas*: química, metabolismo y transporte. Efectos fisiológicos; crecimiento ácido de la pared celular, tropismos: foto y gravitropismo, dominancia apical y abscisión de hojas. Mecanismo de acción de las auxinas. Herbicidas auxínicos; química y lugar de acción.
  - *Giberelinas*: descubrimiento, biosíntesis, precursores, conjugación con azúcares. Efectos fisiológicos. Mecanismo de acción. Métodos de detección. Aplicaciones comerciales: elongación del tallo, enanismo y gigantismo. Fotoperiodismo: rol de las giberelinas.
  - *Citocininas*: descubrimiento e identificación. Conjugación. Biosíntesis, metabolismo y transporte de citocininas desde la raíz al vástago. Formas activas de las citocininas: bases libres. Efectos fisiológicos; citocinesis y alargamiento celular. Efectos sobre la senescencia, la nutrición mineral y la removilización de nutrientes. Mecanismo de acción: efecto sobre la síntesis proteica y la concentración citosólica de calcio.
  - *Etileno*: propiedades químicas, síntesis y actividad. Biosíntesis y catabolismo: efecto de los estreses ambientales y de la presencia de auxinas. Inhibición. Efecto de la temperatura. Usos comerciales. Importancia en la producción frutícola.
  - *Acido abscísico*: estructura química y actividad fisiológica. Métodos de detección y concentración en los tejidos. Efecto sobre la síntesis proteica. Biosíntesis y actividad: efecto de los estreses ambientales.
  - *Sustancias inhibitorias y otros reguladores de crecimiento*: ácido jasmónico, ácido traumático, ácido salicílico, poliaminas, brasinas.
- Aplicación de los reguladores en la agricultura. Precauciones.
- 14- *Cultivo de tejidos vegetales*. Qué es el cultivo de tejidos vegetales. Facilidades para el cultivo de tejido. Propagación de material vegetal por cultivo de tejido. Técnicas usadas en la micropropagación. Organogénesis. Formación de callos. Embriogénesis somática. Cultivo de suspensiones celulares. Protoplastos. Rusticación. Aplicaciones.
- 15- *Fitocromo y fotomorfogénesis*. El fitocromo: Pr y Pfr, estructura y fotoconvertibilidad. Acción fisiológica. Formas conocidas del fitocromo. Localización en tejidos y células. Requerimientos lumínicos y respuestas de las plantas. Regulación del ritmo diario. Modo de acción a nivel celular y molecular. Asociación a las membranas, acción calcio-calmodulina. Efectos en la transcripción génica, en la germinación de semillas y en el establecimiento de plántulas. Criptocromo. Efectos fotoperiódicos de la luz, importancia agronómica.
- 16- *Reloj biológico y ritmos de vida*. Ritmos circadianos. Espectros de los ritmos biológicos. Respuestas rítmicas al ambiente. Mecanismos del reloj y forma de medición del tiempo por las plantas: duración de la noche. Fotoperiodicidad: rol del fitocromo. Interacciones fotoperíodo-ritmo. Forma de utilización de los relojes y sus implicaciones.

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
BAHIA BLANCA - ARGENTINA

DEPARTAMENTO DE: **AGRONOMIA**

PROGRAMA DE: **Fisiología Vegetal IA**

CODIGO : **563**

17- Floración. Componentes del rendimiento. Estadios de desarrollo. Control de la floración. Fisiología de la floración. Transcripción de la floración. Desarrollo del fruto. Cuajado del fruto. Crecimiento del fruto. Mecanismos que controlan el crecimiento del fruto. Maduración y senescencia. Vernalización: relación con el fotoperíodo. Latencia de yemas y semillas.

18. Fisiología de los cultivos. Evolución ontogénica del tamaño y factores de eficiencia en la fotosíntesis de los cultivos. Equilibrio del carbono en los cultivos. Equilibrio del agua en los cultivos. Interrelaciones durante el crecimiento, tipos. Relaciones espaciales en los cultivos. Modificaciones químicas del rendimiento. Productividad e incremento del rendimiento. Modelos de crecimiento para los cultivos.

Bibliografía

- Barceló Coll, J., G. Nicolás Rodrigo, B. Sabater García y R. Sánchez Tomés. 1992. Fisiología Vegetal. Ed. Pirámide.
- Bidwell, R.G.S. 1993. Fisiología Vegetal. AGT Ed.
- Dennis, D.T. y Turpin, D.H. 1990. Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Longman.
- Evans, L.T. 1983. Fisiología de los Cultivos. Ed. Hemisferio Sur.
- Gil Martínez, F. 1995. Elementos de Fisiología Vegetal. Relaciones hídricas, nutrición mineral, transporte, metabolismo. Ed. Mundi-Prensa.
- Guardiola Bárcena, J.L. y García Luis, A. 1990. Fisiología Vegetal I. Nutrición y transporte. Ed. Síntesis.
- Milthorpe, F.L. y Moorby, J. 1979. Introducción a la Fisiología de los Cultivos. Ed. Hemisferio Sur.
- Montaldi, E.R. 1995. Principios de Fisiología Vegetal. Ediciones Sur.
- Salisbury, F.B. y Ross, C.W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Ed. Iberoamérica.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 1998. Plant Physiology, 2nd Ed. Sinauer Assoc., Inc., Publ.
- Wilkins, M.B. 1990. Advances in Plant Physiology. Longman Ed.

Obras de carácter enciclopédico:

- Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology (llamado annual Review of Plant Physiology antes de 1988).
- Pirson, A. y Zimmermann, M.H. (eds.). 1975-1986. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. 19 vols. Springer Verlag.
- Steward, F.C. (ed.). 1960-1986. Plant Physiology. A treatise. 9 vols. Academic Press.

## FISIOLOGIA DE LA GERMINACION

{ Revisar conceptos de anatomía de la semilla en dico- y monocotiledóneas, partes y función de cada una, tipo y localización de reservas. }

### Maduración de la semilla

Cuando el embrión está diferenciado, en la planta madre, cesa el flujo de sustancias de reserva al endosperma o a los cotiledones y comienza una fase de deshidratación (salida activa de agua de la semilla) que desconecta a la semilla de la planta. Esto se acelera por temperaturas elevadas, potenciales agua de la atmósfera muy negativos (muy seca) o vientos fuertes.

En este estado la semilla está fisiológicamente madura y por lo general se separa de la planta madre. El hombre ha seleccionado genotipos en los que las semillas permanecen en la planta durante largo tiempo, en reposo. Se buscó sincronizar la floración, maduración y permanencia de las semillas para permitir una recolección más fácil, eficiente y con maquinarias.

En el proceso de maduración, la semilla adquiere un estado fisiológico y estructural que le otorga resistencia para condiciones ecológicas adversas: un metabolismo muy reducido (respiración aeróbica y fermentación) debido a la deshidratación celular y a la inactivación y desaparición de enzimas. Hay también cambios estructurales reversibles en el citoplasma: reducción del número de mitocondrias, modificaciones en la estereoisomería de las proteínas, etc.

### Germinación

La germinación es el evento que marca la transición entre dos estados de desarrollo de la planta: la semilla y la plántula. Es el conjunto de procesos que se inician con la imbibición de la semilla y finaliza cuando una porción del embrión emerge por la cubierta de la misma.

En el lenguaje botánico una semilla se considera germinada cuando la radícula o hipocótilo emerge por la cubierta seminal. En el agronómico cuando todas las partes de la plántula emergen del suelo viables y sanas, lo que en realidad se denominaría *emergencia*.

La activación del embrión puede comenzar cuando la semilla es colocada bajo condiciones apropiadas (variables según la especie), esto es: un suministro adecuado de oxígeno y humedad, un rango apropiado de temperatura, ausencia de inhibidores, ausencia de venenos y sales inorgánicas, y en algunos casos, exposición a la luz.

Los procesos involucrados en la germinación son:

- 1- Imbibición con agua
2. Síntesis y activación de sistemas enzimáticos.
- 3- Alargamiento de la radícula
- 4- Crecimiento de la plúmula.

### Imbibición:

Es un fenómeno puramente físico. La diferencia de potencial agua ( $\Psi$ ) entre el suelo (alto) y la semilla (bajo) crea un gradiente de ingreso del agua. Esta diferencia de potencial agua se puede visualizar como una gran fuerza de "atracción" del agua por parte de los coloides presentes en la semilla. En los cereales la ganancia de agua es del 40 a 60% de la semilla seca y en algunas leguminosas (arveja) hasta un 180%. FIGURA 1.

El agua penetra por los tegumentos, la micrópila, las paredes y membranas celulares, y se liga por puentes de H a los coloides, provocando la solvatación. En los cariopses embebe los granos proteicos en la capa de aleurona.

La condición para que los coloides se solvaten es que estén presentes en células vivas. El almidón y la inulina no se embeben ya que se almacenan en células muertas.

La imbibición ocurre por difusión, tiene una estrecha relación con la temperatura ( $Q_{10} = 1.5$  a  $1.8$ , factor de aumento en la velocidad de una reacción con un aumento en  $10^{\circ}\text{C}$  en la temperatura).

### Síntesis y activación de sistemas enzimáticos.

La entrada de agua en la semilla seca, latente, permite desencadenar una serie de procesos: la síntesis de nuevas enzimas y la activación de los sistemas enzimáticos y el aumento de volumen abre el suelo para la salida de la radícula y la plúmula. Las enzimas degradan las reservas de la semilla y ponen a disposición del embrión los nutrientes y la energía generada por fermentación y respiración de los sustratos solubilizados. Los polímeros de hidratos de C insolubles (almidón e inulina) son degradados por hidrolasas a glucosa, fructosa, etc. Los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos. Las proteínas a aminoácidos por proteinasas. FIGURA 2.

En granos de cereales es el embrión el que controla la movilización de las enzimas. Una vez embebido, desde el embrión difunde ácido giberélico (AG, una hormona) hacia la capa de aleurona. Allí provoca la expresión de los genes que codifican para la síntesis de  $\alpha$ -amilasa. Esta enzima hidroliza reservas que quedan disponibles para el crecimiento del embrión.

### Ensayos de germinación:

La finalidad de estos ensayos, estipulados por la INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA) y por la ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS (AOSA), es obtener información con respecto a la **calidad de la semilla**. Permiten conocer el valor de la semilla desde el punto de vista de su siembra en terrenos de cultivo y proporcionar resultados que permitan **comparar** el valor de los distintos lotes de semillas. Estos ensayos comparativos establecen la **calidad** de las semillas de un lote como un nivel comparativo respecto de un **estándar o patrón**.

Algunos parámetros que definen la **calidad** de las semillas son: la pureza, el poder germinativo, la energía germinativa, el vigor, etc. Otros aspectos utilizados son: peso de 1000 semillas, contenido de proteínas (elevado), condiciones durante la formación de la semilla, tipo de almacenamiento, trato durante la cosecha, etc.

La **pureza** es el porcentaje en peso de las semillas puras respecto al peso total de la muestra, considerándose semillas puras a las que pertenecen a la variedad considerada, y que se encuentren maduras y no dañadas. Las "impurezas" pueden estar constituidas por otras semillas de malezas y otras especies, y por "material inerte" (fragmentos pequeños de semillas, tegumentos, restos de tallos y hojas, tierra, insectos, etc.). Conviene identificar las "otras semillas" para establecer su incidencia en el cultivo, a fin de tomar decisiones como aplicación de herbicidas y el momento de su aplicación.

El **poder germinativo** (o % de germinación) es el porcentaje de semillas germinadas en condiciones favorables en laboratorio, a partir de una muestra de semillas puras. Las Reglas ISTA establecen las condiciones en que deben realizarse los ensayos así como los tiempos para los conteos en cada especie.

La **energía germinativa** representa la vitalidad del lote de semillas, se expresa en velocidad o habitualmente en porcentaje, realizando un conteo en la mitad o en las tres cuartas partes del tiempo establecido para realizar el conteo del poder germinativo. Da una idea de qué tan parejo es un lote. Es de gran utilidad a campo ya que los lotes lentos y desperejados tienen menos chance de producir stands satisfactorios en condiciones naturales. Nunca los valores de energía germinativa o vigor pueden superar el de % de germinación.

Se denomina **vigor** a la suma de todos los atributos inherentes a las semillas que permiten obtener una adecuada cantidad de plántulas en condiciones desfavorables de campo. Algunos rasgos que expresan el vigor son: la supervivencia durante el almacenamiento, la supervivencia luego de la siembra y el rápido establecimiento de la plántula. Se expresa en forma de porcentaje. Existen diversos tests que se desarrollan en el laboratorio y que permiten predecir el comportamiento de las semillas en el campo: crecimiento de plántulas, conductividad eléctrica, envejecimiento acelerado, tinción con TTC.

## Viabilidad

Una semilla **viable** es aquella que tiene su embrión sano y potencial capacidad germinativa.

La semilla embebida requiere energía, poder reductor e intermediarios químicos para continuar su germinación. Una vez que el sistema está en actividad la respiración se incrementa (o la fermentación, cuando hay deficiencia de oxígeno). La respiración está muy restringida en la semilla seca. Del 25 al 30% de las reservas se consumen desde la imbibición hasta la emergencia de la plántula para generar energía.

Las pruebas de viabilidad son ensayos de laboratorio que superan la dificultad de los realizados en condiciones de cultivo, que suelen ser poco satisfactorios. El **ensayo topográfico de tetrazolio** o de TTC es un ensayo bioquímico para determinar la viabilidad de semillas de especies que normalmente germinan con lentitud, y cuenta con la ventaja de prescindir de la ocurrencia de la germinación, es decir que no es necesario poner la semilla a germinar. FIGURA 3.

La presencia de procesos de oxidación que tienen lugar en las células vivas se hacen visibles por la reducción del indicador, que es una solución incolora de una sal de tetrazolio embebida por la semilla. Esta solución penetra en los tejidos seminales y toma el hidrógeno liberado por las deshidrogenasas:

Las sales de tetrazolio actúan comoceptoras de protones y electrones, y se evidencia porque cuando se reducen, las sales se colorean de rojo. Basándose en esta propiedad puede predecirse la aptitud germinativa de las semillas. Sólo las partes del embrión capaces de crecimiento (viables) se colorean con la solución de TTC. La localización y no tanto la intensidad de la coloración es lo que determina si la semilla debe o no considerarse viable, de allí que este ensayo se llame "topográfico". Por ser poco tóxicas, las sales de tetrazolio pueden utilizarse directamente en cultivos de organismos para conocer si están vivos.

**NOTA:** Cuando esta sal se utiliza para realizar un test de vigor, sí se considera la intensidad de la coloración además de su localización. Está indicado para algunas especies (soja, maní, maíz) y se consiguen fotografías estándar para comparar los mapas de tinción y clasificar a las semillas en grupos con diferente vigor.

## Dormición

Sin embargo, muchas semillas viables no germinan cuando se las coloca en condiciones adecuadas de humedad, temperatura y oxígeno. La germinación puede demorarse días, semanas o meses. Dichas semillas se encuentran en estado de **dormición**.

El momento de la germinación puede ser crítico para la supervivencia de las poblaciones naturales y los mecanismos de dormición tienen un rol importante en estos casos, siendo una ventaja adaptativa para las especies que la poseen. Estos mecanismos son pronunciados en algunas especies (muchas malezas y otra especies de habitats disturbados) pero ausentes en otras (árboles tropicales). Por ejemplo: la plántula de chamico (*Datura ferox*) maleza de los cultivo estivales de la región pampeana, no soporta las bajas temperaturas invernales. Si germinaran todas las semillas del suelo, cualquier fenómeno natural adverso haría desaparecer la especie en la región.

El estado de dormición es común en especies silvestres y casi no existe en las cultivadas, en las que el mejoramiento genético ha eliminado este estado fisiológico, indeseable para la implantación de cultivos uniformes.

Las semillas, según Harper (1957) pueden ser dormantes desde que se separan de la planta madre (primaria o innata) o puede ser inducida por el ambiente (secundaria, inducida, forzada o impuesta).

**Dormición innata o primaria:** cuando aparece en el momento del desprendimiento de la planta madre y opera de tal forma que impide la germinación vivípara de la semilla. Las causas pueden ser:

1) *Condición del embrión:*

- a) *Embrión rudimentario o pobremente desarrollado al momento de la madurez de la semilla:* estos embriones deben continuar su desarrollo durante el período de dormición, antes de que puedan germinar. El proceso puede acelerarse cultivándolos en medios nutritivos especiales. Ejemplos: orquídeas, ginkgo, algunos cultivares de duraznero.
- b) *Embrión desarrollado pero incapaz de reasumir el crecimiento:* bajo condiciones ambientales adecuadas: muchas clases de semillas con embriones completamente maduros requieren períodos de **sobremaduración** y no germinan cuando son recientemente maduras. Ej.: manzana, durazno, iris, crataegus, tilo, fresno y pino. Estas semillas generalmente maduran en primavera luego de haber permanecido todo el invierno enterradas. Bajo condiciones controladas la sobremaduración (o postmaduración) puede acelerarse almacenando las semillas en cajones con arena húmeda y en frío, tratamiento conocido como **estratificación**. Se cree que previo a la germinación, el embrión requiere la acumulación de alguna sustancia promotora o la degradación de algún inhibidor de la germinación.

### 2) Condición de la cubierta de la semilla

La cubierta está compuesta por una mezcla compleja de polisacáridos, hemicelulosa, lípidos, ceras y proteínas. Durante la maduración de la semilla, por deshidratación, la cubierta se convierte en una capa dura y resistente que protege al embrión. Esta cubierta puede tener una gran influencia sobre el crecimiento del embrión:

- a) *cubiertas impermeables al agua:* presentes en muchas leguminosas. Si la cubierta se rompe o **escarifica**, el agua penetra y comienza la germinación. La **escarificación** puede ser mecánica (la cubierta se debilita con una superficie abrasiva o instrumento cortante; ej. alfalfa), o química (con ácidos fuertes, como sulfúrico concentrado, ej. achira, leguminosas). En condiciones naturales (suelo), la cubierta es atacada por bacterias y hongos, efectuándose una degradación biológica que puede llevar semanas o meses.
- b) *cubiertas impermeables a gases:* ciertas cubiertas son impermeables a gases disueltos como el oxígeno y el anhídrido carbónico. Al igual que en el caso anterior debe producirse la ruptura o escarificación de la cubierta.
- c) *resistencia mecánica:* pueden ser cubiertas permeables a gases y agua, pero de una resistencia tal que no pueden ser rotas por el embrión en crecimiento, como es el caso de los carozos. Estas cubiertas deben ser eliminadas o quebradas para permitir la emergencia del embrión. Puede darse por los microorganismos mientras está enterrada, o por procesos físicos como los cambios bruscos de temperatura que ocurren en el desierto. En estos casos la ruptura de la dormición es gradual y la germinación se distribuye en el tiempo. En algunos casos, durante la germinación de la semilla, se segregan ciertas enzimas que debilitan la cubierta (por hidrólisis de sus componentes). Una exposición a períodos cortos de temperatura extremadamente alta, como durante un incendio (aproximadamente 100°C) puede sincronizar la ruptura de la dormición y producir la germinación masiva de las especies luego del fuego.

Una cubierta dura a menudo complica la germinación de plantas con fines de cultivo. Debe ser eliminada de forma artificial, mecánica o químicamente.

### 3) Respuesta a la luz

La luz afecta la germinación de muchas semillas. Se llaman *fotoblásticas*, **positivas** si la luz provoca efecto inductivo, y **negativas** si la luz inhibe la germinación. Generalmente las semillas que responden a la luz no están domesticadas y son ricas en grasas, sin embargo la mayoría de las semillas cultivadas no requieren luz para germinar, debido a la selección humana para disminuir los requerimientos para la germinación. Las especies silvestres pueden mostrar tanto inducción como inhibición de la germinación por la luz.

Las semillas fotoblásticas positivas tienen sistemas enzimáticos inactivos. Poseen un pigmento llamado **fitocromo** que tiene la propiedad de percibir el estímulo de la luz de determinada longitud de onda y transmitirlo a dichos sistemas enzimáticos activándolos o inhibiéndolos. Después de percibido el estímulo, la semilla puede germinar en la oscuridad. Se vio que la luz de longitud de onda de 660 nm (rojo), irradiada sobre semillas previamente embebidas con agua, es suficiente para iniciar el proceso germinativo (ej. semillas de lechuga *var Grand Rapid*, de chamico, etc.). Una irradiación posterior con luz de 730 nm (rojo lejano),

inhibe el estímulo dado por la luz roja, debido a que el fitocromo es un pigmento fotorreversible. La luz es importante también en fresno, morera, cebada, abrepño, etc.

Estudios recientes han demostrado que, además del rojo lejano, la luz azul puede resultar inhibitoria en muchas especies, por lo cual no se sabe con certeza si es el **fitocromo** o el **criptocromo** el pigmento involucrado en dichas especies.

Este tipo de dormición también puede ser considerada secundaria. (Lectura complementaria Cap. 20, punto 20.6, del libro de Fisiología Vegetal, de Salisbury y Ross, 1994).

#### 4) Presencia de inhibidores propiamente dichos

Estas sustancias pueden inhibir el crecimiento por presión osmótica, acidez o actividad inhibitoria hormonal. Su producción está regulada por las condiciones del medio y se acumulan en diversos órganos: yemas, tallos, pericarpio, endosperma, según la especie de que se trate y a veces en más de un órgano a la vez. Son en su mayoría hidrosolubles y su naturaleza química es diversa. La función que desempeñan en la naturaleza sería evitar que la semilla germine y comience a crecer una plántula cuando las condiciones del medio son adversas para su posterior crecimiento, lo que determinaría su muerte. Existen en mostaza, alélí, café, peral, paraíso, acelga y plantas del desierto.

Los suelos de climas áridos se caracterizan por tener muy poca cantidad de agua disponible, generalmente concentrada en unas pocas lluvias de forma poco predictiva. Luego de cada lluvia, tiene lugar una germinación masiva de especies. ¿Cómo es que las semillas perciben que el ambiente se ha hecho más favorable para la germinación y el desarrollo de la semilla?

Una condición común es la presencia de inhibidores hidrosolubles en el pericarpio y o la testa. Una lluvia liviana no puede removerlos y entonces no germina. La germinación ocurre sólo luego de una lluvia mayor o prolongada y lava todos los inhibidores. En este caso la plántula tiene acceso a suficiente agua para aumentar sus chances de sobrevivir y completar su ciclo de vida. La sustancia inhibidora puede ser un compuesto orgánico específico o sales acumuladas.

También es importante la presencia de inhibidores para la prevención de la germinación de semillas en frutos frescos. La alta concentración de solutos tiene un rol importante, pero el ABA (ácido abscísico, otra hormona) también, como se demostró por la germinación de semillas de tomate dentro del fruto de plantas mutantes deficientes de ABA. También ha sido identificado el ABA como responsable de la dormición de semillas de muchas especies. Los inhibidores pueden ser externos y provenir del fruto, o bien internos encontrándose en la cubierta seminal o en el embrión.

Algunas de estas sustancias son el ácido cianhídrico (producido por la hidrólisis de glucósidos cianogénicos), el amoníaco (liberado enzimáticamente en muchos frutos), lactonas no saturadas (anemoninas, cumarinas en leguminosas), aldehídos, alcaloides, ftalatos en umbelíferas; ácidos orgánicos como el acético, el málico, cítrico y ferúlico en tomate.

Un efecto estimulador, que aún no está totalmente demostrado es el humo de la combustión de plantas (contiene etileno, amonio y ácido octanoico). En especies sudafricanas y del O de Australia, de ambientes sometidos a la acción del fuego, la exposición de una semilla dormante a humo frío derivado de vegetación nativa quemada promovió la germinación de muchas especies.

**Dormición secundaria o inducida:** aparece luego de la maduración de la semilla como respuesta a un factor ambiental estresante y perdura aún luego de la desaparición de dicho factor. La entrada en este estado de dormición ocurre posteriormente a la formación de la semilla y luego del desprendimiento de la planta madre. Posibles causas de esta dormición serían: altas temperaturas, baja tensión de O<sub>2</sub>, ausencia o exceso de luz, dependiendo de los requerimientos de la especie.

El requerimiento de un factor para romper la dormición no implica que éste deba ser suministrado durante la germinación (por ejemplo, frío en la sobremaduración) sino que en

las semillas dormantes se puede promover la germinación por una serie de condiciones discontinuas, que la potenciarían pero que no son las indispensables una vez iniciada.

La dormición no es un proceso de todo o nada; al contrario puede variar, es decir, la semilla puede estar más o menos dormante. Así la dormición previene la germinación bajo determinadas condiciones y sólo deja que ocurra bajo otras. En las semillas, el estado de dormición implica que el desarrollo del embrión está bloqueado. Este fenómeno se extiende también a las yemas, los tubérculos, los rizomas y bulbos.

### **Longevidad y almacenamiento de semillas**

La vida de las semillas varía desde pocas semanas hasta miles de años, pero raramente es mayor de unas cuantas décadas. Las semillas que no se encuentran bajo condiciones ambientales favorables para germinar mueren tan pronto como su contenido de agua baja del valor original del 60% hasta el 30-44%. Las semillas de plantas cultivadas viven unos cuantos años en condiciones ordinarias de almacenamiento, especialmente con bajas temperaturas y bajas concentraciones de oxígeno, lo que hace disminuir la respiración y otros procesos fisiológicos que llevan al deterioro de las semillas, prolongando así su viabilidad. La presencia de cubiertas duras favorece el almacenamiento y la longevidad. En algunas especies, al estado de dormición innato del embrión se suma o refuerza la estrategia adaptativa de presentar una cubierta resistente.

## **TRABAJO PRACTICO N° 1: ENSAYO DE VIABILIDAD CON TTC**

Materiales: semillas de maíz remojadas de dos lotes.

- 2 tapas de Cajas de Petri o de cajas de germinación
- solución de TTC al 0.1% (cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio)

Procedimiento:

- Elegir 10 semillas de cada lote. Cortar cada semilla de manera que queden unidas por su vértice. Tomar dos tapas de Cajas de Petri y rotularlas con etiquetas o cinta como A y B, y colocar en ellas 5 a 10 ml de solución de TTC al 0.1%, suficiente como para cubrir el fondo de la caja.
- Colocar en cada caja las semillas correspondientes con la sección cortada hacia abajo, cuidando que estén en contacto con la solución. Dejar las cajas a temperatura ambiente por espacio de 30 a 60 minutos.
- Observar cuidadosamente y registrar para cada lote el número de semillas cuyos embriones se han teñido de rojo.

Informe: Presentar los siguientes datos:

- % de semillas con embrión teñido del lote A
- % de semillas con embrión teñido del lote B

---

## **TRABAJO PRACTICO N° 2: ENSAYO DE GERMINACION**

Materiales: semillas de maíz remojadas de dos lotes

- 2 bandejas plásticas
- papel absorbente
- 2 bolsas de nylon
- marcador al solvente
- cámara de germinación (Lab. 519 - 5<sup>to</sup> Piso)

Procedimiento:

- Elegir 10 semillas de cada lote. Tomar 2 bandejas plásticas, colocar en el fondo 2 capas de papel absorbente. Humedecer con agua.
- Rotular las bandejas como: **A y B**, junto con el **número de Comisión**, y sembrar en ellas las semillas correspondientes. Las bandejas se llevarán a cámara de crecimiento.
- A la semana se realizará el conteo de semillas germinadas (expresados en %).

Informe:

Presentar los siguientes resultados:

% de germinación del lote A

% de germinación del lote B

Se deberá confeccionar una tabla donde aparezcan registrados los conteos parciales en los horarios establecidos precedentemente.

-Comparar los resultados obtenidos en este ensayo con los del TP N° 1.

### **TRABAJO PRÁCTICO N° 3: IMBIBICIÓN DE SEMILLAS**

Materiales: semillas secas de maíz  
3 bandejas plásticas  
3 bolsas de nylon  
papel absorbente  
heladera (4°) y estufa a 45°  
marcador al solvente  
cámara de crecimiento

Procedimiento:

- Tomar tres muestras de **25 semillas** cada una.
- Colocar las semillas en bandejas plásticas con papel humedecido. Rotular las bandejas como: frío, calor y temperatura ambiente, y número de comisión.
- Poner las bandejas durante 24 hs en heladera, estufa o temperatura ambiente, según el tratamiento que corresponda.
- Cambiar a cámara de crecimiento a las 24 hs.
- Contar número de semillas germinadas a la semana.

Informe:

Presentar los resultados como % de germinación en cada tratamiento (considerando 25 semillas como el 100%).

---

### **TRABAJO PRÁCTICO N° 4: RUPTURA DE DORMICION DE SEMILLAS DE LEGUMINOSAS: *escarificación mecánica y química.***

#### **a) Escarificación mecánica**

Materiales: semillas de acacia u otra leguminosa  
gillette  
cajas de germinación  
papel absorbente  
cámara de crecimiento

Procedimiento:

- Tomar un lote de 10 semillas y despuntarlas **cuidadosamente** con una gillette. Llamar a este tratamiento ESCARIFICADAS.
- Colocar estas semillas en una caja de germinación en cuya base se ha dispuesto un papel absorbente humedecido. En otra caja igualmente preparada sembrar otras 10 semillas sin

escarificar y llamar a este tratamiento CONTROL. Rotular ambas cajas con el tratamiento correspondiente y número de comisión.

- Llevar las cajas a la cámara de germinación durante una semana, luego de la cual se procederá al recuento de las semillas germinadas en cada lote. Expresar sus resultados en porcentaje.

#### **b) Escarificación química**

Materiales: semillas de acacia  
ácido sulfúrico concentrado  
cronómetro  
colador  
cajas de germinación  
papel absorbente

Procedimiento:

- Tomar tres lotes de diez semillas de acacia y sumergirlas en vasos de precipitado con ácido sulfúrico durante 10, 40 y 60 minutos, respectivamente.
- Volcar cuidadosamente el ácido para no perder las semillas. Enjuagarlas previamente en el vaso de precipitado, pasarlas al colador en enjuagarlas BIEN bajo canilla (el ácido mata al embrión).
- Tomar otro lote de semillas sin tratar y denominarlo CONTROL. Sembrar las semillas en cajas de germinación y rotular con el tratamiento correspondiente y número de comisión.
- Llevar las semillas a cámara de germinación y luego de una semana realizar los conteos de germinación.

Informe:

Presentar los resultados en forma de porcentaje y establecer comparaciones acerca del tratamiento aconsejado para la ruptura de dormición en acacia.

---

#### **TRABAJO PRACTICO N° 5: ESTRATIFICACIÓN DE SEMILLAS.**

Materiales: frutos de roble  
cajas de germinación  
bolsas de nylon  
heladera o cámara frigorífica  
cámara de germinación

Procedimiento:

- Remojar los frutos (sin la cubierta) durante 30 segundos en agua con unas gotas de lavandina. Enjuagar bien bajo canilla y colocar 10 frutos en cada caja.
- Rotular las cajas con los tratamientos: 7, 14, 21, 28 y 35 días. (1)
- Disponer otros 10 frutos en una caja acondicionada con papel absorbente humedecido: control (2).
- Llevar las cajas (1) a la cámara frigorífica (o heladera) y la (2) a la cámara de germinación.
- A los 7 días retirar la caja rotulada como "7" de la heladera, y acondicionarla como germinador. Repetir a las 2, 3, 4 y 5 semanas.
- Efectuar el conteo de germinación cada semana.

Informe:

Informar % de germinación en cada tratamiento a lo largo del tiempo.

---

---

**TRABAJO PRÁCTICO N° 6: EFECTO DEL POTENCIAL OSMÓTICO DEL MEDIO EN LA GERMINACIÓN: Ensayo con Polietilenglicol 6000 (PEG 6000).**

El **potencial agua** es la capacidad del agua de un sistema de realizar un trabajo. Sin embargo hay muchos factores que pueden aumentar o disminuir esta capacidad. En el caso de los solutos, el hecho de estar “ocupado con” o “reteniendo” el agua adherida sobre ellos hace que esté menos disponible para otros procesos, y por lo tanto disminuyen su capacidad de hacer trabajo, es decir, disminuyen el potencial agua. Este efecto que tienen los solutos sobre el potencial del agua se conoce como **potencial osmótico**.

El **polietilenglicol 6000 (PEG 6000)** es una sustancia de gran peso molecular, por lo cual no puede penetrar a través de la membrana celular, sin embargo tiene efecto osmótico. Esto provoca que, a pesar de que la semilla se encuentre sumergida, en realidad tenga poca agua disponible. Gracias a esta característica se emplea esta sustancia para realizar pruebas de “simulación” de sequía o deficiencia de agua. Se colocan semillas en cajas con 10 a 15 ml de PEG 6000 (sin algodón ni papel), en concentraciones crecientes que van desde 0 M (agua destilada) hasta llegar a altas concentraciones de PEG para someter a la semilla a una fuerte deficiencia hídrica. La finalidad de estos ensayos es estudiar el comportamiento de diferentes especies frente a condiciones desfavorables durante el período de germinación.

**Materiales:** semillas de colza (*Brassica sp.*)

4 cajas de germinación

soluciones de PEG 6000 de **0 MPa; -0.25 MPa; -0.5 MPa y -1.0 MPa**

4 pipetas (una por cada solución, no intercambiar)

cámara de crecimiento.

**Procedimiento:**

- Poner 10 semillas en cada caja y rotular cada tratamiento (0; -0.25; -0.5; -1.0 MPa).

- Llevar las cajas a cámara de germinación y realizar un conteo a la semana.

**Informe:**

Presentar los datos como % de germinación para los distintos tratamientos.

**FIGURAS**

Figura 1. Imbibición



Figura 2. Germinación de un grano de cebada.

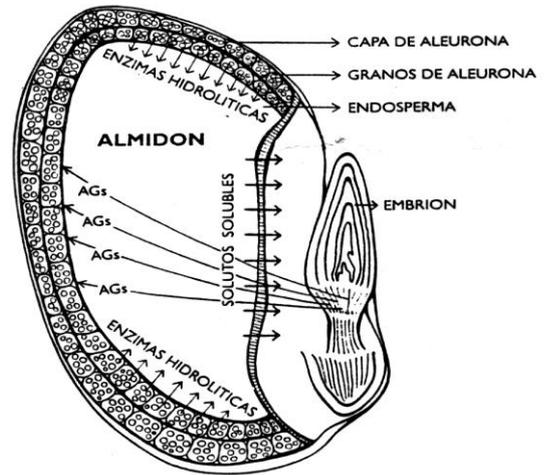
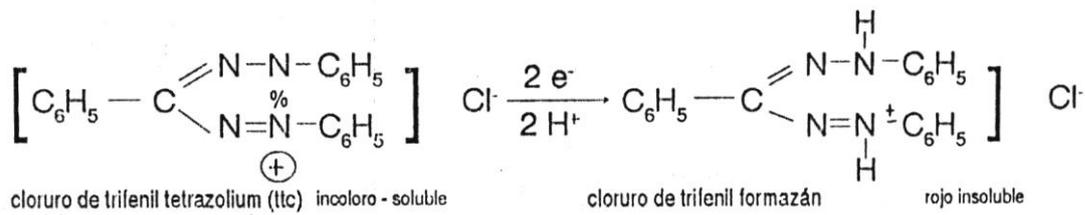


Figura 3. TTC



## RELACIONES HIDRICAS EN LAS PLANTAS

El agua es importante ya que constituye el solvente y medio universal en el que ocurren las reacciones metabólicas esenciales para la vida.

La estructura y propiedades del agua tienen una fuerte influencia sobre las características y estructuras de las proteínas, las membranas celulares, los ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares (Lecturas recomendadas: Plant Physiology de L. Taiz y E. Zeiger, 1991; Principios de F.V. de E. Montaldi, 1995).

En casi todos los ambientes el agua es continuamente absorbida por las plantas desde el suelo y perdida a la atmósfera. El movimiento del agua ocurre por difusión, flujo masal, ósmosis o por la combinación de estos tres tipos fundamentales de transporte.

La *difusión* genera un movimiento molecular (o iónico) de regiones de alta concentración a otras de baja concentración. Esto se debe a que las moléculas se encuentran en constante movimiento, por lo que tiende a desaparecer cualquier diferencia de concentración. Montaldi define la difusión *como flujo de solutos cuya fuerza motriz es una diferencia de potencial químico, sin gasto de energía*. Este proceso es rápido en pequeñas distancias pero extremadamente lento para distancias grandes, sin embargo es el que mejor refleja la absorción de solutos a través de las membranas.

El *flujo masal* ocurre como consecuencia de una diferencia de presión, como una corriente de convección (por ej. el movimiento de agua en un río). Es independiente de la concentración de solutos. Este fenómeno es el que mejor explica el transporte de agua en largas distancias dentro de las plantas, por ej. desde la raíz hacia el vástago a través del xilema, y el movimiento de agua en el suelo.

*Osmosis* es el proceso por el cual el agua se mueve a través de las membranas selectivamente permeables, es decir que permiten el movimiento de determinadas sustancias, solamente. Es un movimiento neto de agua y de otras pequeñas moléculas no cargadas, tal como CO<sub>2</sub>. El resto de las sustancias, de mayor tamaño o con carga, deben pasar a través de proteínas especializadas en el transporte. El proceso de ósmosis involucra tanto el flujo masal como la difusión, ya que tanto el gradiente de concentración, como el de presión, actúan en el transporte. La dirección y el flujo de agua estará dado por el gradiente de concentración de agua, por el gradiente de presión de ella, o por ambos.

Esta última observación nos permite introducir el concepto de fuerza impulsora y representa el gradiente de energía libre del agua, conocido ampliamente como gradiente de potencial agua. Antes de explicar específicamente el concepto de potencial agua (o potencial químico del agua), veamos qué es el potencial químico de una sustancia.

### Potencial químico

El **potencial químico** de una sustancia es una expresión de la cantidad de energía libre asociada a dicha sustancia. En termodinámica, la energía libre representa el potencial o la capacidad potencial (por lo tanto máxima) de **realizar un trabajo**. Todos los organismos vivos necesitan un ingreso continuo de energía libre para vivir. Todos los procesos metabólicos, por lo tanto, requieren el aporte de energía libre. Así por ejemplo: las reacciones bioquímicas, la acumulación de solutos, el crecimiento, etc., están movidos por el aporte de dicha energía.

Los conceptos de energía libre y potencial químico son estudiados por la termodinámica, que se basa en el estudio de la transformación de la energía. Así, por ejemplo, la ósmosis es un proceso espontáneo, en el cual no hay trabajo involucrado: el agua se mueve desde regiones de alto potencial de agua hacia regiones de menor potencial de agua. Se lo puede ejemplificar como la caída del agua por una catarata.

Es posible hacer referencia al cambio de energía libre del sistema completo bajo consideración, o también al cambio de energía libre de cualquiera de sus componentes. Debemos notar, sin embargo, que un volumen grande de agua tiene más energía libre que un volumen pequeño bajo iguales condiciones. Por eso, es conveniente considerar la energía libre de una sustancia en relación a alguna **unidad de cantidad** de esa sustancia. Así llegamos al

concepto de **potencial químico** ( $\mu_i$ ) que representa el cambio de energía libre del sistema por peso molecular (energía libre/mol) de la sustancia. Considerado de esta forma, el potencial químico es una propiedad análoga a la concentración de solutos o a la temperatura y resulta independiente de la cantidad de sustancia en consideración. Así, el gradiente de potencial químico de una sustancia entre dos fases determina la dirección en la cual dicha sustancia difundirá espontáneamente.

El término ( $\mu_i - \mu_o$ ) posee particular importancia en los estudios de las relaciones hídricas de las plantas y el suelo dado que constituye una medida de la capacidad del agua en el sistema bajo estudio para realizar trabajo, comparada con la capacidad del agua pura. Así, se define **potencial agua** ( $\Psi$ ) como:

$$\Psi = (\mu_i - \mu_o) / V$$

siendo:  $\mu_i$ : potencial químico del agua en el punto bajo consideración

$\mu_o$ : potencial químico del agua pura

V: volumen molar parcial del agua

La razón por la cual el potencial agua es tan importante, se debe a que **el movimiento del agua se produce en respuesta a gradientes del mismo**. Por ejemplo, cuando en una parte del sistema el potencial agua es mayor que en otra, y nada previene o detiene el movimiento del agua (por ejemplo, una membrana impermeable), el agua se moverá desde el punto de mayor potencial agua hacia el de menor potencial agua.

Durante este proceso, la energía libre del sistema disminuye; es decir, se libera energía libre al medio o entorno, y por lo tanto el proceso es espontáneo.

Esta energía liberada tiene un potencial para ejercer trabajo, como el que se efectúa cuando el agua es osmóticamente levantada hacia las ramas en contra de la gravedad, en el fenómeno conocido como presión radical.

El máximo trabajo posible es equivalente a la energía libre liberada. A veces no se ejerce ningún trabajo, pero la energía libre aparece en el sistema y su entorno, en forma de calor o de entropía aumentada. En cualquier caso, es importante recordar que el equilibrio se alcanza cuando el cambio de energía libre ( $\Delta G$ ) o la diferencia en potencial agua ( $\Psi$ ) es cero. En este punto la entropía para el sistema y su entorno alcanzará el valor máximo, pero el cambio de entropía ( $\Delta S$ ) será igual a cero.

Basándose en la teoría cinética y en la termodinámica, consideraremos a continuación los movimientos del agua en el sistema en el que la plante es parte intermedia: el sistema suelo-planta-atmósfera. El estudio del movimiento del agua nos ayudará a comprender mejor los modelos conceptuales que hemos visto.

## EL ESTADO DEL AGUA EN LAS PLANTAS

Una planta es un sistema dinámico que normalmente no está en equilibrio con su ambiente. El agua está constantemente penetrando, moviéndose en el interior y saliendo de la planta.

Surge entonces la importancia de conocer los niveles de energía del agua en las células y tejidos de la planta y en su ambiente (suelo, atmósfera) para así poder comprender y aún predecir su dirección y velocidad en el sistema suelo-planta-atmósfera.

Los estudios sobre las relaciones del agua en dicho sistema comenzaron a realizarse sobre bases termodinámicas una vez adquirido el concepto básico de que es el nivel de energía el que resulta crítico para las plantas, y no la cantidad de agua presente. La energía libre neta de un componente (ejemplo: agua) en un sistema (ejemplo: suelo-planta) es la expresión de su capacidad para efectuar trabajo. El potencial agua es afectado por factores tales como la presencia de solutos, coloides y otras partículas grandes. Las moléculas de agua en el sistema interactúan con estos componentes y *disminuyen la energía libre del agua por debajo de la del agua pura*, cuyo valor es cero, adquiriendo el potencial agua valores negativos. En términos de

la capacidad para efectuar trabajo, en un sistema multicomponente, este valor es menor que el correspondiente al agua pura.

La fórmula completa del potencial agua surge de la ecuación de Gibbs, para una determinada sustancia. Considerando los componentes que lo constituyen, el potencial agua puede expresarse como:

$$\Psi = \Psi_p + \Psi_\pi + \Psi_m + \rho \cdot g \cdot h$$

Donde:  $\Psi_p$ : potencial de presión (debido a la presión de turgencia)

$\Psi_\pi$ : potencial osmótico (debido a la presencia de solutos)

$\Psi_m$ : potencial mátrico (debido a la presencia de coloides)

$\rho g h$ : potencial gravitacional (presión hidrostática), con:  $\rho$ : densidad del agua

$g$ : cte gravitacional

$h$ : altura

Los valores de  $\Psi$ ,  $P$  y  $\pi$  se miden en unidades de presión (bares, atmósferas o megapascuales), con la relación:

$$1 \text{ atm} = 1,01 \text{ bar} = 0,1 \text{ MPa}$$

Al igual que el potencial agua, el potencial osmótico y el potencial mátrico nunca son superiores a cero, por lo que siempre adquieren valores negativos.

El término de presión puede asumir valores positivos en células turgentes y llegar a cero en células flácidas.

El potencial gravitacional es de sólo  $0,01 \text{ MPa m}^{-1}$ , por lo que puede despreciarse excepto en árboles de gran altura.

Para células en equilibrio con el medio, el potencial agua total es el mismo a través de todo el sistema, es decir, en la pared celular, citoplasma, orgánulos y vacuola. Sin embargo, dado que la planta constantemente está perdiendo o ganando agua, los componentes del potencial agua pueden diferir en los compartimentos celulares. En la vacuola, el potencial agua se debe principalmente a las fuerzas osmóticas y de turgencia; mientras que en la pared se debe a las fuerzas mátricas y en pequeño grado a las osmóticas. En el citoplasma de una célula turgente son importantes tanto el potencial osmótico como el de presión, y en menor escala el mátrico.

Sin embargo, dado que el potencial mátrico toma mayor importancia relativa cuando la planta no está en buenas condiciones hídricas y el gravitacional sólo en árboles de gran altura, podemos simplificar la ecuación reduciéndola a:

$$\Psi = \Psi_p + \Psi_\pi$$

o simplemente y para facilitar:

$$\Psi = P + \pi$$

Considerando el sistema nombrado anteriormente (suelo-planta-atmósfera), en la mayoría de las condiciones, el potencial agua más alto corresponde al suelo (ej. -1 bar) y el más bajo corresponde a la atmósfera (aproximadamente -300 bares, si la HR es del 80% y tenemos una temperatura de  $20^\circ \text{C}$ )

El movimiento de agua hacia las raíces responde entonces a un  $\Psi$  más negativo (o menor) en el interior de la raíz con respecto al del suelo. Si el gradiente de potencial agua no es favorable, es decir que no se cumple que  $\Psi_{\text{raíz}} < \Psi_{\text{suelo}}$ , no penetrará agua a la raíz y la planta comenzará a marchitarse.

Un valor de potencial agua de -15 bares en el suelo corresponde al llamado punto de marchitez permanente. A medida que el suelo se seca y se aproxima a -15 bares, los valores de  $\Psi$  en la raíz deben hacerse menores que ese valor, de manera de seguir manteniendo un gradiente favorable a la penetración de agua en la raíz. Esto puede ocurrir hasta un punto luego del cual la planta no logra superar el estrés (=déficit de agua) por falta de agua y muere. El

crecimiento celular es sumamente sensible a la falta de agua. Se ha comprobado que la disminución de sólo un bar en el  $\Psi$  externo provoca una disminución perceptible en el crecimiento celular.

En la siguiente tabla se generaliza la sensibilidad al estrés hídrico de diferentes procesos o parámetros vegetales según Hsiao (1973):

<b>SENSIBILIDAD AL ESTRES</b>			
	muy sensible		relativamente insensible
	<b>Reducción en el <math>\Psi</math> tisular requerido para afectar al proceso</b>		
Parámetro afectado	0 bar	10 bar	20 bar
crecimiento celular	-----		
síntesis de pared	-----		
síntesis proteica	-----		
formación de protoclorofila		-----	
nivel de nitrato reductasa		-----	
acumulación de ABA	-----		
nivel de citocininas		-----	
apertura estomática		-----	
asimilación de CO <sub>2</sub>	-----		
respiración	-----		
acumulación de prolina		-----	
acumulación de azúcar		-----	

En niveles altos de estrés de agua ( $\Psi = -10$  a  $-20$  bares) la respiración, el transporte de compuestos producidos por fotosíntesis y la asimilación de anhídrido carbónico caen a niveles próximos a cero. Agregando agua en este punto, las plantas generalmente se recuperan, aunque el crecimiento y fotosíntesis en las hojas jóvenes quedarán reducidos por varios días y las hojas viejas pueden caer.

Considerando entonces que el proceso de crecimiento es particularmente sensible al estrés de agua, el rendimiento de cualquier cultivo puede disminuir notablemente, aún con sequías moderadas. Bajo condiciones de estrés hídrico las células son más pequeñas y en general el desarrollo de las hojas es menor, lo que conduce a un área fotosintética reducida.

La productividad vegetal está más estrechamente relacionada con la disponibilidad de agua que con cualquier otro factor ambiental. Por ello, la falta de agua ha sido estudiada como un factor de estrés. Los ecólogos clasifican a las plantas según su respuesta a la disponibilidad de agua en:

- hidrófitas: crecen donde el agua es muy abundante.
- mesófitas: crecen donde la disponibilidad de agua es intermedia.
- xerófitas: crecen donde el agua disponible es escasa.

Sabemos también que los solutos influyen en gran medida sobre el potencial agua, y en base a ello surge otra clasificación de las plantas en:

- glicófitas: sensibles a concentraciones relativamente altas en sales.
- halófitas: plantas capaces de crecer en presencia de altas concentraciones de sales.

Sin embargo, puede suceder que las raíces de una planta estén sumergidas en una solución acuosa, en íntimo contacto con moléculas de agua, y a pesar de ello no absorber agua, debido a un gradiente desfavorable de potencial agua entre las raíces y la solución externa. Este

fenómeno suele denominarse sequía fisiológica para diferenciarse de la sequía debida a la ausencia de agua.

En condiciones de sequía fisiológica la planta dispone de abundante agua, pero no puede utilizarla debido a que el potencial agua de la solución es igual o menor (más negativo) que el de la raíz.

Un experimento sencillo que permite la observación de este fenómeno, consiste en colocar diversas plántulas en soluciones de concentración creciente de un determinado soluto. Cada concentración equivale a un determinado potencial osmótico (potencial agua de la solución) como se verá más adelante. Algunas de estas plantas (aquellas sometidas a una alta concentración de solutos) presentarán evidentes síntomas de marchitez y finalmente morirán.

Condiciones similares a las de este experimento se encuentran en suelos salinos o alcalinos. El potencial agua de suelos agrícolas bien provistos de agua es de aproximadamente -0.5 bares o menos. En suelos alcalinos o salinos, la concentración de solutos puede ser tan alta que su potencial agua puede disminuir a valores de -100 bares. En estos suelos, las plantas no pueden vivir exceptuando a las halófitas. En las zonas de regadío, las sales pueden acumularse en la zona del suelo donde crecen las raíces, dando lugar a la formación de suelos alcalinos producidos por el hombre, lo que es un importante problema agronómico.

Debido a la importancia del  $\Psi$  en el movimiento del agua en la planta, y a la relativa facilidad de su medición, este parámetro es muy utilizado para determinar el estado del agua en los tejidos vegetales. Sin embargo, no existen pruebas de que el potencial agua total tenga efecto directo sobre los procesos fisiológicos más importantes. Cada vez resulta más evidente que la turgencia y el potencial osmótico celulares, como componentes del potencial agua, son los fisiológicamente activos. Se ha visto, además, que las células vivas necesitan estar relativamente saturadas para poder cumplir con sus funciones fisiológicas.

Por esta razón es que en la actualidad se realizan dos tipos de determinaciones para evaluar el estado del agua en la planta: i) el nivel energético del agua, y ii) el contenido o cantidad de agua. Ambos parámetros se encuentran relacionados de tal modo que al disminuir el contenido de agua decrece el nivel energético de la misma. Tanto uno como otro determinan el grado de insaturación o déficit de agua en la planta. La relación entre ellos no es única sino que varía con la especie, las condiciones de crecimiento y la disponibilidad de agua, por lo cual se hace imprescindible la medición de ambos.

## **MÉTODOS DE MEDICIÓN DEL POTENCIAL AGUA**

### **1) Método de Chardakov**

Es un método sencillo que se basa en la utilización de dos series idénticas de diferentes concentraciones de una solución. A una de estas series, serie A, se le colocan cristales de azul de metileno y en la otra, B, se colocan muestras de tejido. Luego de un cierto tiempo, necesario para que ocurra el intercambio líquido, se retira el tejido y se agrega una gota de la solución equivalente de la serie coloreada (A), que no ha sufrido cambios. (Figura 4).

Si la gota coloreada tiende a subir, la solución en que fue inmerso el tejido se hizo más densa, indicando que el tejido ha absorbido agua e implicando que el tejido tenía un potencial agua más bajo que la solución de ese tubo.

Si la gota coloreada tiende a bajar (se hunde), la solución que contenía el tejido es ahora menos densa que la original, debido a que pasó agua del tejido a la solución, y es la solución en este caso, la que tiene un potencial agua menor que el tejido.

La tercera posibilidad es que la gota coloreada difunda en forma homogénea en todas direcciones indicando que no ha habido cambio en la concentración de la solución. De esta última situación se deduce que ésta es la concentración de la solución, cuyo potencial agua está en equilibrio con el potencial agua del tejido.

En este único caso se cumple que:

$$\Psi_{\text{solución}} = \pi_{\text{solución}} = \Psi_{\text{tejido}},$$

determinamos así el  $\Psi$  del tejido en cuestión. Para determinar el potencial agua de la solución sabemos que:

$$\Psi = \pi + P$$

A presión atmosférica, la P siempre es cero. Luego, en una solución el potencial agua es igual al potencial osmótico:  $\Psi = \pi$

El valor de  $\pi$  puede calcularse según la ecuación de Van't Hoff:

$$\text{Potencial Osmótico} = \pi = - M \cdot i \cdot R \cdot T$$

Donde: M: molalidad de la solución (moles de soluto en un litro de agua)

i: Constante de ionización del soluto (para moléculas no ionizadas como sacarosa o manitol  $i=1$ )

R: Constante general de los gases = 0.08205 l atm/mol K

T: Temperatura absoluta (K) siendo 0 C=273 K.

Veamos el uso de esta fórmula en dos ejemplos:

1) Cuál es el  $\pi$  de una solución de glucosa 1 M bajo condiciones estándar de T (0 C) y presión (1 atm)? Los datos son:

$$M=1 \text{ mol/l} \quad i=1 \quad T=273 \text{ K} \text{ entonces}$$

$$\pi = -1 \text{ mol/l} (1) 0.08205 \text{ l.atm.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1} \cdot 273 \text{ K} = -22,39 \text{ atm}$$

2) Calcular el  $\pi$  de una solución de NaCl 1 M cuyo  $i=1.8$  en condiciones estándar de P y T ?

$$\pi = -1.0 \text{ mol/l} (1.8) \cdot 0,08205 \text{ l.atm.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1} \cdot 273 \text{ K} = -40.32 \text{ atm}$$

Observemos la diferencia entre el ejemplo 1 y el 2: a igual concentración, la sustancia ionizable produce un potencial osmótico mucho más bajo que una sustancia no ionizable.

## **TRABAJO PRÁCTICO N° 7: DETERMINACION DEL POTENCIAL AGUA DE UN TEJIDO VEGETAL MEDIANTE EL METODO DE CHARDAKOV**

**Materiales:** papa

sacabocado de 0.5 cm de diámetro

navaja u hoja de afeitar

regla

soluciones de sacarosa

azul de metileno

pipeta Pasteur

20 tubos de ensayo

pipetas

**Procedimiento:**

- Preparación de la SERIE A: colocar 4 ml de cada solución en tubos de ensayo (previamente rotulados), agregar un cristal de azul de metileno y mezclar muy bien. Este cristal marca a estas soluciones de referencia sin cambiar su potencial osmótico en forma significativa.
- Preparar otra serie (B) de tubos de ensayo con 10 ml de solución en cada uno.
- Obtener cilindros de papa con un sacabocado y cortar sus extremos de manera que cada cilindro resulte de 3 cm de longitud. Asegurarse de que no quede tejido epidérmico. Enjuagar

los cilindros y secarlos con papel absorbente. Colocar un cilindro en cada solución de la serie de tubos de ensayo con 10 ml de solución y tomar el tiempo a partir de este momento.

- Dejar transcurrir un período de equilibrio de 1 hora durante el cual debe agitar 4 veces las soluciones.
- Retirar los cilindros realizando una observación de su turgencia. Agitar la solución remanente. Mediante una pipeta Pasteur colocar una gota de la solución de referencia (azulada) de concentración equivalente, en el centro de cada solución correspondiente que contuvo el cilindro. Tratar de minimizar toda posible mezcla o disturbio. Observar qué ocurre con la gota en cada solución, y ubicar la solución en la cual la gota coloreada difunde en forma pareja sin hundirse o subir.

**Informe:**

Realizar un esquema del método utilizado en el que figure la concentración molar y el potencial osmótico de cada solución.

Realizar las ecuaciones que permitan determinar el potencial agua del tejido de papa.

Informar el valor del potencial agua del tejido de papa.

---

## **2) Bomba de Presión**

El potencial agua de zonas cercanas a una planta se encuentra generalmente en equilibrio, esto es particularmente cierto cuando la planta no transpira. Se ha visto que el potencial osmótico de la savia xilemática resulta despreciable en la mayoría de las plantas, a excepción de aquellas que crecen en suelos de alto contenido salino, y que el potencial de presión no se considera debido a que en el xilema no existen células vivas. Así, el único componente significativo del potencial agua de la savia xilemática sería el potencial mátrico.

La bomba de presión es un aparato diseñado por P.F. Scholander para la determinación del potencial agua de la savia xilemática. Para ello, se corta el tallo de una planta y se inserta en un tapón de goma de manera tal que la superficie cortada sobresalga (1). El tapón se coloca en la bomba y se permite la entrada de presión (2) hasta el momento exacto en que la savia comienza a exudar por la superficie cortada del tallo (3). El potencial agua del tallo en cuestión resulta numéricamente equivalente a la mínima presión requerida para causar la exudación. (Figura 5).

La columna de agua en una planta está casi siempre bajo tensión, semejando una goma o banda elástica estirada en el interior del tallo (4). Cuando se produce un corte, esta columna de agua se interrumpe y debido a que está sometida a tensión retrocede hacia el interior del tallo de la misma manera que lo haría un elástico cortado (5). Debido a que el tallo se coloca en la cámara de presión con la superficie cortada hacia afuera, al aumentar la presión en el interior de la cámara, la columna de agua es empujada hacia la superficie cortada (6). La mínima presión requerida para lograr exudación es equivalente, por lo tanto, a la tensión de la columna de agua.

Si para producir la exudación se necesitara aplicar poca presión (ej. 3 bares), esto indicaría un potencial agua alto (de -3 bares). Por el contrario, si se necesitaran aplicar, por ejemplo, 20 bares, el potencial agua es bajo (-20 bares) y significa que la planta no tiene suficiente agua y ciertos procesos fisiológicos como la fotosíntesis pueden estar disminuidos. La amplia adopción de esta técnica para la medición del potencial agua se debe a la facilidad de su uso, a su rapidez y confiabilidad, y al hecho de que no requiere control de la temperatura. Existen distintos diseños que permiten su uso con pecíolos cilíndricos u hojas planas, e incluso ambos tipos de cierre pueden ser intercambiados.

El potencial mátrico del apoplasto sería similar al potencial agua de las células de la hoja, siempre que el potencial osmótico del agua apoplástica esté cerca de cero y el sistema se encuentre en equilibrio. Los valores de potencial osmótico del agua apoplástica son usualmente mayores de -0,1 MPa y a menudo superiores a -0,02 MPa en glicófitas, pero pueden ser más bajos en halófitas.

Si la planta está transpirando puede ocurrir que los potenciales agua apoplástico (agua que circula por fuera de la membrana plasmática) y simplástico (intracelular) no se encuentren en equilibrio, especialmente si hay resistencia al flujo entre ambos compartimientos. Pero, aunque así fuera, se ha demostrado que ambos se equilibran en el período que transcurre entre el corte de la hoja y la medición en la cámara. Por ello, la estimación del potencial agua con la bomba de presión constituye una medida bastante precisa del potencial agua de las células foliares, hecho que se comprueba al compararla con otras técnicas como por ejemplo psicrometría a termocupla. Existen una serie de precauciones a tener en cuenta si se desean obtener resultados confiables con la bomba de presión:

- a) Cubrir la hoja con una bolsa de nylon previo a su corte, para evitar la pérdida de agua por transpiración desde la superficie foliar que llevaría a subestimar el valor del potencial agua foliar.
- b) Presurizar con aire humedecido o tapizar el interior de la cámara con papel humedecido para prevenir la pérdida de agua.
- c) Realizar un corte limpio de un solo trazo sobre el pecíolo.
- d) Para evitar errores por exclusión, sólo la mínima porción de la hoja debe sobresalir de la cámara. Esto es particularmente importante en hojas pequeñas de hierbas y coníferas.
- e) El aumento de presión en la cámara debe ser lento ya que la presurización rápida conduce a errores en la medición.
- f) Se deben evitar pérdidas de gas de la cámara, particularmente si la hoja no está cubierta por una vaina plástica.

### 3) Psicrómetros a termocupla

Se basan en un intercambio de vapor. El tejido se ubica en una pequeña cámara cerrada, donde además se encuentra la termocupla sensora del aparato, formada por la unión de dos alambres de diferente composición. Luego de un cierto tiempo la presión de vapor de la atmósfera que rodea al tejido se equilibra con el potencial agua del mismo. La relación entre la presión de vapor y el potencial agua está dada por la siguiente ecuación derivada de la ley de Raoult:

$$\Psi = -(R \cdot T / V_1) \ln P_0/P = (R \cdot T / V_1) \ln (HR\%/100)$$

con R: cte. gral. de los gases ( $0.08205 \text{ atm l.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )

T: temp. absoluta (K)

P<sub>0</sub>: presión de vapor del agua pura a esa temperatura

P: presión de vapor en la cámara

V<sub>1</sub>: volumen molar del agua ( $0.018 \text{ l.atm}^{-1}$ ).

La relación  $100 P/P_0$  es igual a la humedad relativa (HR). Usando valores numéricos para R y V, y en forma logarítmica, se llega a:

$$\Psi = -10.6 T \log_{10} (100/HR)$$

La ecuación muestra que la presión de vapor es un indicador sensible del potencial agua, siendo posible también medir la mayoría de los otros componentes del  $\Psi$  a partir de la presión de vapor.

El método debe ser capaz de detectar cambios muy pequeños en la presión de vapor ya que la presión de vapor relativa  $P/P_0$  ( $HR\%/100$ ) del agua del suelo o de los tejidos vegetales (0 a -75 bares) se encuentra muy cercana a la presión de vapor saturado (de 95 a 100 %). Un potencial agua de -2,0 MPa representa una humedad relativa de 98,5 %, o una depresión del bulbo húmedo de aproximadamente 0,25 C. Por ello, se requiere un control muy estricto de la temperatura y se deben poder medir diferencias del orden de 0,01 C si se desea lograr una exactitud de 0,01 MPa. Spanner (1951) demostró que podían efectuarse mediciones sumamente sensibles de la presión relativa de vapor de agua en este rango estrecho de interés, mediante pequeñas termocuplas sensibles. Esto llevó al desarrollo de los **psicrómetros a termocupla** para lograr medidas de  $\Psi$ . Este método tiene gran sensibilidad y precisión. El psicrómetro de Spanner es una pequeña termocupla sellada en una cámara pequeña u otro receptáculo. La

termocupla generalmente es de cromel (Ni 90%/Cr 10%) y constantan (Cu 60%/Ni 40%), y está formada por la unión (a manera de esferilla) de estos dos alambres (Figura). Los alambres de la termocupla están unidos a su vez a alambres de Cu que están conectados a un galvanómetro o un microvoltímetro. En los modelos de laboratorio, la termocupla se suspende directamente sobre el suelo o la muestra foliar, todo lo cual va en una cámara sellada a temperatura constante. Bajo condiciones isotérmicas, la presión de vapor de la atmósfera encima de la muestra y alrededor de la termocupla, entrará en equilibrio con el potencial agua de la muestra, usualmente en un período corto (una pocas horas). (Figura 6).

Después de lograr el equilibrio térmico y gaseoso, se puede determinar el potencial agua de la muestra. Para ello, se hace pasar una pequeña corriente eléctrica a través de la unión por un tiempo corto (hasta 15 segundos, dependiendo del potencial agua de la muestra) y en una dirección. Como resultado del pasaje de corriente se produce un enfriamiento de la unión sensora (Efecto Peltier) por debajo del punto de rocío de la atmósfera, y una pequeña cantidad de agua se condensa sobre dicha unión.

Luego del enfriamiento, se detiene inmediatamente la corriente, permitiéndose la evaporación del agua a la atmósfera de la cámara. La velocidad de evaporación es una función de la presión de vapor en la cámara y por ello, del  $\Psi$  de la muestra en equilibrio. La evaporación enfría la unión en función inversa a la presión de vapor. La diferencia de la temperatura entre la unión sensora y la unión de referencia causa una pequeña salida de voltaje de la termocupla.

Una termocupla opera sobre el principio del efecto termoeléctrico (Efecto Seebeck): cuando un circuito consiste en dos metales diferentes y las dos uniones entre los alambres están a diferentes temperaturas, una corriente fluye por el sistema. Este efecto es opuesto al Peltier. La magnitud de este voltaje de salida es también una función del potencial agua de la muestra y se registra con un microvoltímetro o galvanómetro.

## **METODOS PARA LA DETERMINACION DEL POTENCIAL OSMOTICO**

### **1) Método plasmolítico**

Si el jugo celular de un tejido vegetal está en equilibrio osmótico con una solución externa y dentro del tejido no existe presión o tensión, el potencial osmótico del jugo vegetal resulta igual al potencial osmótico de esa solución externa. El problema que se presenta en este tipo de mediciones es obtener un valor de presión nulo (cero) en el tejido. Con esta finalidad se ha diseñado el método de medición de potencial osmótico mediante la observación de plasmólisis incipiente.

Se colocan muestras de tejido en una serie de soluciones de glucosa (o manitol), de  $\pi$  conocidos (a partir de sus concentraciones molales). Luego de transcurrido el tiempo necesario para lograr el equilibrio (30 min a una hora) cada muestra se examina bajo microscopio. (Figura 7).

Los fisiólogos vegetales asumen que el tejido se halla en plasmólisis incipiente cuando la mitad de las células han comenzado a plasmolizarse (esto es, los protoplastos han comenzado a separarse de las paredes celulares, Figura). Este estado implica una presión interna igual a cero (presión de turgencia cero) y por lo tanto la equivalencia entre el  $\pi$  de la solución y el  $\pi$  del tejido.

### **2) Psicrometría a termocupla**

La práctica consiste en congelar la muestra de tejido cuyo potencial osmótico se desea determinar, en nitrógeno líquido o hielo seco para lograr la ruptura total de las membranas celulares. Así se elimina el componente de turgencia del  $\Psi_{\text{celular}}$ . Posteriormente, las muestras se descongelan durante 30 minutos en una habitación a 25 C. Luego se procede a la extracción de la savia celular por medio de una microprensa o ultracentrífuga. Con una alícuota de savia se humedece un disco de papel de filtro especial. Este disco se coloca en la cámara de medición de

un psicrómetro a termocupla y se mide el potencial osmótico (único componente del potencial agua de la savia).

### **DETERMINACION DEL POTENCIAL DE PRESION (P)**

Las medidas directas de la presión de turgencia en células vegetales resultan algo dificultosas. Generalmente esta presión se calcula a partir de determinaciones previas de potencial agua y potencial osmótico:

$$P = \Psi - \pi$$

### **DETERMINACION DEL CONTENIDO DE AGUA**

El contenido de agua en las plantas se determina pesando el material vegetal inmediatamente después de cortado (peso fresco) y posteriormente se seca en estufa de la muestra a 85 C por 48 hs para obtener el peso seco. El tiempo adecuado de secado se determina registrando el momento en que dos pesadas consecutivas resultan equivalentes. El contenido de agua (CA) se puede obtener en base al peso fresco (PF):

$$CA = [(PF - PS)/PF] \cdot 100$$

O en base al peso seco (PS):

$$CA = [(PF - PS)/PS] \cdot 100$$

Sin embargo, como el peso seco puede cambiar diaria o estacionalmente las comparaciones del contenido de agua en base a peso seco son poco satisfactorias. Cuando el contenido de agua se expresa en base al peso fresco, además de los problemas relacionados con el peso seco, se agrega el hecho de que este parámetro tiende a minimizar los cambios en el contenido de agua por referirse a un valor numéricamente mayor. Una alternativa que soluciona los problemas mencionados es expresar el contenido de agua en base al contenido de agua a máxima turgencia, esto es al peso turgente (PT). Este índice se denomina contenido relativo de agua (CRA) o déficit de saturación de agua (DSA) de acuerdo a como se exprese:

$$CRA = [(PF - PS)/(PT - PS)] \cdot 100$$

$$DSA = [(PT - PF)/(PT - PS)] \cdot 100 \quad \text{con DSA} = 100 - CRA$$

### **TRABAJO PRACTICO N° 8: OBSERVACION DEL DESARROLLO DE PRESION DE TURGENCIA PRODUCIDA POR OSMOSIS**

**Materiales:** papel de celofán para diálisis  
solución de sacarosa 1 M  
vaso de precipitado de 500 ml.  
hilo  
varilla de vidrio  
probetas

#### **Procedimiento:**

- Utilizando papel de celofán para diálisis construir una bolsita y llenarla con solución de sacarosa 1M. Cerrar, atar firmemente y sumergirla en un vaso de precipitado con agua destilada.
- Comprobar a intervalos regulares y durante un lapso de tres horas, los cambios de presión dentro de la bolsita (en forma aproximada observar y comparar el diámetro de la bolsa con el diámetro del vaso de precipitado). Cuanto mayor sea la presión dentro de la bolsita, menos tenderá ésta a aplastarse cuando se la retira del agua.

**Informe:**

Escribir en forma breve sus observaciones durante el experimento, haciendo referencia a los siguientes puntos:

- fenómeno que produce la entrada de agua
- presión de pared
- presión de turgencia

---

**TRABAJO PRACTICO N°9. DETERMINACION DEL POTENCIAL OSMOTICO CELULAR POR EL METODO PLASMOLITICO**

**Materiales:** bisturí

4 cajas de Petri

porta y cubreobjetos

microscopio

solución de sacarosa de concentración: 0.10; 0.20; 0.25; 0.30; 0.35; 0.40 M.

*Rhoeo discolor* o *Zebrina pendula* (especies que contienen antocianinas en las vacuolas de la epidermis inferior y facilitan la observación plasmolítica)

**Procedimiento:**

- Con ayuda de un bisturí u hoja de afeitar, retirar cuidadosamente bandas de epidermis pequeñas y muy finas del trozo de hoja de *Rhoeo* o *Zebrina* que entregará el ayudante, tratando de que no contengan mesófilo.
- Colocar el tejido epidérmico obtenido en cada caja de Petri previamente rotulada, con la superficie externa hacia arriba. Esperar 80 minutos.
- Transcurridos ese tiempo desde la inmersión de cada trozo, examinar cada uno bajo el microscopio y observar el grado de plasmólisis de las células. La preparación sobre el portaobjetos debe realizarse en la misma solución donde se encontraba el trozo de epidermis. Examinar en cada caso 25 células registrando en forma de tabla el número de células plasmolizadas y no plasmolizadas.

**Informe:**

Presentar una tabla que contenga la siguiente información: concentración molar de la solución, potencial osmótico de la solución, número de células plasmolizadas y % de células plasmolizadas.

Construir un gráfico con el potencial osmótico de la solución en abscisas y % de células plasmolizadas en ordenadas. Calcular mediante este gráfico el potencial osmótico para el cual el 50% de las células del tejido de *Rhoeo* están plasmolizadas.

---

**TRABAJO PRACTICO N° 10: DETERMINACION DEL CONTENIDO RELATIVO DE AGUA**

**Materiales:** plantas con y sin riego.

navaja u hoja de afeitar

balanza analítica

estufa de secado

tubos de ensayo

sobres de papel

papel absorbente

**Procedimiento:**

- Cortar una hoja y pesarla rápidamente (PF).
- Colocar la hoja en un tubo de ensayo con agua destilada, de manera que el extremo cortado quede bien sumergido. Tapar el tubo.
- Mantener el tubo tapado y en oscuridad a 4 C por 24 hs.

- Extraer la hoja del tubo, secándola cuidadosamente con papel absorbente y pesarla (PT).
- Colocar la hoja en un sobre y llevar a estufa de secado por 48 hs a 85 C.

**Precauciones:**

- Antes de tomar la muestra se debe eliminar el rocío de las hojas si existiera.
- Para realizar el corte se debe utilizar un instrumento limpio y filoso para minimizar errores por infiltración de agua.
- Los tubos con muestra deben mantenerse tapados en una habitación con temperatura constante ya que la temperatura y la humedad afectan la medición.
- Se debe secar la superficie de las hojas con papel de filtro ejerciendo una presión suave y homogénea sobre ellas de manera de lograr la eliminación total del agua superficial sin forzar la salida de agua. Estas condiciones deben determinarse por prueba y error para cada especie. El secado debe hacerse lo más rápidamente posible para evitar la pérdida de agua.

**Informe:**

Calcular el contenido relativo de agua de las hojas provenientes de ambos tratamientos. Sacar conclusiones y relacionar los valores obtenidos con los de potencial agua registrados con la bomba de presión para los mismos tratamientos.

Figura 4 – Método de Chardakov.

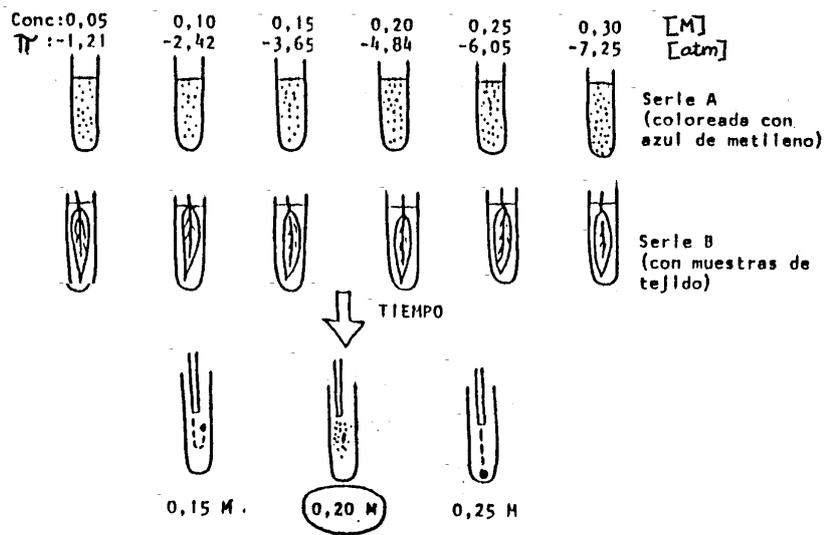


Figura 5. Bomba de presión

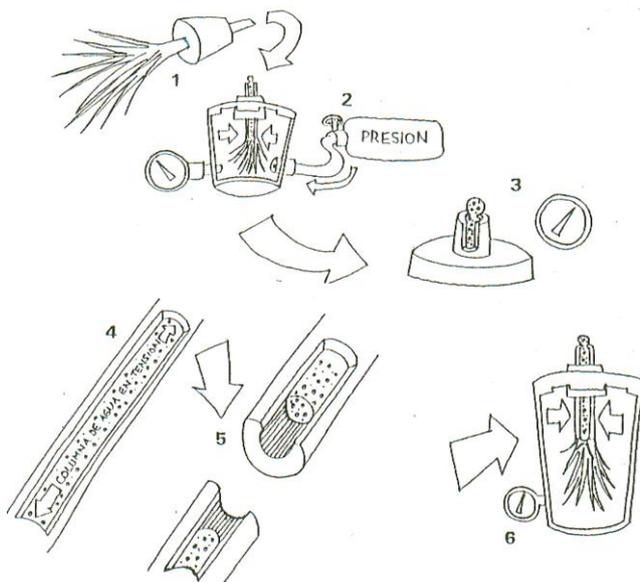


Figura 6. Psicrómetro a termocupla

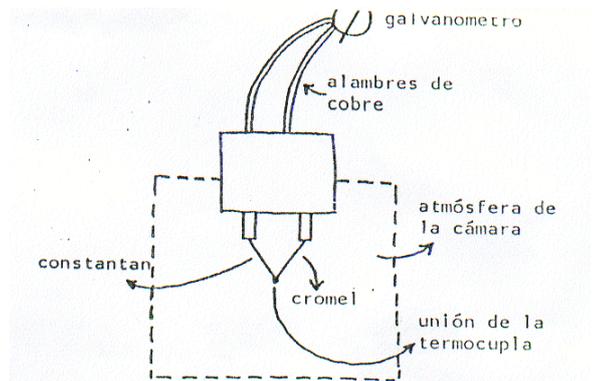
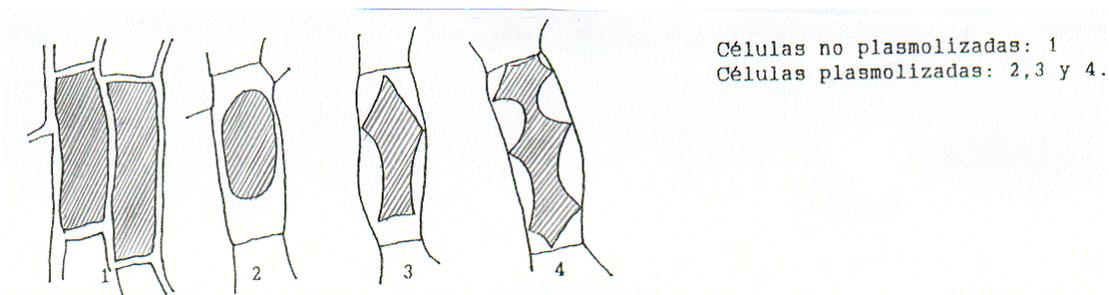


Figura 7. Método plasmolítico.



## MOVIMIENTO DEL AGUA EN LA PLANTA:

### TRANSPORTE Y TRANSPIRACION

#### Tejidos de conducción

En las plantas vasculares los tejidos de conducción son el **xilema** y el **floema**. Ambos integran un sistema muy eficiente para que los líquidos puedan fluir con cierta rapidez, y resultan estructuralmente complejos dada la diversidad de células que los integran: conductoras propiamente dichas, parenquimáticas y de sostén.

El **xilema** está formado por diversas clases de células que han perdido su contenido vivo al alcanzar la madurez. Antes de la muerte celular se depositan en sus paredes engrosamientos de distinta formas que se lignifican fuertemente. Se reconocen distintos tipos de células conductoras: las traqueidas, las fibro-traqueidas, los vasos o tráqueas. Los vasos se comunican entre si por puntuaciones areoladas. (Figura 8).

#### *Elementos del xilema*

- A: traqueidas
- B: tráquea o vaso
- C: placas perforadas compuestas
- D: placa perforada simple
- E: elementos vasales largos
- F: fibrotraqueidas
- G: fibra xilemática

El **floema** es el tejido conductor de la savia elaborada y está formado por células vivas muy modificadas. Se divide al floema en axial y radial. El sistema axial está formado principalmente por las unidades conductoras (células cribosas y elementos del tubo criboso) y de sostén (fibras y esclereidas), además del sistema parenquimático que cumple funciones de almacenamiento y transporte de sustancias. El sistema radial está formado por células parenquimáticas (radios floemáticos) y se observa cuando hay crecimiento secundario. (Figura 9).

#### *Elementos del floema:*

- A: células cribosas
- B: elementos de conducción

#### Camino del agua

Generalmente se asume que la mayor parte del agua que fluye a través de la planta atraviesa en estado líquido la corteza de la raíz siguiendo la **vía apoplasto** (desde la membrana celular hacia afuera) o **simplasto** (desde la membrana hacia adentro).

Luego pasa a través del citoplasma de las células de la **endodermis** (vía simplasto obligada debido a la presencia de las bandas de Caspary en las paredes celulares) hacia la estela, sube por el xilema (apoplasto) hacia las hojas, se mueve a lo largo de las paredes celulares (apoplasto) hacia los sitios de absorción o evaporación y sale finalmente como vapor a través de los poros estomáticos. El camino completo del agua, desde el suelo a la atmósfera se ha denominado "**continuo suelo-planta-atmósfera**" (CSPA). Las plantas están en el medio CSPA y resultan afectadas tanto por condiciones del suelo como de la atmósfera.

Figura 10: Camino del agua y movimiento iónico en tejidos radicales. Se muestran dos caminos alternativos. Los iones y el agua se mueven en forma similar pero los iones pueden atravesar la membrana plasmática por medio de mecanismos de transporte.

- 1: membrana plasmática.
- 2: protoplasma.
- 3: plasmodesmos.
- 4: pared celular.
- 5: espacio intercelular.

### Absorción de agua por la raíz

Los distintos autores reconocen cuatro procesos para explicar la entrada de agua a la raíz:

- 1- la imbibición
- 2- la ósmosis
- 3- la acción metabólica
- 4- la tensión transpiratoria

La **imbibición** se explica desde el punto de vista que el protoplasma es un coloide muy hidrofílico, pero sin embargo no satisface totalmente la explicación ya que en algún momento se satura.

La **ósmosis** es el fenómeno de entrada de agua, como respuesta a un déficit de presión de difusión que crea un gradiente favorable para el ingreso de agua, pero este fenómeno tampoco explica totalmente la gran cantidad de agua que penetra en la planta.

La **absorción metabólica o absorción activa** de agua no supera el 5% del total del agua que se absorbe, y su ocurrencia ha sido muy discutida ya que necesita gasto de energía metabólica.

La **tensión transpiratoria** es realmente una fuerza de ascenso del agua en la planta. La teoría que explica el ascenso se llama **teoría coheso-tenso-transpiratoria**, y se fundamenta en las características propias de un solvente muy *sui generis* como el agua, que al formar un dipolo tiene una enorme fuerza de cohesión, sumado a los puentes de hidrógeno, lo que provoca que al transpirarse agua desde la superficie foliar se "tire" o "tensione" la columna continua de agua que corre por los vasos xilemáticos, provocando una corriente de entrada de agua hacia la raíz.

Cabe destacar que si bien alguna teoría se ajusta más a la realidad, las otras no son totalmente descartables ya que probablemente expliquen parcialmente algunos puntos que la teoría coheso-tenso-transpiratoria no aclara tan profundamente.

### Transporte del agua en la planta

Esencialmente el movimiento del agua en la planta es ascendente, salvo casos excepcionales.

Tres teorías explican el movimiento del agua en la planta:

- a- la presión radical
- b- la imbibición y la capilaridad
- c- la tensión y cohesión.

El valor máximo que puede adoptar la presión radical es de 2 atm, valor insuficiente para explicar el ascenso de agua en todas las especies. Este fenómeno ocurre siempre que la planta no esté transpirando, ya que en ese caso el agua del xilema estaría bajo tensión y no bajo presión.

Aparentemente este proceso es el resultado del bombeo activo de iones hacia el xilema desde la endodermis, con el consecuente ingreso de agua por ósmosis, lo que sólo alcanza para explicar el ingreso del agua hasta el xilema pero no el ascenso.

La imbibición y la capilaridad tampoco aclaran la totalidad del problema del ascenso y transporte del agua, ya que si bien en el xilema se observan fenómenos de adsorción, características de los coloides, no son fuerzas suficientes para mover el agua hasta las hojas de plantas de cierta altura.

Nuevamente la teoría coheso-tenso-transpiratoria es la más acertada al explicar el movimiento de ascenso del agua, juntamente con su ingreso.

## Transpiración

La transpiración es la evaporación de agua desde la superficie de la planta, siendo las hojas las mayores superficies evaporantes expuestas a la atmósfera. Ciertos estudios determinaron que para producir 1 kg de materia seca, deben transpirarse unos 225 kg de agua. Esta excesiva pérdida de agua ocurre porque el CO<sub>2</sub>, necesario para el proceso de fotosíntesis, se encuentra muy diluido en la atmósfera (0.03% en volumen) y los lugares por donde éste ingresa a la planta son los mismos por los cuales se pierde el agua desde la hoja, los estomas. Resultado de esto último, es el gran compromiso con el que se enfrenta una planta: obtener la mayor cantidad de CO<sub>2</sub> de la atmósfera con la menor pérdida de agua posible, ya que la necesita para mantener turgentes a las células y proveer el medio en el cual el CO<sub>2</sub> es fotosintéticamente incorporado en moléculas orgánicas.

### *La epidermis foliar:*

La epidermis es una capa o estrato simple de células que recubre enteramente la superficie foliar. Protege al tejido de la desecación y de los daños mecánicos. Está formada por varios tipos de células como las células epidérmicas tabulares típicas (no fotosintéticas), los pelos o tricomas y las células oclusivas de los estomas o células guardianas (fotosintéticas).

Las células guardianas son arriñonadas y generalmente aparecen de a pares, separadas por una abertura o poro. Al complejo formado por las células guardianas y el poro se lo denomina estoma. A menudo se aplica el término aparato estomático incluyendo también las células adyacentes llamadas células accesorias ó subsidiarias. (Figura 11)

El tamaño y la forma de los estomas varía con las diferentes especies y aún dentro de una misma planta. La densidad estomática o número de estomas por unidad de área, varía también con la especie, las condiciones ambientales y suele ser diferente entre las caras abaxial y adaxial de una hoja (generalmente mayor en la abaxial). Una hoja típica puede tener a lo sumo 6 millones de estomas representando un pequeño porcentaje de la superficie (aproximadamente 1%). Los estomas, salvo en plantas acuáticas sumergidas, son una característica del reino vegetal, presentes tanto en angiospermas como gimnospermas. No sólo pueden aparecer en las hojas sino también en tallos, pétalos, estambres y pistilos.

La velocidad de la transpiración está relacionada con el grado de apertura estomática y con su ubicación y frecuencia. Si bien los estomas ocupan una superficie tan pequeña, *la difusión de agua a través de ellos resulta proporcional al perímetro y no al área de apertura*. Cuando los estomas están cerrados la transpiración disminuye totalmente ya que más del 90% del agua transpirada pasa por los estomas. La causa de ello es que la superficie de la hoja está cubierta por una **cutícula** de sustancias cerosas, muy impermeable al agua, que reduce mucho la evaporación desde la epidermis por otros sitios que no sean los estomas. Los estomas son las únicas aberturas o discontinuidades de la epidermis. A través de ellos se produce el intercambio gaseoso que hace posible la respiración, la fotosíntesis y la transpiración. Probablemente, de estas tres funciones, la más involucrada en el control estomático sea la última.

### **Fisiología y regulación estomática:**

Internamente, por debajo de las células oclusivas se encuentra la cámara subestomática que generalmente está saturada de vapor de agua. Al abrirse el estoma el agua se evapora inmediatamente.

Desde el punto de vista fisiológico las células guardianas cumplen un rol complejo ya que conservan la capacidad fotosintética y por sus características anatómicas, pueden abrir y cerrar el poro como consecuencia de cambios de turgencia. Al aumentar la turgencia celular el poro se abre y al disminuirla, se cierra. Pero, ¿cuáles son los factores que provocan tales variaciones de la turgencia celular? Los estomas funcionan así por una característica especial de la anatomía submicroscópica de sus paredes celulares. Las microfibrillas de celulosa que forman esta pared está organizada alrededor de la circunferencia de las células guardianas en forma de anillo y radiadas desde un punto en el centro del estoma. Este arreglo se llama: **micelación radial**.

Como resultado, cuando una célula guardiana se expande porque ingresa agua, no puede aumentar mucho su diámetro (las microfibrillas no pueden estirarse) pero sí pueden aumentar su longitud. Como las células guardianas están unidas entre sí por los extremos, al alargarse se curvan ligeramente dejando una abertura en la parte central: el **poro estomático**. (Figura 12).

Básicamente la turgencia está controlada por el aumento o la remoción de solutos, esto es, un control osmótico. Cuando aumenta la concentración de solutos, el  $\pi$  disminuye y se induce por difusión la entrada de agua a las células guardianas desde las células adyacentes o anexas con el concomitante aumento de la presión de turgencia. El camino inverso ocurre al ser removidos los solutos desde las células oclusivas.

Una bomba o canales de potasio ubicados en la membrana plasmática son los responsables de la intrusión o extrusión de los iones  $K^+$ . Este movimiento iónico es la parte más importante en la regulación del movimiento estomático. En asociación a los canales existe una bomba aniónica (de  $Cl^-$  o ácidos orgánicos).

Los solutos orgánicos no deben ser descartados en este proceso ya que en algunos casos el almidón puede ser parcialmente convertido en azúcares libres, con el consecuente efecto osmótico: disminuir el potencial agua y provocar así la apertura del estoma.

Actualmente se sabe que el movimiento del potasio y la degradación del almidón no son dos factores independientes que provocan el mismo efecto como el disminuir el potencial agua, sino que junto con el aumento de la concentración de potasio habría una degradación de almidón de los cloroplastos de las células guardianas, e inversamente, al excluirse el ión el almidón reaparecería. La antigua teoría del aumento de la presión de turgencia por degradación del almidón fue reemplazada por el concepto de que el almidón provee los aniones orgánicos necesarios desde el punto de vista energético con los que está asociada la entrada de  $K^+$ . Otro factor que contribuye es la pérdida de agua por transpiración, ya que cuando la hoja pierde agua la turgencia se reduce y esto conduciría al cierre estomático. Este mecanismo previene una excesiva pérdida de agua desde la superficie foliar.

### **Efecto de los factores ambientales sobre la regulación estomática:**

Hasta aquí se han mencionado solamente los factores internos que juegan roles en el control del complejo estomático, pero existen además factores ambientales que actúan sobre estos mecanismos.

Así por ejemplo una elevada concentración de  $CO_2$  en la hoja provoca el cierre y la incidencia de luz, la apertura del estoma. Estos dos factores interaccionan de modo tal que el estoma se abre en presencia de luz fotosintéticamente activa o cuando la concentración interna de  $CO_2$  ha bajado a un punto crítico para la fotosíntesis (con la excepción de plantas suculentas de las regiones áridas que abren sus estomas exclusivamente por la noche).

El aumento de temperatura de la hoja promueve considerablemente la evaporación pero puede provocar eventualmente el cierre de los estomas. Al amanecer, los estomas se abren en respuesta al aumento de la intensidad luminosa, y la luz aumenta la temperatura de la hoja. El aumento de temperatura significa que el aire puede retener más humedad y entonces se promueve la evaporación.

El viento aporta  $CO_2$  y retira el vapor de agua de las capas cercanas a la superficie foliar causando un aumento en la evaporación y en la absorción de  $CO_2$ . Pero si el sol entibia la hoja por encima de la temperatura del aire, el efecto del viento será disminuir la temperatura de la hoja reduciendo la transpiración.

Cuando la humedad del suelo se torna limitante, los estomas se cierran y la transpiración así como la absorción de  $CO_2$  resultan inhibidas.

El factor ambiental que mayor incidencia puede tener sobre la velocidad de transpiración es el contenido de humedad del aire. La humedad relativa y en especial su inversa, el déficit de saturación, es la principal fuerza motriz que promueve la pérdida de agua desde la hoja.

### Medición de la transpiración:

La mayoría de las técnicas para determinar la magnitud de la transpiración son mediciones indirectas de la misma y por lo tanto han recibido críticas.

Pueden obtenerse medidas de transpiración a campo utilizando una carpa de plástico transparente ubicada sobre un grupo de plantas. Se miden la temperatura, la humedad y los niveles de CO<sub>2</sub> en el aire que entra y sale. Con estos datos pueden calcularse los niveles de transpiración y fotosíntesis. En condiciones más controladas puede determinarse la transpiración por cambio de peso de la planta entera o de ramas u hojas o porciones de hojas (discos) por medición del vapor de agua transpirado y por medición de la apertura estomática.

Dentro de los métodos de cambio de peso de la planta se encuentra el conocido como método del lisímetro, que consiste en pesar periódicamente, en balanza sensitiva, una planta en maceta (con el suelo sellado para evitar pérdidas de agua desde el mismo). Considerando que la cantidad de agua utilizada en el crecimiento es menor del 1% del peso seco final (recordar los 225 kg de agua por kg de materia seca) se asume que todo cambio en peso en el intervalo de tiempo considerado se debe a la transpiración. La duda reside en si una planta en maceta con sus raíces confinadas es representativa del resto de las plantas de su misma especie, creciendo a campo. Para minimizar posibles diferencias, existen lisímetros de campo que consisten en grandes recipientes (de varios m<sup>3</sup>) llenos de tierra y enterrados en medio del cultivo, con un sistema de balanza. Estos últimos miden la evaporación del suelo combinada con la transpiración de las plantas (evapotranspiración).

También es posible deducir indirectamente la cantidad de agua transpirada por las hojas midiendo la apertura estomática por medio de improntas o infiltración de líquidos de diferente viscosidad en la hoja. Este método no da un valor comparable entre especies y sus resultados en general no son extrapolables. Se lo puede considerar como un indicador del estado hídrico debido a que si los estomas están abiertos el balance hídrico de las hojas puede considerarse favorable.

Actualmente se usan instrumentos electrónicos portátiles, más precisos y sencillos. Uno de ellos es el porómetro de difusión con el que se determina la tasa de pérdida de vapor de agua en una hoja o en parte de ella, encerrada dentro de la cámara del porómetro. Esto es un indicador de la resistencia que ofrece la epidermis (cutícula más estomas) a la difusión de un gas, en este caso al vapor de agua. El instrumento tiene un medidor portátil de resistencia eléctrica y un sensor de humedad cuya resistencia varía con el grado de humedad. Una mayor apertura estomática disminuye la resistencia. Se calcula así la *resistencia estomática* (y su inversa, la *conductancia*), conociendo la temperatura del aire y de la hoja (medida también por este instrumento).

### TRANSPORTE DE SUSTANCIAS

La clásica concepción de que el agua y las sales minerales se mueven por el xilema y la savia elaborada por el floema ya no puede ser sostenida en vistas de los experimentos con radioisótopos. Además el movimiento de agua y sales puede ser descendente y hay cierto movimiento ascendente en el floema. Por esto, es más conveniente dividir el transporte de nutrientes por la calidad del mismo, en inorgánico u orgánico, y no por el tipo de tejido por donde se transporta.

Una vez que los iones inorgánicos son absorbidos por la raíz y llegan al xilema, se mueven principalmente en forma ascendente por la fuerza de la corriente transpiratoria.

Los iones no siempre son transportados de la misma forma que se absorben, ya que pueden ser metabolizados en la raíz, como ocurre con los nitratos.

Los nutrientes pueden pasar desde el xilema a las células adyacentes junto con el agua, que se mueve lateralmente por presiones osmóticas, y nutren al parénquima de la corteza y médula del tallo. Sin embargo, la redistribución interna de los iones se hace por el floema, lo que se ha probado con fósforo marcado.

Las sustancias elaboradas se transportan básicamente por el floema y su transporte está gobernado por la teoría fuente-destino. Las fuentes son órganos maduros (generalmente las hojas) con la capacidad de exportar sustancias orgánicas, y los destinos son aquellos órganos que poseen una gran demanda de estas sustancias (tejidos inmaduros, frutos, órganos de reserva).

El movimiento de compuestos orgánicos puede ser ascendente o descendente, e incluso pueden coexistir en ambas direcciones. De las sustancias transportadas unos nueve décimos son azúcares, principalmente sacarosa, y raramente glucosa. También se transportan compuestos nitrogenados orgánicos: aminoácidos y aminos.

El transporte de sustancias elaboradas no está del todo explicado, y la teoría más aceptada es la de Münch o de flujo masal, luego modificada por Crafts.

Según esta teoría, el agua entra por la raíz, asciende por el xilema y llega a las hojas donde parte del agua se pierde por transpiración. Otra parte iría pasando por células con concentraciones osmóticas gradualmente menores, arrastrando azúcares allí elaborados y penetraría al floema por presión sobre las paredes. Se formaría así una corriente de agua con azúcares disueltos a lo largo del floema, en dirección descendente, parte de la cual se transportaría lateralmente para nutrir el parénquima del tallo.

---

### **TRABAJO PRACTICO N° 11: MEDICION DE TRANSPIRACION USANDO EL METODO DEL LISIMETRO**

**Materiales:** plantas en maceta de *Coleus* con varias hojas  
1 bolsa de plástico  
hilo de algodón  
balanza granataria

**Procedimiento:**

- Saturar el suelo de la maceta con agua y dejar hasta que todo el exceso de agua haya drenado. Colocar la maceta en una bolsa de plástico y atar la bolsa alrededor de la base del tallo. Tener cuidado en no pinchar o romper la bolsa ya que ésta se usa para evitar la evaporación de agua desde el suelo y la maceta.
- Inmediatamente después, pesar la maceta con una aproximación de 0.1 g. Registrar este peso y referirlo como peso original. Las plantas en maceta serán pesadas cada hora desde las 15 hasta las 18 hs de un día y desde las 9 hasta las 16 hs del día siguiente.

**Informe:**

Presentar en una tabla los datos de peso recogidos. Construir un gráfico con tiempo en abscisas y g de agua transpirada por hora en ordenada.

---

### **TRABAJO PRACTICO N° 12: DETERMINACION DE LA RESISTENCIA ESTOMATICA MEDIANTE EL POROMETRO**

**Materiales:** plantas: con y sin riego  
porómetro  
silicagel seco

**Procedimiento:**

Realizar mediciones con el porómetro para ambas caras de la superficie foliar de la anteúltima hoja totalmente expandida del material correspondiente a los diferentes tratamientos.

La medición se efectúa de la siguiente forma:

- 1- Encender el porómetro (ON)

- 2- Ubicar el sensor (broche) sobre la hoja seleccionada, comenzando con la cara abaxial
- 3- Presionar el botón rojo que se encuentra sobre el sensor: aparecerá sobre el monitor el término "*reading cycle*" y comenzará a tomar lecturas de la resistencia estomática. Cuando el aparato realiza dos lecturas consecutivas con un error menor al 1% produce un sonido que nos avisa que podemos tomar ese valor. Anotar el valor obtenido.
- 4- Comenzar nuevamente desde el punto 2 para la cara adaxial y registrar el valor obtenido.
- 5- Repetir desde 2 a 4 en todos los tratamientos.

### Informe

Confeccionar una tabla donde se compare la resistencia estomática de cada tratamiento especificando la cara en la que se efectuó la medición. Redacte las conclusiones en base a los datos obtenidos.

Figura 8. Elementos del xilema.

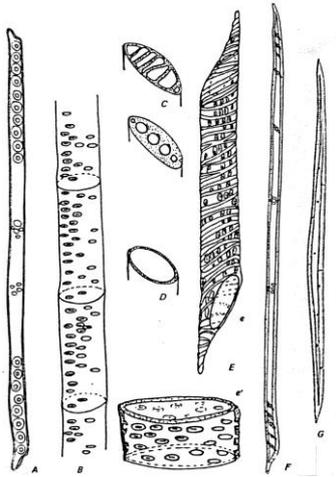


Figura 9. Elementos del floema.

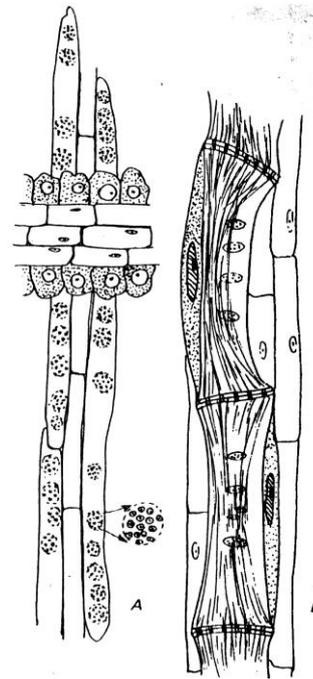


Figura 10. Camino del agua.

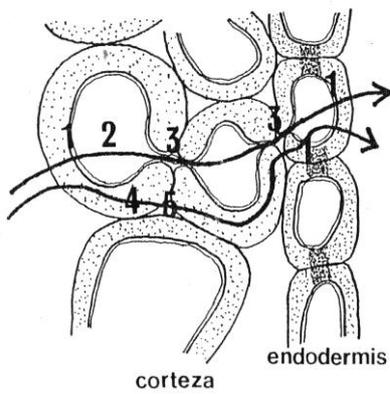


Figura 11. Detalle de un estoma

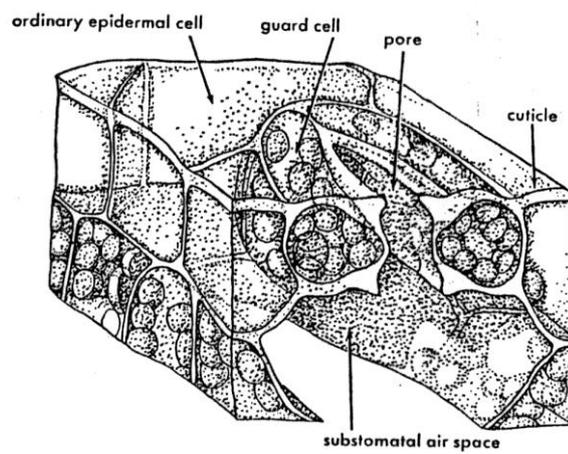
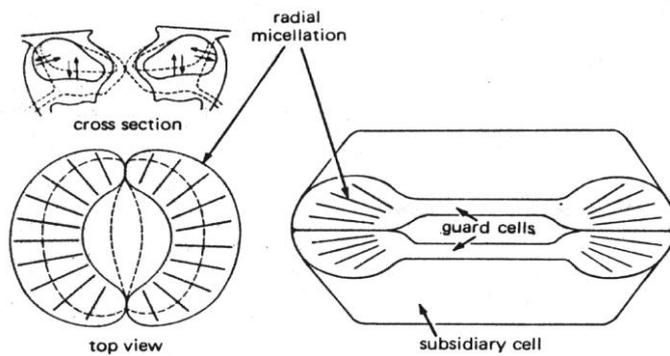
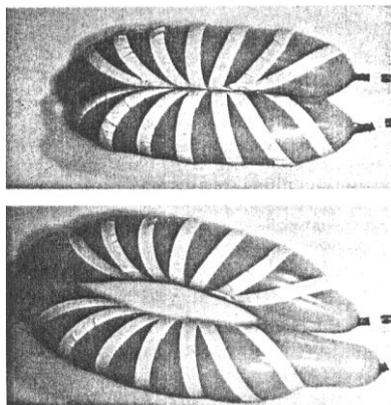


Figura 12. Micelación radial y apertura estomática.



## REGULADORES DE CRECIMIENTO

### Terminología:

Se denomina **hormona** a cualquier sustancia orgánica específica, efectiva a bajas concentraciones, y que es elaborada por las células en una parte del organismo y transportada a otra parte del mismo, donde ejerce su acción produciendo un efecto fisiológico específico.

El comportamiento de ciertas sustancias vegetales parecía ser lo suficientemente similar a las hormonas animales como para justificar el uso del término **hormona vegetal** o **fitohormona**. Numerosos fisiólogos vegetales utilizan la denominación **reguladores de crecimiento** o **fitorregulador** de manera de incluir tanto los compuestos naturales (de origen endógeno), como los sintéticos, que modifican el crecimiento y desarrollo vegetal.

Las hormonas median la comunicación intercelular en las plantas, para ello las células poseen receptores, que son proteínas específicas. El complejo hormona-receptor es la forma activa de una hormona. Todas las hormonas vegetales son de pequeño tamaño, comparadas con las animales (van de 28 a 346 Da, mientras que las animales pueden llegar a 25.000 Da).

Los grupos de sustancias reguladoras del crecimiento se detallan a continuación:

### FITORREGULADORES

Son compuestos químicos capaces de intervenir en el metabolismo vegetal, actuando en pequeñas concentraciones, activando o reprimiendo algún proceso. Pueden ser naturales o sintéticos.

#### 1. NATURALES

1.1 - HORMONAS: fitorregulador natural con acción en un lugar de la planta distinto de donde se produce.

1.1.1 - Conocidas: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico, ácido traumático.

1.1.2 - Probables: florígeno, antesina, (otras).

1.2 - COFACTORES: fitorregulador natural con acción catalítica y regulatoria en el metabolismo, pero cuya acción es insuficiente por sí misma para determinar fenómenos de desarrollo; actúan como coenzimas.

Los más conocidos son: tiamina, ácido nicotínico, piridoxina.

1.3 - INHIBIDORES: fitorregulador natural que reprime algún proceso metabólico, ya sea actuando en forma independiente o bien contrarrestando la acción de una hormona inductora.

Pueden ser:

auxinas	}	dependiendo de la concentración
giberelinas		
citocininas		
ácido abscísico		

ácidos salicílico, benzoicos, gálico y cinámico, lactonas (cumarina), fenoles, piridinas, ácido clorogénico, quinonas y flavonoides.

2 - SINTÉTICOS: fitorregulador con estructura similar a la endógena correspondiente, pero sintetizado artificialmente.

2.1 - Con acción similar a las hormonas: auxinas, giberelinas, citocininas, abscisinas

2.2 - Con acción similar a los inhibidores: Cicocel (CCC), carbamatos, antiauxinas, morfactinas, etc.

#### 1- AUXINAS:

Es el grupo más conocido de fitorreguladores. F.W. Went en 1926 logró extraer de puntas de coleoptiles de avena un compuesto capaz de estimular el crecimiento de plántulas decapitadas. Posteriormente se demostró que si se colocaba un pequeño bloque de agar impregnado con sustancia proveniente del extremo del coleoptile, sobre un costado de la plántula, ésta se curvaba hacia el lado contrario del bloque de agar. Esta curvatura se debe al aumento en la elongación que ocurre directamente debajo del bloque. Went propuso el nombre de auxina (del griego "auxe"=crecer) para esta hormona

inductora de curvatura. Este factor, posteriormente resultó ser el **ácido indol acético** también llamado **AIA** (que si bien no es la única auxina de origen endógeno, es la más conocida).

Subsecuentemente se demostró que un gran número de compuestos sintéticos con variadas estructuras químicas poseían actividad auxínica. Debido a ello, el uso del término auxina fue ampliado de manera de incluir todos los compuestos poseedores de efectos fisiológicos similares a los del AIA. Si bien muchas auxinas sintéticas difieren mucho del AIA, todas poseen una acción similar debido a que a pH neutro tienen un anillo cargado positivamente y una cadena, separada del anillo por una distancia de 5,5 Å, cargada negativamente. Dicha separación de cargas es requisito esencial para la actividad auxínica. La carga negativa, a pH neutral se debe a la pérdida de un H<sup>+</sup> desde el grupo carboxilo, mientras que la carga positiva se localiza en el nitrógeno ubicado en el anillo indólico.

Las antiauxinas son inhibidores sintéticos análogos a las auxinas. Su efecto se basa en inhibir compitiendo con las auxinas por los receptores específicos.

Las auxinas están implicadas en el control de diversas funciones en las plantas, como por ejemplo:

### ***a- Curvaturas trópicas***

Son curvaturas de los órganos vegetales que pueden explicarse sobre la base de concentraciones diferenciales de auxinas en distintas partes. Se define tropismo como el crecimiento diferencial en respuesta a un estímulo unidireccional. Figura 13.

En el fenómeno de fototropismo, la concentración de auxina en el lado no iluminado del tallo, es mayor que la concentración en el lado iluminado. En el tallo, la velocidad de crecimiento es aproximadamente lineal respecto de la concentración de auxina, y por lo tanto, el lado oscuro crece más que el lado iluminado y así se produce la curvatura hacia la luz.

Este tipo de explicación se aplicó por muchos años a la respuesta gravitrópica: cuando una raíz y tallo se colocaban en posición horizontal, la concentración de auxina en la región inferior aumentaba. Se explicaba que este aumento inhibía el crecimiento en raíz y lo estimula en tallo. El resultado es que la raíz crece hacia abajo, y el tallo hacia arriba. Figura 14.

Es importante destacar que las respuestas en crecimiento de varios órganos de las plantas a concentraciones de auxinas no son similares, como se pone de manifiesto en el gráfico de la Figura 15.

Obsérvese que las raíces y los tallos son notablemente diferentes en su sensibilidad a las auxinas. Las concentraciones de auxinas que estimulan el crecimiento del tallo pueden inhibir el alargamiento de la raíz.

### ***b- Dominancia apical***

Si la concentración de auxina excede ciertos niveles, el desarrollo de las yemas puede quedar inhibido. Si se elimina el ápice de una planta, se elimina así la fuente productora de auxinas, y desaparece la dominancia apical, la cual puede ser reimpuesta por aplicación exógena de la hormona. En este fenómeno la auxina producida por la yema terminal o apical difunde hacia la base del tallo promoviendo el alargamiento de las células de éste e inhibiendo, como dijimos, el desarrollo de las yemas axilares de las hojas (que permanecen en estado de latencia). (Figura 16).

Efectos de la auxina sobre la dominancia apical. En A, la yema inferior no es inhibida por estar alejada de la yema apical. En B, eliminando la yema apical desarrollan las axilares. En C, eliminando la yema apical pero suministrando auxina exógena, las yemas axilares no desarrollan, al igual que en A.

### ***c- Abscisión***

Significa la separación de partes u órganos de la planta. Puede tener lugar en hojas, ramas, inflorescencias, flores, pétalos y frutos, y se debe a la formación de una zona de células especializadas en la base de los pecíolos, llamada zona de abscisión. El ejemplo más conocido es la caída de las hojas. En tanto que la producción de auxina por parte de la hoja permanece en un nivel adecuado, la zona de abscisión no se forma. Pero cuando esa producción decae por debajo de un nivel crítico, el cemento intercelular comienza a desaparecer y finalmente las células quedan separadas, permaneciendo sólo

intacto el tejido vascular. Como resultado ocurre la ruptura mecánica del pecíolo bajo el impacto del viento u otra fuerza física. (Figura 17).

Cuando la producción de auxinas disminuye, por envejecimiento del órgano u otra razón, se forma la zona de abscisión. La eliminación de la lámina de la hoja es una forma eficaz de interrumpir el suministro de auxinas. El conocimiento de este fenómeno ha posibilitado el control de la caída de hojas, flores y frutos por medio de pulverizaciones con hormona sintética. En estos casos, la efectividad del tratamiento con un determinado regulador, depende de la especie, de la época de aplicación, de la naturaleza y concentración de la auxina, etc. En algunos casos es importante prevenir la defoliación, pero también tiene importancia agrícola el fenómeno inverso, es decir, el estímulo controlado de la abscisión, mediante prácticas que reducen el nivel auxínico. Por ej.: la cosecha mecánica del algodón se ve facilitada cuando no hay hojas en la planta. Actualmente es una práctica corriente eliminar las hojas usando compuestos que matan la lámina foliar, acelerando así la formación de la zona de abscisión.

#### ***d- Enraizamiento***

El transporte de las auxinas en los tallos es de tipo polar, es decir, desde el ápice hacia la base morfológica. En un tallo cortado, las auxinas se acumulan en la base. Resulta interesante también el hecho de que en muchas especies se forman raíces en los tallos cortados (hecho ampliamente utilizado por los horticultores). Como resultado de estas consideraciones, Went realizó experimentos que demostraron que la aplicación de auxinas en la base de tallos cortados aumentaba la iniciación radicular. La diferenciación de raíces en tallos, hojas y raíces utilizando auxinas ha dado lugar a que se las utilice ampliamente en la propagación de plantas leñosas y herbáceas. A pesar de que las auxinas estimulan la formación de los primordios radiculares, luego inhiben su elongación por lo cual es necesario eliminarlas una vez producida la primera etapa para permitir un desarrollo radicular activo.

No se conoce exactamente como actúan las auxinas en la formación de raíces. Pueden intervenir factores distintos, como los vinculados con la nutrición (en los tejidos caulinares son muy importantes los hidratos de carbono y las sustancias nitrogenadas). Esta sería la razón por la cual el enraizamiento de estacas tratadas con auxinas se ve facilitado por la presencia de hojas, que aportan estos factores nutritivos, además de ser fuentes de auxinas. Desde el punto de vista fisiológico, el proceso de enraizamiento es el resultado de la presencia o ausencia de un conjunto de factores determinantes (hormonas e inhibidores) y de cofactores de variada naturaleza química (vitaminas, aminoácidos, purinas, sales minerales, etc.), que actúan en una determinada relación de concentración. Figura 18.

En la práctica de vivero, muchas especies se propagan vegetativamente por trozos de tallos (estacas), raíces u hojas cortadas de la planta madre con los beneficios de la estabilidad genética y rapidez en la obtención de nuevas plantas. Los tallos de algunas especies, como los sauces, normalmente tienen primordios radiculares preexistentes que desarrollan bajo condiciones favorables. Sin embargo, en otros casos tales primordios no existen pero pueden desarrollarse bajo condiciones de cultivo adecuadas. Las auxinas generalmente reducen el tiempo de enraizamiento a un tercio, produciendo al mismo tiempo un sistema radicular más denso. En otros casos, permiten enraizar estacas de especies que normalmente no lo hacen con facilidad.

Desde el punto de vista de la planta de la que se extraen las estacas, se debe tener en cuenta:

- 1) edad y crecimiento de las ramas que se toman para estaca (herbácea, semileñosa, leñosa)
- 2) estado de desarrollo de la planta madre (en floración muestran la menor capacidad de enraizamiento)
- 3) su ubicación en la rama (topótesis)
- 4) presencia de yemas u hojas
- 5) estado de nutrición de la planta madre
- 6) longitud del día en el momento de obtención de las estacas (fotoperíodo).

Las auxinas más usadas en la práctica son el ácido indol butírico y el ácido  $\alpha$ -naftalén acético. Los preparados comerciales se aplican por medio de vehículos sólidos o líquidos, siendo los más corrientes:

- a) aplicación de polvos impalpables en la base de las estacas.
- b) inmersión de la base de las estacas en soluciones concentradas de auxinas durante períodos cortos.
- c) inmersión en soluciones diluídas durante uno o dos días.

Luego las estacas se plantan en un medio de cultivo adecuado.

#### ***e- Acción herbicida***

Durante la segunda guerra mundial se descubrió que las auxinas, en concentraciones levemente más altas que las usadas para estimular el crecimiento, provocaban la muerte de determinadas especies. Posteriores investigaciones tendieron a determinar los aspectos selectivos de esta acción herbicida de las auxinas. Para comprender mejor la importancia de esta selectividad, recordemos que los productos herbicidas no selectivos (ClNa, boratos, cloratos, arsenicales,  $\text{SO}_4\text{H}_2$ ) matan por contacto y no diferencian entre las especies. Los herbicidas selectivos, son absorbidos por la planta y actúan interfiriendo algún proceso metabólico fundamental, siendo algunas especies sensibles y otras no. Existen cuatro razones fundamentales que justifican el uso de los herbicidas selectivos en reemplazo de los no selectivos:

- 1) La acción herbicida de las auxinas es selectiva. Esto es, afecta sólo a algunas especies. Herbicidas similares al 2,4-D son muy efectivos para matar especies de hoja ancha, pero tienen poco efecto sobre las gramíneas u otras monocotiledóneas. Por ejemplo, el nabo en los campos de cereales.
- 2) El efecto tóxico residual desaparece del suelo en pocas semanas, en tanto que muchos de los viejos herbicidas arsenicales lo inutilizaban durante varios años.
- 3) Las auxinas son económicas por su efectividad a concentraciones relativamente bajas. Estas concentraciones, por supuesto, son varias veces más altas que las usadas para producir efectos no herbicidas. Por ejemplo, sólo unas pocas partes por millón son necesarias para evitar la abscisión de los frutos, mientras que se requieren mil o más partes por millón (alrededor de 1 kg/ha aplicada en pulverización acuosa) para tener una acción herbicida.
- 4) Las concentraciones de auxinas usadas habitualmente no son tóxicas (aparentemente) para los seres humanos y animales.

Para lograr una acción tóxica eficaz, los herbicidas hormonales deben reunir las siguientes condiciones: a) penetrar en la planta sin dificultades, b) ser transportados (o movilizados) y c) ejercer su acción tóxica a nivel de metabolismo celular.

Actualmente se utilizan cientos de herbicidas selectivos, entre los que se cuentan auxinas sintéticas de la serie fenoxi:

- 2,4-D (2,4-dicloro fenoxi acético)
- MCPA (4 cloro metil fenoxi acético)
- 2,4,5-T (2,4,5-tricloro fenoxi acético)

Generalmente su acción se basa en competir con la auxina natural por algún sustrato activo. Interfieren en el metabolismo del ADN y ARN.

Todos estos efectos que hemos enumerado, en que están implicadas las auxinas, dependen en gran medida de las velocidades de producción, almacenaje y degradación de estas hormonas en las plantas.

#### ***f- Extensibilidad de la pared celular:***

Las auxinas no se unen directamente a la pared celular sino que actúan sobre la membrana plasmática provocando el "relajamiento" de la matriz de celulosa que forma la pared para permitir el crecimiento de la célula. El factor que provoca tal relajamiento es una diferencia de pH causado por la extrusión de  $\text{H}^+$ , y este mecanismo se conoce como **teoría del crecimiento ácido**. Aparentemente la auxina estimula la liberación activa de protones, causando un descenso del pH en la zona de la pared celular y activando una enzima que causa extensibilidad de la pared por clivaje de las uniones entre fibrillas. Este parece ser el paso inicial del proceso de alargamiento celular que inducen las auxinas.

---

### **TRABAJO PRACTICO N° 13: GRAVITROPISMO**

**Materiales:** semillas de maíz  
placas de plástico o vidrio  
papel secante  
algodón  
bandas elásticas (o hilo)

#### **Procedimiento:**

- Preparar un sistema de germinación con dos placas, papel secante y algodón, con una mecha de algodón que le permita humedecerse. Humedecer y poner a germinar 10 semillas de maíz. Sujetar las placas con bandas de goma o hilo.
- Luego de 7 días, abrir y elegir 4 granos germinados, seleccionando las raíces rectas. Colocarlas nuevamente con los embriones hacia abajo y las raíces paralelas. Con una hoja de afeitar cortar los **dos mm apicales** de las raíces de 2 plántulas.
- Colocar nuevamente la tapa (papel secante y placa) cuidando que los granos queden firmemente apretados y las raíces libres. Con un lápiz marcar en la tapa una flecha que indicará la posición en que se colocará la mecha de algodón. Esta flecha debe guardar una relación con respecto a la dirección de las raíces de manera que cuando la caja está vertical, las raíces se encuentren en posición paralela al suelo.
- Colocar en oscuridad a 25° C durante una semana al cabo de la cual se realizarán las observaciones.

**Informe:**

Hacer un esquema del experimento, identificando los tratamientos como "raíces intactas" y "raíces con ápice cortado", con los resultados obtenidos al cabo de la semana.

---

**TRABAJO PRACTICO N° 14: ABSCISION DE HOJAS. DOMINANCIA APICAL. CURVATURA DEL TALLO**

Materiales: plantas de *Coleus* con 3-5 pares de hojas  
pasta de lanolina pura - pasta con lanolina con 100 ppm de AIA  
regla milimetrada – hilo piolín

Procedimiento:

***Abscisión de hojas:***

- Tomar una planta y comenzando con el 2<sup>do</sup> o 3<sup>er</sup> par de hojas visibles a simple vista a partir del ápice vegetativo, cortar el pecíolo en la base de la lámina de cada hoja de tres pares sucesivos.
- Una vez cortadas las láminas foliares, identificar cada pecíolo de cada par con una etiqueta u anillo de papel y aplicar sobre la superficie cortada lanolina con AIA (control). A otra planta a la que se le hizo el mismo tratamiento se le aplicará lanolina pura (tratamiento).
- Identificar cada planta con el tratamiento correspondiente. Regar cuando sea necesario.
- Durante la semana revisar las plantas y anotar la caída de los pecíolos.

***Dominancia apical:***

- Tomar dos plantas y cortar el ápice vegetativo de ambas. Aplicar lanolina con AIA (control) a la superficie decapitada de una de ellas y a la otra, lanolina pura (tratamiento).
- Identificar cada planta con el tratamiento correspondiente. Regar cuando sea necesario.
- Cuando el personal auxiliar se lo indique, observar y anotar el desarrollo de las ramificaciones laterales que se hubieran desarrollado en ambas plantas.

***Curvatura del tallo:***

- Tomar dos plantas. Aplicar una pequeña cantidad de lanolina con AIA (tratamiento) sobre uno de los lados del tallo, en la zona cercana al ápice (región joven del tallo) y otra pequeña cantidad sobre un lado del tallo en la zona cercana a la base (región madura del tallo).
- En otra planta realizar la misma operación con lanolina pura a manera de control.
- Identificar cada planta con el tratamiento correspondiente. Regar cuando sea necesario.
- Observar las plantas al cabo de 1-2 días y nuevamente luego de una semana.

Informe:

Dibujar en los tres casos, las plantas tratadas el primer día y luego del tiempo transcurrido, indicando condiciones originales y finales.

Figura 13. Fototropismo.

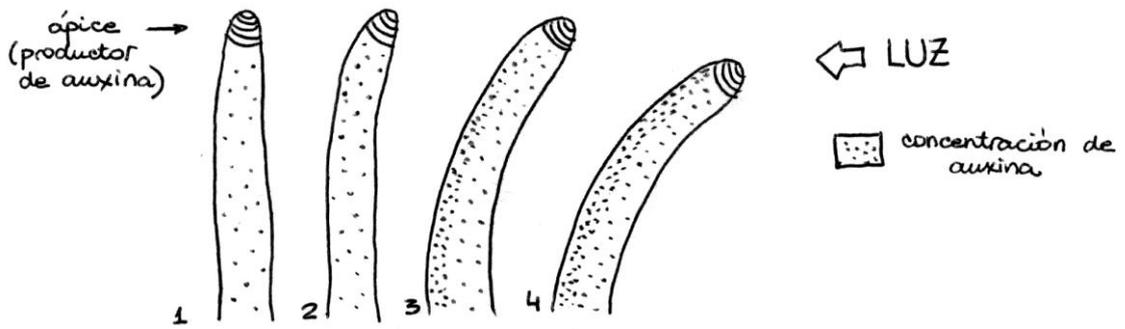


Figura 14. Curvaturas mediadas por concentraciones diferenciales de auxinas.

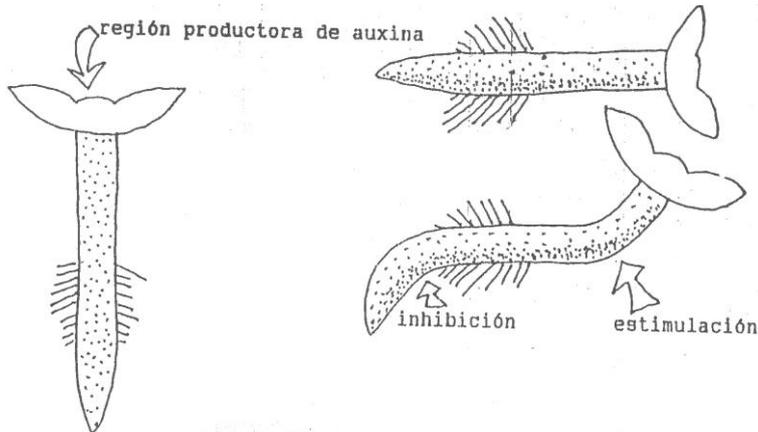


Figura 15. Efecto de la concentración de auxina en la estimulación/inhibición de órganos.

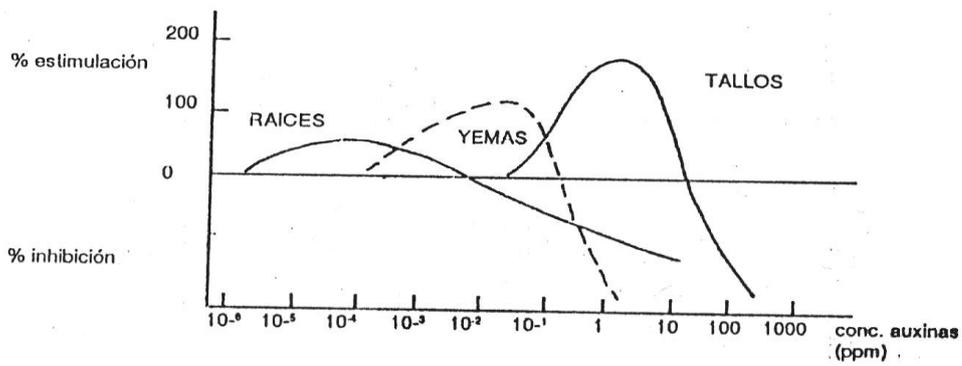


Figura 16. Dominancia apical

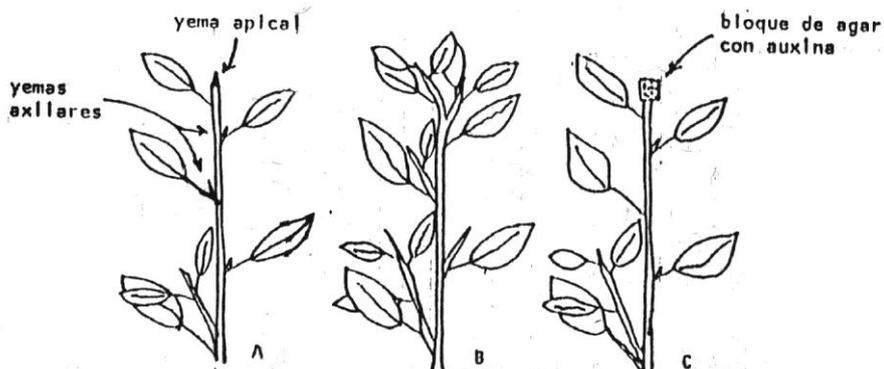


Figura 17. Abscisión foliar

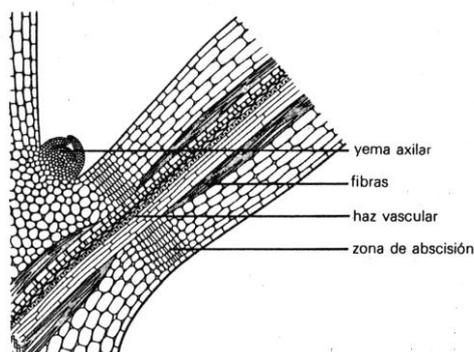
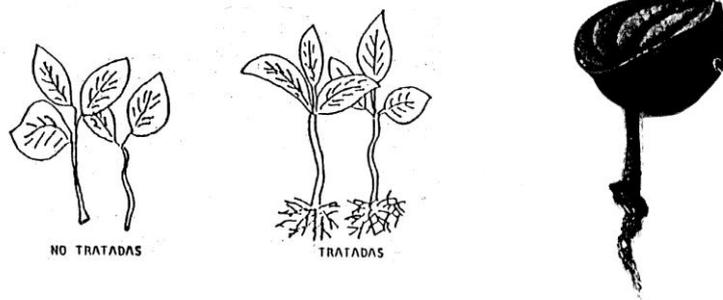


Figura 18. Enraizamiento



## 2- GIBERELINAS

Su existencia se conoce desde 1926, pero la investigación activa acerca de estos compuestos recién comenzó en la década del '50. Son compuestos muy estables y de rápida distribución por el floema. Existen en angiospermas, gimnospermas, musgos, helechos, algas y hongos. En angiospermas se encuentran en semillas inmaduras, ápices de raíces y tallos, y hojas jóvenes.

Actualmente existen al menos 50 giberelinas descubiertas y no hay dudas de su condición de hormonas (es decir, son de origen endógeno).

La acción de las giberelinas es reprimida por el ácido abscísico (inhibidor natural) y por productos sintéticos de efecto inhibitor como el cycocel (CCC), el fosfón y el AMO 118.

Efectos:

### **Germinación de semillas: Figura 19.**

Tienen un rol importante en la germinación de semillas de cereal como cebada. La secuencia de eventos es:

- 1- se produce la imbibición, lo que induce al embrión a liberar giberelinas.
- 2- Las giberelinas inducen la transcripción de genes de enzimas hidrolíticas en la capa de aleurona de las semillas (una capa especializada del endosperma de 2 a 4 células de espesor, ubicada justo por debajo del tegumento).
- 3- Una de las enzimas hidrolíticas producida por la capa de aleurona, la amilasa, cataliza la conversión de almidón en azúcar, que es usado como fuente de energía para la plántula en crecimiento.

Muchas semillas que usualmente germinan luego de ser expuestas a frío o luz (tabaco, lechuga o avenas) pueden estimular su germinación si son tratadas con giberelinas ya que esta hormona suplantaría este requerimiento. En este caso, la giberelina actúa estimulando la elongación celular en el embrión para colaborar en la ruptura del tegumento.

### **Elongación de plantas:**

Las giberelinas llamaron la atención fundamentalmente por su habilidad para estimular una drástica elongación en ciertas plantas. Este efecto es notable en mutantes enanos de maíz, y variedades enanas de porotos, arvejas y otras plantas. La elongación inducida por estos compuestos difiere de la elongación producida por las auxinas en que: controla la elongación de los entrenudos, induce tanto la división como la elongación celular, y esta elongación no se relaciona con procesos de acidificación de la pared celular. Figura 20.

### **Juvenilidad:**

Muchas plantas son morfológicamente diferentes en sus estados juveniles y maduros. Por ejemplo: el *Eucalyptus globulus* tiene diferencias en la forma y disposición de sus hojas. Yemas que darían ramas con hojas de su estadio maduro, si son tratadas con giberelinas, darán origen a ramas de su estadio juvenil.

### **Floración:**

Durante el primer año de crecimiento, las plantas bianuales tienen entrenudos cortos, lo que llamamos estadio de roseta. Luego de las bajas temperaturas del invierno, los entrenudos de estas plantas se elongan rápidamente y la planta

forma sus flores durante el segundo año de crecimiento. La aplicación de giberelinas en estado de roseta, también induce este efecto, lo que sugeriría que el frío sería el promotor de la síntesis de giberelinas en el segundo año (foto a la izquierda). Figura 21.

***Formación de frutos:***

El uso comercial más importante de la giberelina tiene que ver con su capacidad de aumentar el tamaño de uvas sin semillas. Las uvas aumentan su tamaño en 3 veces y los racimos son menos apretados, lo que los hace menos susceptibles a infecciones por hongos.

Es importante también en:

- el mejoramiento de la frutación en tomates, durazno, berenjena, pimientos, higos, manzanas y rosas luego del tratamiento con esta hormona.
- la producción de frutos sin fecundación (partenocarpia) en tomate.

***Otros efectos de las giberelinas en otras plantas son:***

- influyen en la sexualidad, aumentando el porcentaje de flores masculinas.
- inhiben o retardan la tuberización en la papa y otras tuberosas, estimulando el crecimiento del sistema estolonífero.

### **3- CITOCININAS**

Son sustancias capaces de estimular la citocinesis en las plantas. La primera sustancia que promovía esta división celular fue identificada en 1955 como 6-furfuril amino purina (previamente denominada cinetina).

No se conoce bien la acción fundamental de la citocinina, pero se supone que se adhiere al RNA de transferencia y, cuando esto sucede en determinados sitios, provoca el funcionamiento de ciertos codones, controlando así la síntesis de proteínas o enzimas. También se ha postulado su efecto sobre la síntesis del DNA. Se ha comprobado que induce la actividad de amilasas y proteasas y la síntesis de tiamina y de la auxina.

La cinetina es la citocinina sintética más conocida, así como la benciladenina (bencil-amino purina). Está presente en angiospermas, gimnospermas, musgos y helechos. En angiospermas se encuentra en raíces y a menudo en semillas, frutos y hojas jóvenes. Se mueven en todas las direcciones por el xilema, el floema y las células parenquimáticas.

Efectos:

***Procesos de senescencia y rejuvenecimiento:***

Si se colocan gotas de citocinina en hojas amarillentas, las zonas tratadas se vuelven más verdes y los procesos de degradación disminuyen en su velocidad. Acompañando este rejuvenecimiento, ocurre un transporte de aminoácidos y otros nutrientes hacia las partes tratadas desde las no tratadas de la hoja.

Estos compuestos suelen ser usados para prolongar la aceptabilidad por parte del mercado de flores cortadas. Sin embargo, estaría prohibido su uso en vegetales comestibles por sospecharse que su consumo sea carcinógeno.

***División celular:***

Estimulan la división celular cuando se encuentran en presencia de auxinas.

***Efectos sobre los cotiledones:***

La aplicación exógena de citocininas en plántulas promueve la división celular y expansión de cotiledones. La expansión es resultado de un aumento en la plasticidad celular inducida por las citocininas pero no interviene en procesos de acidificación.

También aumentan la cantidad de azúcares, especialmente de glucosa y fructosa, en células del cotiledón, lo que reduciría el potencial osmótico en estas células, favoreciendo la entrada de agua y así ayudando a su expansión.

***Organogénesis:***

Células cultivadas en laboratorio, crecen únicamente si tienen citocininas y auxinas en el medio de cultivo. Una tasa alta citocinina/auxina favorece la formación de tallos, mientras que tasas bajas favorecen la formación de raíces. Figura 22.

***Interacciones con la luz:***

Las citocininas causan dos efectos similares a las respuestas causadas por la luz. Las hojas de plántulas etioladas (que crecieron en ausencia de luz) de dicotiledóneas presentan crecimiento reducido, pero este crecimiento puede ser estimulado por estas sustancias. Por otra parte, ciertas semillas requieren luz para germinar, pero este requerimiento disminuye en presencia de cantidades apropiadas de citocininas.

## **4- ACIDO ABSCISICO (ABA)**

Este compuesto fue identificado en 1965, en investigaciones sobre dormición de yemas y abscisión de frutos de algodón (de esto último recibe su nombre). Sin embargo el ABA es más importante como causante de dormición en yemas y semillas y en el control estomático, que en el fenómeno de abscisión. La síntesis de ABA ocurre en los cloroplastos, siendo las hojas, tallos, y frutos verdes, importantes sitios de formación.

Ciertas condiciones de estrés estimulan la síntesis de ABA en hojas, incluyendo la sequía, carencia de nutrientes minerales y condiciones de inundación. Existen evidencias de que el ABA aumenta la resistencia a tales tipos de estrés.

La respuesta más conocida de las células ante este compuesto es la inhibición del crecimiento. El ABA representaría la hormona primaria responsable de la dormición de yemas, y también es un potente inhibidor de la germinación de semillas (muchas semillas dormantes contienen ABA). Todos estos efectos se deben a que el ABA actúa como anti-giberélico, revierte algunos efectos del AIA y de las citocininas.

El ABA no tiene un uso amplio en la agricultura, pero hay abscisinas sintéticas que se emplean para: inducir la senescencia foliar, inhibir el crecimiento del tallo, para aumentar el rendimiento de tubérculos, e inducir floración en algunas especies de día corto.

## **5 - ETILENO**

El etileno es un gas que generalmente se produce como resultado del metabolismo celular, que se encuentra en frutos maduros. Es por ello que se dice: "una manzana podrida echa a perder al resto".

Todas las partes de una planta son potenciales productoras, pero especialmente es liberado desde raíces, ápices de tallo, nudos, flores senescentes y frutos maduros. Las manchas negras de la cáscara de la banana son "bolsillos" con etileno concentrado.

Reúne propiedades que permiten considerarlo como una hormona.

Efectos:

***Maduración de frutos:***

En la antigua china ya se sabía que los frutos maduraban más rápidamente en ambientes donde se quemaba incienso. El factor responsable de esta maduración no era el calor sino el etileno liberado en la combustión del incienso.

El etileno estimula la desnaturalización de los cloroplastos en la maduración y la síntesis de otros pigmentos, el ablandamiento de los frutos debido a ruptura de paredes celulares por celulasas y pectinasas, la producción de compuestos volátiles asociados con el olor de los frutos y la conversión de almidón y ácidos a azúcares.

En los frutos llamados **climatéricos** (manzanas, tomates) hay una asociación entre un aumento de la respiración y la síntesis de etileno. Estos frutos son sensibles a la aplicación exógena de este gas. Ello permite un manejo comercial, ya que es posible cosecharlos aún verdes, almacenarlos en frío y con tensiones altas de CO<sub>2</sub>, e inducirlos a madurar luego de provocar el aumento de su respiración y la síntesis de etileno con un aumento de la temperatura.

Otros frutos, los **no climatéricos** (uvas, por ejemplo) no serían sensibles a una aplicación de etileno.

***Floración:***

El etileno inhibe la floración de la mayoría de las especies, pero la promueve en otras pocas (mangos, ananá y algunas ornamentales). En Puerto Rico y Filipinas conocen este efecto y utilizan quemadas controladas alrededor de plantaciones de ananá y mango para iniciar y sincronizar la floración de esas plantas.

También promueve la senescencia de flores. Cuando los granos de polen germinan, los estigmas florales producen grandes cantidades de etileno que acelera la senescencia de las partes florales.

El tratamiento de flores cortadas con compuestos con Ag, que acompleja al etileno, permite una mejor conservación de ellas por no dejarlo disponible.

***Abscisión:***

Durante el siglo XIX se usaba gas para la iluminación de las calles; y los árboles que se encontraban próximos a las lámparas sufrían una fuerte defoliación. Posteriormente se identificó al etileno como responsable de este efecto. Figura 23.

Un marcado aumento de la producción de etileno, asociado a una disminución en la de auxinas, induce la desaparición de la laminilla media de las zonas de abscisión a través de la estimulación de la síntesis de enzimas de tipo hidrolítico como las pectinasas y celulasas y por lo tanto inicia la abscisión.

Este efecto es utilizado por productores en general para aumentar la eficiencia en la maduración y recolección de frutos, etc. Pulverizando Ethepon se logra coordinar la abscisión de hojas y acelerar el proceso de cosecha.

***Expresión sexual:***

El sexo de las flores monoicas (plantas que tienen los dos sexos en el mismo individuo) es determinado por el etileno y giberelinas.

En pepino, si se trata a las yemas florales con etileno, se producen flores carpeladas, mientras que si se las trata con giberelinas, se producen flores estaminadas.

***Crecimiento de la plántula:***

Un estudiante ruso observó, en poroto negro, que luego de la germinación en laboratorio se reducía la elongación del tallo, se incrementaba el crecimiento lateral y había un crecimiento horizontal de las raíces (gravitropismo negativo). Posteriormente se llamó a este fenómeno como: **triple respuesta**. Cuando el aire del laboratorio era removido por corrientes se recuperaba el crecimiento normal. El etileno presente sobre las semillas era el responsable de este efecto. Figura 24.

***Epinastia:***

La curvatura hacia abajo de las hojas ocurre cuando la cara superior crece más que la inferior, fenómeno conocido como epinastia, y controlado por altas concentraciones de etileno y auxina.

En tomate, las condiciones anaeróbicas de las raíces (por ejemplo: las producidas durante la inundación) provocan epinastia en sus hojas, por lo cual la "señal" debe ser transportada desde la raíz hacia el tallo.

***Síntesis en condiciones de estrés:***

Diversos tipos de estrés (ambientales, físicos y químicos: la sequía, la inundación, el congelamiento, las heridas, etc.) inducen la producción de etileno causando abscisión, senescencia, cicatrización y aumento en la resistencia a enfermedades.

***Otros efectos son:***

- estimula el crecimiento de pelos radicales.
- estimula la formación de aerénquima en condiciones de inundación.
- controla la forma del gancho plumular, porción terminal del epicótilo que facilita la emergencia de la plántula. La luz roja provoca la apertura del gancho demostrando la inhibición de dicha longitud de onda en la síntesis del etileno.

## 6 - INHIBIDORES

Se han aislado distintos tipos de productos secundarios tales como terpenoides o alcaloides, que tienen efecto inhibitorio sobre el crecimiento vegetal y potente efecto farmacológico. La función de estos compuestos no es clara pero están comprometidos en la defensa contra insectos y ataques de hongos.

Muchos de ellos se clasifican dentro del grupo conocido como **fitoalexinas**: compuestos sintetizados rápidamente en respuesta al ataque de un patógeno o luego de un daño provocado a un tejido. Esta defensa activa puede considerarse análoga al sistema de anticuerpos en mamíferos, y provocan drásticos cambios en la fisiología de la planta.

En su gran mayoría contribuyen a la regulación y periodicidad del crecimiento, y se oponen total o parcialmente y en forma no competitiva a la acción de auxinas y giberelinas. Dicha acción puede tener lugar en distintas etapas de la actividad de estas fitohormonas, usualmente con carácter enzimático, pero raramente en los sitios de acción y en elevadas concentraciones. Así por ejemplo ocurre con el ácido fenólico y sus derivados, que actúan como AIA-oxidasa: al oxidar al AIA lo vuelven inactivo.

Dentro de este amplio grupo está también clasificado el ácido abscísico debido a su acción inhibitoria, antiguamente se lo llamaba *dormina*, ya que induce dormición. Hay otros compuestos semejantes al ABA, denominados por dicha similitud abscisinas, que también tienen efecto inhibitorio ya que en general promueven la abscisión, inhiben la germinación, la floración o deprimen el crecimiento.

La mayoría de los inhibidores fenólicos actúan en forma activa en el metabolismo, y su acción no radica en inhibir la función de las hormonas sino que se da por un efecto general sobre el metabolismo, y son parte del equipo fitorregulador. Por esto no debe verse a los inhibidores como sustancias despreciables. Es más, el hombre se ha esforzado en sintetizar compuestos que actúen en esa forma sobre el desarrollo vegetal para su empleo agronómico. Así por ejemplo se desarrollaron carbamatos y dinitrofenoles con acción herbicida, análogos a los naturales.

El Phosfon, el Amo 1618 y el CCC son muy conocidos. El CCC (Cycocel o cloruro de clorocolina) induce en trigo y cereales de grano pequeño un crecimiento más corto y un mayor macollaje, dándoles resistencia al frío y la sequía.

El grupo de las morfactinas, derivadas del ácido fluoreno 9-carboxílico, pueden provocar enanismo en concentraciones elevadas, mientras que en bajas concentraciones retardan el crecimiento, es decir, son inhibitorias y retardantes del crecimiento, dependiendo de la concentración. También inhiben la germinación y la división celular. Provocan pérdida de dominancia apical y ausencia de respuestas foto y gravitrópicas.

Las hormonas como auxinas, giberelinas y citocininas, empleadas en concentraciones mucho mayores que la necesarias para estimular el crecimiento, actúan como inhibidores.

La antiauxinas son inhibidores sintéticos (como ya se mencionó) que inhiben competitivamente con las auxinas y no sobre el metabolismo general, como en el caso de los fenoles.

## 7 - RETARDANTES

Hay un grupo importante de reguladores sintéticos que sin inhibir, retardan la división y alargamiento de células meristemáticas, regulando la altura de las plantas, causando enanización, sin causar efecto sobre los restantes órganos.

Además inducen el aumento del grado de rusticidad a los factores ambientales adversos, como sequía, altas temperaturas y salinidad del suelo.

Las morfactinas y las hormonas mismas pueden causar los efectos mencionados

---

### **TRABAJO PRACTICO N° 15: EFECTO DEL ACIDO GIBERELICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTAS GENETICAMENTE ENANAS**

**Materiales:** semillas de poroto enano y normal  
solución de ác. giberélico (40 mg/l)  
tres macetas

regla  
atomizador o pulverizador

Procedimiento:

- Sembrar 2 semillas de la variedad normal en una maceta y 2 semillas de la variedad enana en cada una de las otras 2 macetas) en cada maceta.
- Luego de dos semanas de crecimiento, medir la altura total de cada planta e identificar con una etiqueta cada una dándole un número para no confundir posteriormente.
- Luego, aplicar solución de AG con atomizador en **una maceta** de la variedad enana. Rotular cada maceta con el tratamiento que se efectuó. Luego de una semana de crecimiento, posterior al tratamiento, medir nuevamente la altura total para cada planta, contar el número de entrenudos en cada planta y observar si ciertos entrenudos son afectados en forma preferencial por el tratamiento.

Informe: Presentar todos los datos registrados en forma de tabla. Escribir brevemente sus conclusiones.

---

**TRABAJO PRACTICO N° 16: DETERMINACION DE LA MADURACION DE FRUTOS**

Materiales: Frutos con distinto grado de madurez (manzana, pera)  
Penetrómetro y Refractómetro.

Procedimiento:

- Se realizarán observaciones, durante la clase práctica, de la dureza de la pulpa de los frutos y de la presencia de azúcares libres.

Informe:

Informar cualitativamente las observaciones realizadas respecto de la maduración de los frutos.

---

**TRABAJO PRACTICO N° 17: EFFECTO DEL ETILENO EN EL CRECIMIENTO DE LA PLANTULA DE POROTO MUNG: TRIPLE RESPUESTA.**

Materiales: Semillas de poroto mung  
Cajas de Petri o de germinación  
Papel absorbente  
Soluciones de Ethrel o Etefón (ácido 2-cloroetilfosfónico): 0; 10; 100 y 1000  $\mu\text{M}$

Procedimiento:

- Preparar la caja de germinación según se indique y colocar 10 semillas por caja.
- Humedecer convenientemente con cada una de las soluciones de Ethrel y rotular la caja con el tratamiento correspondiente.
- Durante 1 semana observar el desarrollo de las plántulas en cada tratamiento.

Informe

Esquematizar y describir el desarrollo de las plántulas en cada tratamiento.

---

**TRABAJO PRACTICO N° 18: ENVEJECIMIENTO DE FLORES CORTADAS PRODUCIDO POR ETILENO**

Materiales: claves frescos de color claro (preferentemente blancos)  
erlenmeyers de 50 ml - Soluciones de Ethrel o Etefón (ácido 2-cloroetilfosfónico): **0; 10; 100 y 1000  $\mu\text{M}$**

Procedimiento:

- Cortar el cabo de los claveles dejando dos o tres segmentos por debajo de la flor.
- Llenar los erlenmeyers con cada una de las diferentes concentraciones de Ethrel (0, 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$ ) y rotularlos.
- Colocar dos claveles en cada erlenmeyer y ubicarlos en el laboratorio bien distanciados unos de otros (recordar que el etileno difunde porque es gaseoso y su síntesis es autocatalítica).

- Realizar observaciones visuales del envejecimiento floral luego de 3/4 días y a la semana de comenzar la experiencia.

Informe:

Informar cualitativamente las observaciones realizadas en base a la velocidad del envejecimiento floral en relación a la concentración de etileno utilizada.

Figura 19. Germinación de un grano .  
**cebada**

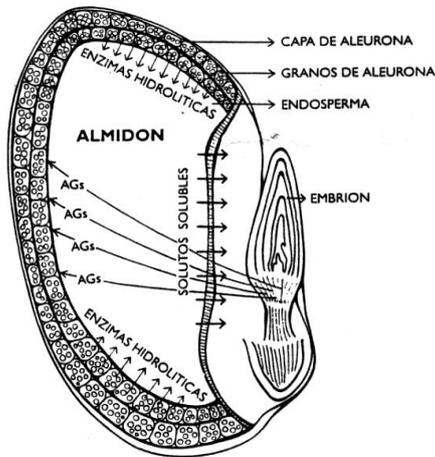


Figura 20. Ruptura del enanismo de  
**genético**

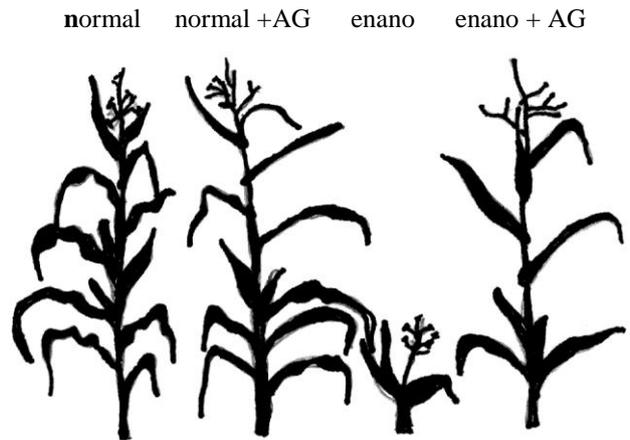


Figura 21.

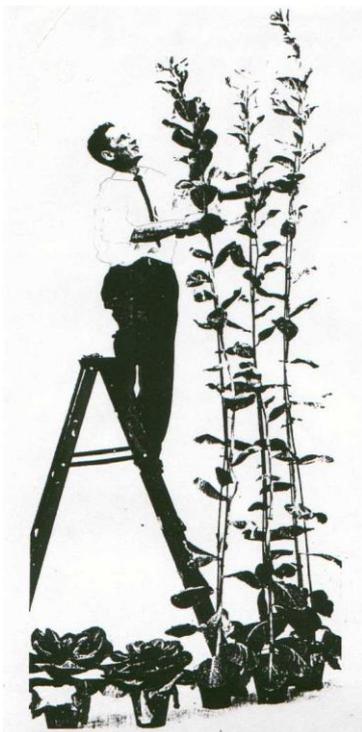


Figura 22. Cultivo de tejidos vegetales. Relación auxina/citocinina.

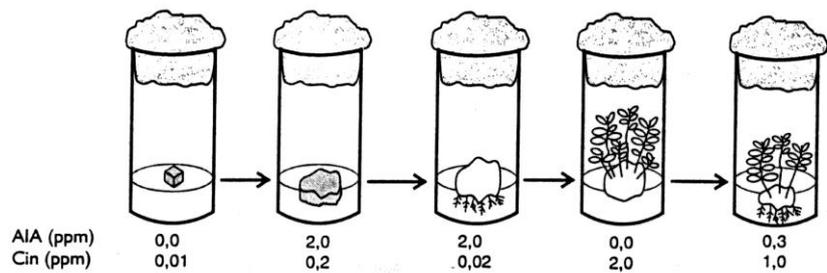
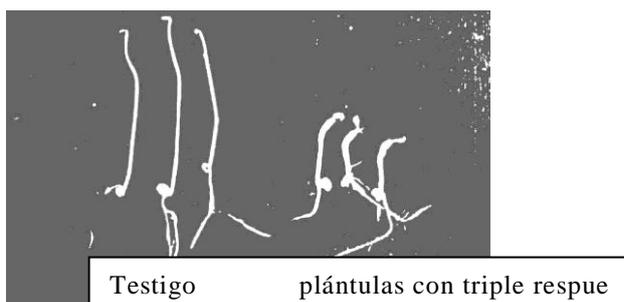


Figura 23. Abscisión foliar



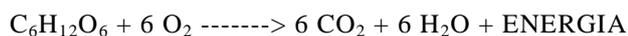
Figura 24. Triple respuesta.



## FOTOSÍNTESIS Y RESPIRACION

### Respiración

Todas las células vivas respiran continuamente, absorbiendo O<sub>2</sub> y liberando CO<sub>2</sub>, en volúmenes aproximadamente similares. Sin embargo, la respiración es un proceso mucho más complejo que un simple intercambio de gases. El proceso total es de óxido-reducción en el que ciertos compuestos (alimentos) se oxidan a CO<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub> absorbido se reduce para formar agua. Como sustratos respiratorios sirven compuestos como el almidón, fructosanos, sacarosa y otros azúcares, lípidos, ácidos orgánicos y aún proteínas bajo ciertas condiciones. La respiración de la glucosa, por ejemplo, es:



La mayor parte de la energía liberada durante la respiración (686 kcal. mol<sup>-1</sup> de glucosa), se libera como calor. Cuando las temperaturas son bajas, este calor estimula el metabolismo y resulta beneficioso para el crecimiento de ciertas especies, pero por lo general lo que ocurre es que este calor es transferido a la atmósfera o al suelo, siendo de poca utilidad para la planta. Mucho más importante que la energía en forma de calor, es la energía "atrapada" en compuestos, y que puede ser utilizada posteriormente en numerosos procesos esenciales para la vida, tales como aquellos involucrados en el crecimiento y la acumulación de iones. El ATP (adenosina trifosfato) es el más importante de estos compuestos, mientras que el NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) y el NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) también son importantes por su habilidad para transferir electrones y su alto poder reductor.

La ecuación vista que resume el proceso de respiración, no es apropiada por cuanto este proceso, al igual que el de fotosíntesis, no es una reacción simple, sino una serie de reacciones componentes, cada una catalizada por una enzima diferente. Es una "combustión" que ocurre en medio acuoso, a pH casi neutro y a temperatura moderada. Es una ruptura gradual de moléculas grandes que permite atrapar o almacenar energía en forma de ATP, NADH y NADPH. Además, a medida que esta ruptura va teniendo lugar, se van produciendo compuestos intermedios a manera de esqueletos carbonados que se necesitan para la formación de moléculas esenciales para la vida de la planta. Estos esqueletos incluyen aminoácidos para proteínas, nucleótidos para los ácidos nucleicos y los precursores carbonados que formarían los pigmentos porfirínicos (clorofila, citocromo), lípidos, esteroides, carotenoides y otros compuestos aromáticos. Por supuesto, cuando se forman estos compuestos la conversión de los sustratos originales a CO<sub>2</sub> y agua no es completa. Sólo algunos de los sustratos respiratorios son oxidados totalmente a CO<sub>2</sub> y agua, el resto es usado en los procesos de síntesis (anabólicos).

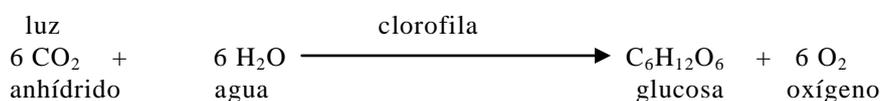
Cuando las plantas están en una etapa de rápido crecimiento, los C de los azúcares que se metabolizan, terminan en ese tipo de reacciones de síntesis y nunca aparecen como CO<sub>2</sub>. El que un átomo de C de un sustrato sea convertido en CO<sub>2</sub> o en alguna de las grandes moléculas mencionadas, depende de la célula involucrada, su posición en la planta y si ésta está creciendo activamente o no. Es importante señalar que resulta esencial que algunas de las moléculas sustrato sean oxidadas totalmente, ya que para las reacciones de síntesis nombradas se requiere un adecuado suministro de ATP. Muchos factores están involucrados en la actividad respiratoria, entre ellos: la disponibilidad de O<sub>2</sub>, la temperatura, y el tipo y edad de la planta.

### Fotosíntesis

El proceso de fotosíntesis es prácticamente el único mecanismo por el cual ingresa energía al mundo vivo. Se conocen otros mecanismos, pero son cuantitativamente insignificantes en el balance energético total. El proceso global de fotosíntesis es una oxidación del agua (con remoción de electrones y liberación de O<sub>2</sub>) y una reducción del CO<sub>2</sub> para formar compuestos orgánicos tales como los carbohidratos. El proceso contrario a éste, es decir la combustión u oxidación de carbohidratos para formar CO<sub>2</sub> y agua, es la respiración.

Durante la combustión o respiración, los electrones son retirados de los compuestos carbonados y llevados "cuesta abajo" (desde el punto de vista energético) donde juntamente con el H<sup>+</sup> se combinan con un aceptor, el O<sub>2</sub>, para formar H<sub>2</sub>O estable. Considerando ésto, podemos visualizar a la fotosíntesis como un proceso que utiliza la energía radiante (luz) para llevar los electrones "cuesta arriba" desde el agua hasta un aceptor como el CO<sub>2</sub>.

En fisiología y bioquímica vegetal, la fotosíntesis se presenta en forma clásica como la síntesis de carbohidratos a partir de CO<sub>2</sub> Y agua, y en presencia de luz y pigmentos específicos:



carbónico

El proceso total no es una ecuación sencilla, sino una serie de pasos sucesivos, en la cual la luz se utiliza para generar equivalentes reductores como el NADPH, y compuestos fosfatados altamente energéticos como el ATP. En etapas posteriores de esta serie de reacciones, el ATP y los equivalentes reductores se utilizan en la fase oscura para incorporar el CO<sub>2</sub> a azúcares, aminoácidos y otros compuestos celulares.

La absorción de luz depende de varios pigmentos contenidos en el cloroplasto, siendo fundamental la clorofila. Los otros pigmentos se conocen como "accesorios" (carotenos, ficoeritrinas, ficocianinas y fucoxantinas). La luz incidente sobre un pigmento lleva a éste a un estado excitado, y esta energía de excitación es la que se usa en fotosíntesis. La clorofila "a" es el pigmento involucrado directamente en el proceso, mientras que la luz absorbida por los pigmentos accesorios es traspasada a la clorofila "a". La energía de los electrones excitados se transforma en compuestos fosfatados de alta energía, como el ATP, según la siguiente ecuación:



Este proceso de fotofosforilación también ocurre en cloroplastos retirados de las células. Por otra parte, los electrones derivados de la fotólisis del agua se usan para generar poder reductor en forma de NADPH:

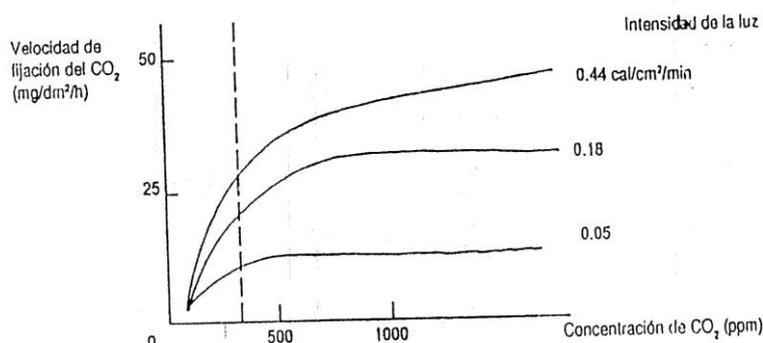


Esta reacción lumínica es el primer paso de la fotosíntesis. Aquí se produce la fotólisis del agua y se atrapa la energía que luego se usará en la fijación del CO<sub>2</sub>. Esta fotólisis fue aislada como una reacción independiente por R. Hill en 1937, y a menudo se la llama "reacción de Hill". La fijación del carbono, si bien depende del suministro de ATP y NADPH producidos en la fase luminosa, es en sí misma independiente de la luz, y puede ocurrir en la oscuridad, por ello se la conoce como "fase oscura" de la fotosíntesis. El camino del carbono en la fase oscura, ha sido sujeto a numerosas investigaciones desde hace muchos años. Su clarificación se hizo posible gracias a la utilización de carbono radiactivo y a la cromatografía. Calvin y colaboradores utilizaron algas unicelulares verdes (*Chlorella* y *Ascenedesmus*) a las que se les permitía fotosintetizar en presencia de CO<sub>2</sub> durante períodos de tiempo variable. Así encontraron que el primer producto radiactivo estable de la fotosíntesis era el ácido 3-fosfoglicérico (APG) y que la molécula aceptora del CO<sub>2</sub> era la ribulosa-1,5-difosfato (RUDP)

El APG sirve como punto de partida para una serie de reacciones que conducen a la formación de glucosa y a la regeneración de la RUDP como aceptor del CO<sub>2</sub>.

### **Factores ambientales que influyen en la fotosíntesis:**

Entre estos son importantes la disponibilidad de agua, CO<sub>2</sub>, luz, nutrientes y temperatura, así como la edad y genotipo de la planta. En ecosistemas naturales o agrícolas, la fotosíntesis en plantas superiores está principalmente limitada por la disponibilidad de agua. Cuando los potenciales agua son muy negativos (cuando el agua es limitante), la expansión celular se retarda y el crecimiento se reduce. Los estomas se cierran y la entrada de CO<sub>2</sub> se restringe limitando la fotosíntesis. En cuanto a los efectos de la luz, cuando su intensidad es baja la velocidad del proceso de fotosíntesis disminuye. Lo mismo ocurre con respecto a la concentración del CO<sub>2</sub> siempre que los estomas no estén cerrados por falta de agua. La figura ilustra cómo aumenta la fotosíntesis al aumentar la concentración de CO<sub>2</sub>, a tres niveles diferentes de intensidad lumínica.



En concentraciones altas de CO<sub>2</sub>, la mayor intensidad lumínica aumenta la velocidad de fotosíntesis. Para que el proceso se sature a una alta intensidad lumínica, se requiere una mayor concentración de CO<sub>2</sub> que la que se requeriría a baja intensidad luminosa.

En invernaderos, las plantas generalmente carecen de suficiente CO<sub>2</sub> para un óptimo crecimiento, y esto es de importancia especialmente en invierno, cuando deben permanecer cerrados. En algunos casos, el aire puede fertilizarse con CO<sub>2</sub> liberado desde tanques de alta presión, y así se logra aumentos en el rendimiento de plantas ornamentales y hortalizas durante el invierno. Los niveles de CO<sub>2</sub>, por lo general, no deben exceder las 1000 ppm porque de lo contrario las concentraciones se vuelven tóxicas y los estomas se cierran anulando cualquier posible aumento de la fotosíntesis.

Con respecto a la temperatura, el rango de la misma en el cual las plantas pueden fotosintetizar, va desde 70°C (ciertas bacterias y algas verdeazuladas) hasta -18°C (algunos líquenes antárticos). El efecto de la temperatura sobre la fotosíntesis depende de la especie y de las condiciones ambientales en las que creció. Para la mayoría de las plantas de interés agrícola, los rangos apropiados son de 15-30°C para plantas C3, y de 30-40°C para las C4. Cuando la intensidad de luz o la concentración del CO<sub>2</sub> limitan la fotosíntesis, es de esperar que la temperatura tenga poco o ningún efecto sobre el proceso, ya que las reacciones fotoquímicas son insensibles a la temperatura ( $Q_{10} = 1$ ) y la difusión tiene un  $Q_{10}$  cercano a 1.5. Cuando el paso más lento no es una reacción fotoquímica sino enzimática, su velocidad y la de todo el proceso se puede aumentar elevando la temperatura. Numerosas investigaciones demostraron que en la fotosíntesis intervienen reacciones enzimáticas no fotoquímicas y reacciones fotoquímicas. La edad de la hoja también influye sobre el proceso. A medida que las hojas individuales crecen y se desarrollan, también aumenta su habilidad para fotosintetizar hasta un punto (incluso antes de que la hoja alcance la madurez) en que la velocidad de fotosíntesis comienza a disminuir. Las hojas viejas y senescentes se vuelven amarillas y son incapaces de fotosintetizar, debido a que su clorofila se ha degradado y los cloroplastos ya no son funcionales.

## Ciclos fotosintéticos y adaptaciones ambientales

El proceso básico por el cual se reduce el CO<sub>2</sub> a hidratos de carbono se llama Ciclo de Calvin, en honor a su descubridor. En este ciclo el primer compuesto al que se incorpora el CO<sub>2</sub> es una cadena con tres carbonos (ácido 3-P-glicérico), por lo cual se lo denomina C3. Todas las plantas tienen ciclo de Calvin, pero algunas tienen otros procesos, resultado de adaptaciones a distintos ambientes. Por ejemplo muchas plantas tienen una forma de optimizar la fijación del CO<sub>2</sub>, incorporándolo primeramente en un compuesto de 4 carbonos (el fosfoenolpiruvato) en un proceso mucho más eficiente que el ciclo de Calvin, aunque finalmente es éste último proceso el que incorpora al CO<sub>2</sub> a las moléculas orgánicas. Este ciclo conocido como C4 fue descubierto en pasturas tropicales y en general lo presentan plantas con mayor capacidad de aprovechar elevadas intensidades lumínicas o que crecen en ambientes cálidos y moderada disponibilidad hídrica.

Otra adaptación es la que tienen las plantas del desierto o de ambientes muy secos, llamadas plantas crasuláceas. En estas plantas los estomas se abren solamente de noche, contrariamente a lo que ocurre en las demás especies. El CO<sub>2</sub> es fijado y reservado hasta que la intensidad lumínica es suficiente para que ocurra la fotosíntesis, pero con los estomas cerrados (debido a las condiciones tan disecantes del ambiente durante el día). Posteriormente el CO<sub>2</sub> así acumulado es metabolizado por el Ciclo de Calvin. Este ciclo es conocido como MAC (metabolismo ácido crasuláceo).

## Importancia ecológica de la fotosíntesis

El proceso de fotosíntesis representa el mayor ingreso de energía a la biosfera. En las cadenas tróficas, los vegetales, representan el primer eslabón: los productores, por su capacidad de producir alimentos a partir de compuestos inorgánicos. Además como producto final del proceso liberan  $O_2$  a la atmósfera, con el efecto benéfico que esto provoca para la vida de todos los organismos aeróbicos.

### TRABAJO PRACTICO N° 20

#### ENSAYO DE LOS DISCOS FLOTANTES PARA EVIDENCIAR LOS FENOMENOS DE FOTOSINTESIS Y RESPIRACION

En este ensayo se utiliza la velocidad a la que el oxígeno se produce o se consume como una medida del proceso total. Los discos de hoja son infiltrados al vacío para reemplazar el aire intercelular con líquido. Es por ello que estos discos se hunden en una solución buffer diluída luego de la infiltración. En condiciones de luz se produce fotosíntesis y por lo tanto se libera oxígeno. Este oxígeno acumulado en el tejido aumenta la flotabilidad del mismo, haciendo que los discos suban a la superficie. La velocidad de fotosíntesis en los discos de hojas se puede determinar registrando el tiempo requerido por el disco sumergido en flotar. Contrariamente, en condiciones de oscuridad, el oxígeno se consume por respiración: los discos flotantes se hundirán. La velocidad de respiración en el tejido está directamente relacionada con el tiempo que tardan los discos en hundirse.

El cociente de la velocidad de fotosíntesis (FS) y de la velocidad de respiración (RS) en el tejido vegetal se puede determinar con este ensayo anotando el tiempo efectivo (TE) que tardan la mitad de los discos de hoja sumergidos en condiciones de luz en flotar ( $TE_{50luz}$ ), y el tiempo efectivo para que la mitad de los discos de hoja flotantes, en condiciones de oscuridad se hundan ( $TE_{50osc}$ ).

En la oscuridad:  $1/TE_{50osc}$  es proporcional a la velocidad de respiración, entonces:

$$RS = 1 / TE_{50osc} = 1 / TE_{50rs}$$

En condiciones de luz:  $1/TE_{50luz}$  es proporcional a la velocidad de fotosíntesis menos la velocidad de respiración ya que ambos procesos ocurren en presencia de luz.

Entonces:

$$1 / TE_{50luz} = FS - RS$$

Y así:

$$FS = 1 / TE_{50luz} + 1 / TE_{50osc} = 1 / TE_{50fs}$$

El cociente entre la velocidad de fotosíntesis y la de respiración será:

$$FS / RS = [(1 / TE_{50fs}) / (1 / TE_{50rs})]$$

**Materiales:** 20 discos de tejido foliar

sacabocados (6 mm diámetro)

tubos de ensayo

bomba de vacío

gradilla

cronómetro

pipeta

*Solución buffer:* ácido cítrico 0,1 M,  $Na_2HPO_4$  0,2 M, agua destilada, pH 6,8

*Solución de infiltración:* solución buffer con una gota de surfactante

*Solución buffer con bicarbonato al 0,2%.*

#### Procedimiento:

- Colocar 3 ml de solución de infiltración en cada tubo de ensayo.

- Cortar discos de hoja (10 por tubo de ensayo) con el sacabocados. Colocarlos inmediatamente en el tubo con solución de infiltración para evitar desecación.
  - Aplicar vacío en los tubos para retirar el aire que llena los espacios intercelulares del tejido y permitir que los ocupe la solución de infiltración.
  - Tirar la solución de infiltración, conservando los discos.
  - Agregar a cada tubo 15 ml de solución buffer con bicarbonato y agitar. Mantener a los tubos en oscuridad hasta empezar el ensayo.
  - Los tubos de ensayo se colocan en un soporte cerca de la fuente de luz.
  - Registrar el tiempo contando la cantidad de discos que flotan luego de cada minuto y anotar en la tabla de datos obtenidos.
  - Los tubos que contienen ahora discos flotantes se llevan a oscuridad para registrar la respiración. El número de discos que se hundan al final de cada minuto se anotan en la tabla.
- Graficar los datos obtenidos en los puntos 7 y 8 (en %) en función de tiempo (en minutos).

Informe:

Realice un gráfico del % discos flotantes en función del tiempo para condiciones de luz y oscuridad.

Calcule las tasas de fotosíntesis y respiración y el cociente FS/RS.

## CRECIMIENTO

### Generalidades

Uno de los aspectos más fascinantes de los organismos vivos es su capacidad para crecer y desarrollarse. La síntesis continua de macromoléculas a partir de iones y moléculas pequeñas no sólo conduce a la formación de células más grandes sino también más complejas. Más aún, no todas las células crecen y se desarrollan de igual forma, lo que resulta en una planta madura compuesta por numerosos tipos de células.

Desde que germina la semilla, a medida que pasa el tiempo, la planta va creciendo. Sus células se dividen y multiplican y luego se alargan; el efecto, por supuesto, es que la planta aumenta en tamaño y peso. Sin embargo, el crecimiento no es uniforme en toda la planta. Se encuentra localizado en las zonas meristemáticas, las que producen células que formarán nuevos tejidos y órganos. Estas zonas se encuentran ubicadas en los ápices tanto del tallo como de la raíz, en las axilas de las hojas, en la base de las hojas de gramíneas, y en los tallos, lo que les permite crecer en grosor. (Figura 25).

El hecho de que existan los meristemas en los vegetales permite establecer diferencias con el crecimiento de los animales:

- a) el crecimiento de los vegetales es indefinido o indeterminado. El vegetal continúa creciendo durante toda la vida del individuo o al menos mientras las condiciones ambientales permitan. En el animal el tamaño es definido por la especie y menos susceptible a cambios por factores externos.
- b) el crecimiento se produce en áreas localizadas, los meristemas. En animales, el crecimiento se produce en el organismo todo en etapas tempranas hasta que cesa y únicamente se produce división celular para reemplazar células viejas.

Las células meristemáticas se caracterizan por poseer paredes celulares delgadas, núcleos relativamente grandes, vacuolas pequeñas o ausentes y una gran capacidad de división.

Las nuevas células formadas aumentan de tamaño debido principalmente a la elongación de las mismas por el ingreso de agua y el consecuente aumento de la presión de turgencia (Figura 26). En las células elongadas, la mayor parte del volumen celular está ocupado por la vacuola, mientras que el citoplasma queda restringido a una capa delgada adyacente a la pared. La división y la elongación celular contribuyen al aumento de tamaño de las plantas.

Podemos definir al crecimiento como un aumento irreversible y permanente de volumen de una célula, tejido, órgano o individuo, generalmente acompañado de un aumento de masa. No basta que haya sólo división celular.

Algunos parámetros normalmente utilizados para la cuantificación del crecimiento son: altura, peso seco, peso fresco, área foliar, longitud foliar y producción de macollos en gramíneas.

### *Diferenciación:*

Paralelamente al aumento de tamaño y número, las células sufren modificaciones en la estructura de su protoplasma, en el que aparecen organelas especializadas en funciones determinadas, hasta que toda la célula aparece con una serie de estructuras que están en relación con su función, por lo que se llama **célula especializada o diferenciada**. La planta así va desarrollando tejidos y órganos y su metabolismo general se modifica: va madurando.

En casos de heridas o en procesos regenerativos, una célula que ya está diferenciada puede volver a recuperar su capacidad meristemática. En esos casos se produce una dediferenciación de algunas células adultas hasta el estado meristemático, varias divisiones celulares, y una nueva diferenciación.

En la planta normal, el crecimiento y la diferenciación transcurren paralelamente y, por ello, a menudo es más frecuente referirse a un proceso que llamamos desarrollo.

### *Desarrollo:*

El desarrollo de un vegetal puede observarse al estudiar, por ejemplo, la radícula de una plántula y entonces aparece clara la diferencia entre el fenómeno de multiplicación celular, que ocurre a unos dos milímetros de la cofia; el alargamiento celular, que ocurre un poco más arriba, donde las células ya no se dividen, y el fenómeno de diferenciación, que ocurre más arriba aún, donde las células no sufren aumento en número ni tamaño, pero donde se diferencian entre sí. Estas células toman diversas especializaciones, por lo que aparecen los tejidos que, al organizarse, forman el cuerpo de la raíz. Figura 27.

## Cinética del crecimiento.

### *Curva sigmoidea de crecimiento*

Muchos investigadores han medido el tamaño de individuos, o de órganos de los mismos, y han expresado los datos en función del tiempo. Sachs fue uno de los pioneros en estos estudios. Al observar los gráficos resultantes, se ve que en un gran número de organismos y órganos de estos, la curva toma una forma sigmoidea típica (Figura 28).

La curva es análoga a la curva de crecimiento de una población y coincide tanto con el crecimiento de un individuo como con el crecimiento de un conjunto de individuos. La planta es un conjunto de células y no es extraño que la ecuación básica a que obedece su crecimiento sea la misma que la estudiada para una célula aislada.

En esta curva se pueden diferenciar tres fases con diferentes velocidades de crecimiento: fase exponencial, fase lineal y fase de senescencia.

#### *1- Fase exponencial*

En esta fase, la velocidad de crecimiento (aumento de tamaño por unidad de tiempo) es lenta al comienzo, aparentemente debido a la existencia de un número bajo de células en división. El número de células con capacidad de crecimiento va aumentando en forma exponencial, esto es según una progresión geométrica (del tipo 1, 2, 4, 8, 16, etc). Durante esta fase predomina la división celular. Este tipo exponencial de crecimiento se encuentra también en cultivos bacterianos en donde cada producto de la división es a su vez capaz de crecer y dividirse nuevamente. En las plantas superiores, esta fase exponencial se presenta para el aumento en peso durante las primeras etapas del crecimiento, es decir cuando la relación entre las áreas meristemáticas y el resto del cuerpo del vegetal es alta.

#### *2- Fase lineal*

La segunda fase se caracteriza porque a períodos iguales de tiempo corresponden aumentos iguales de crecimiento, en forma independiente del tamaño del sistema considerado.

Es característica de los aumentos en longitud, volumen, peso, etc, de estructuras cilíndricas en las que las áreas meristemáticas permanecen constantes.

#### *3- Fase de Senescencia*

La última fase es la de crecimiento desacelerado y en su transcurso el sistema se vuelve cada vez menos efectivo hasta que cesa totalmente. En los órganos de crecimiento determinado, como las hojas, puede prolongarse durante mucho tiempo, iniciándose mucho antes que se noten los primeros síntomas visuales de la real senescencia del órgano.

A pesar de que las curvas presentadas son representativas de numerosas especies, existen variaciones de acuerdo a la especie considerada. Algunas veces la fase lineal no se detecta, en cuyo caso las fases exponencial y de senescencia son casi continuas. En contraposición, es muy frecuente observar curvas de crecimiento con la fase lineal más amplia debido a un extenso intervalo de tiempo.

Se pueden relacionar las distintas fases del desarrollo de un vegetal en esta misma curva según el gráfico de la figura 29.

### ***Relaciones Absoluta y Relativa de Crecimiento***

El aumento en peso en cualquier punto de la curva sigmoide de crecimiento está dado por el aumento en tamaño ( $dW$ ) durante un período infinitamente breve de tiempo ( $dt$ ). Esto recibe el nombre de **relación absoluta de crecimiento (R)**.

$$R = dW / dt$$

también expresada como

$$R = (W_f - W_i) / (t_f - t_i)$$

Con:  $W_f$ : valor del parámetro en el tiempo final

$W_i$ : valor del parámetro en el tiempo inicial

$t_f$ : tiempo final

$t_i$ : tiempo inicial

Se define a R como la pendiente de la curva de crecimiento y se expresa en g.día<sup>-1</sup>, cm.semana<sup>-1</sup>, cm<sup>2</sup>.día<sup>-1</sup>, etc.

En la figura 30 se observan gráficos correspondientes a esta tasa, donde se ve que R crece en forma constante durante la fase exponencial hasta un punto máximo y luego disminuye hasta cero.

A – Curva sigmoidea sin fase lineal

B – Curva sigmoidea con fase lineal

No es adecuado hablar de tasa absoluta cuando se intenta comparar la eficiencia en la producción de materia seca. Por ejemplo: 1 g por día es un crecimiento adecuado para una planta de 5 a 10 g pero resulta bajo para una de 100 g o más de peso seco total. Es por ello que se expresa el crecimiento teniendo en cuenta el peso o tamaño ya alcanzado: **tasa relativa de crecimiento (r)**.

$$r = (1/W) \cdot (dW/dt)$$

con: W: parámetro de crecimiento estudiado

$$dW = W_f - W_i$$

$$dt = t_f - t_i$$

Se define a r como un aumento de masa por unidad de masa presente por unidad de tiempo y se expresa en g g<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> o también g g<sup>-1</sup> semana<sup>-1</sup>, etc.

En la figura 31 se observa que la r resulta constante en la fase exponencial y declina a medida que aumenta la edad de la planta. Esto sucede por que es menor la proporción de tejido meristemático con respecto a los otros y no hay aporte de nuevo material a medida que sus células se diferencian totalmente.

## **Factores que afectan el crecimiento normal**

### **Factores externos:**

El crecimiento, como todo proceso fisiológico, está influenciado por los factores del medio externo y, como este proceso depende estrechamente de la energía liberada en la respiración, es comprensible entonces que el crecimiento dependa de la temperatura como principal factor del medio, presentando un mínimo hacia los 5 ó 10°C, un óptimo hacia los 35° y un máximo hacia los 45°.

La luz es también un importante factor del crecimiento. Las plantas que crecen en falta de luz, además de tener un pobre contenido de clorofila, se alargan en su eje longitudinal y muestran retardo en el desarrollo foliar; este fenómeno se denomina ahilamiento o etiolación. La planta etiolada sufre una falta de diferenciación.

Cuando un factor actúa en deficiencia a lo largo de todo el ciclo, la curva de crecimiento es análoga a la normal, pero se va separando de ella paulatinamente, quedando más corta y baja.

Esto se ve en la figura 32, que muestra la desviación de la curva de crecimiento, en maíz, por falta de lluvia y consecuente baja del rendimiento; una curva similar se obtendría en un suelo pobre en nutrientes.

Cuando un factor sufre una desviación brusca de lo normal y luego retorna a un relativo óptimo, la curva del crecimiento registra esta desviación y aunque luego retorne a la marcha normal sufrirá una baja del rendimiento, como se aprecia en la figura 33.

Se puede observar que durante unas 5 semanas posteriores a la emergencia, en 1931, prevaleció una temperatura de 2 a 3°C, por lo que el trigo sólo creció a razón de 6 cm/semana, en tanto que en 1932 creció, en ese lapso, a razón de 11 cm/semana.

Este mismo tipo de desviación se presentará si la planta sufre una sequía a mitad del desarrollo.

### **Factores internos:**

El organismo multicelular se caracteriza por un crecimiento organizado de sus diversas partes, que incluye una diferenciación armónica de los tejidos. Cada especie tiene una determinada forma en sus órganos; en la implantación de las hojas, en su ramificación, etc. La forma de los órganos depende de la distribución de las células, y a su vez ésta depende del plano de división de las células recién formadas. La forma del vegetal descansa, pues, en la polaridad, en la distribución de los cromosomas durante la división celular.

Esta correlación de efectos debe tener como causa inmediata la presencia de sustancias químicas; de hecho, la auxina es importante a este respecto y sin duda las giberelinas y citocininas también juegan un papel, así como los inhibidores. Sin embargo, es muy probable que existan aún otras hormonas de correlación desconocidas. La teoría de que las hormonas son las responsables de esta correlación actualmente no se discute.

Un caso muy importante de correlación del crecimiento se tiene en el tamaño relativo de raíz y tallo. Cada especie tiene una determinada relación tallo/raíz, que es de la máxima importancia, principalmente en la agricultura de zonas áridas, pues la parte aérea es superficie de evaporación y la raíz superficie de absorción, así que si se modifica la relación tallo/raíz se afectará el equilibrio hídrico de la planta.

## **TRABAJO PRACTICO N° 22** **CINETICA DEL CRECIMIENTO EN MONOCOTILEDONEAS**

*Materiales:* semillas de maíz  
hilo inelástico  
marcador indeleble de punta fina  
macetas

### *Procedimiento:*

- Llenar macetas con suelo. Sembrar semillas de maíz. A partir de la fecha de siembra y hasta la finalización de la experiencia controlar diariamente la humedad del suelo.
- Fijar cuidadosamente un hilo de unos 40 cm de longitud a la base del coleoptile de una de las plantas. Cuando la próxima hoja ha comenzado a emerger, marcar el hilo de manera tal que coincida con la punta de la hoja.
- Repetir este procedimiento conociendo exactamente las fechas en que son realizadas las marcas en el hilo.
- Una vez completado el crecimiento separar el hilo de la planta. Marcar la punta del hilo correspondiente a la base con un nudo y determinar con una regla milimetrada la evolución diaria de la longitud de las hojas.

### *Informe:*

- a) Graficar para ambos tratamientos:
  - i) Longitud de cada hoja versus edad de la planta.
  - ii) Tasa de crecimiento absoluta versus edad
  - iii) Tasa de crecimiento relativa versus edad
- b) Analizar las curvas obtenidas.

Figura 25. Localización de meristemas

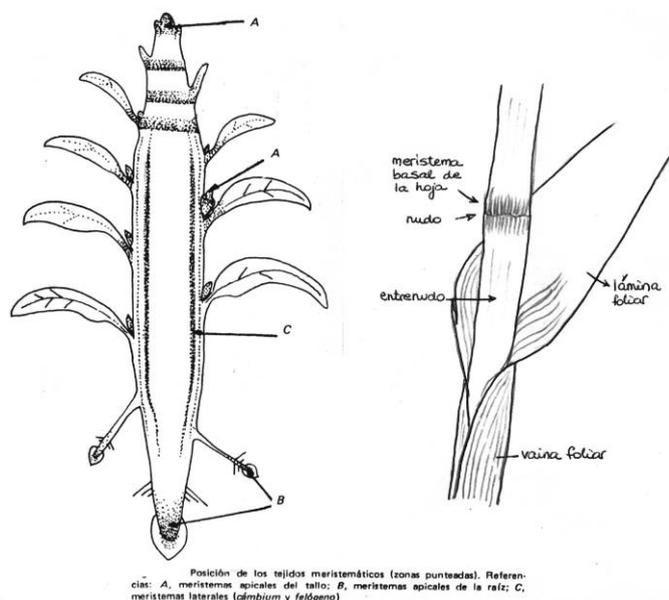


Figura 26.

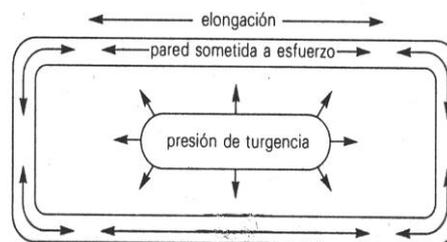


Figura 27

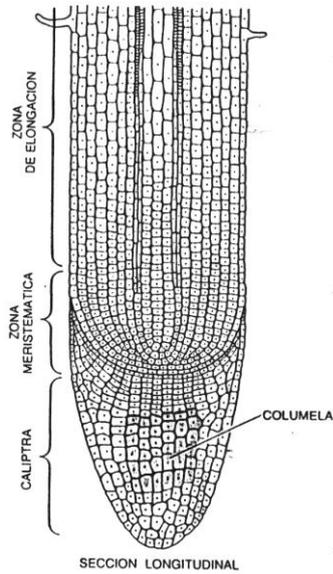


Figura 28

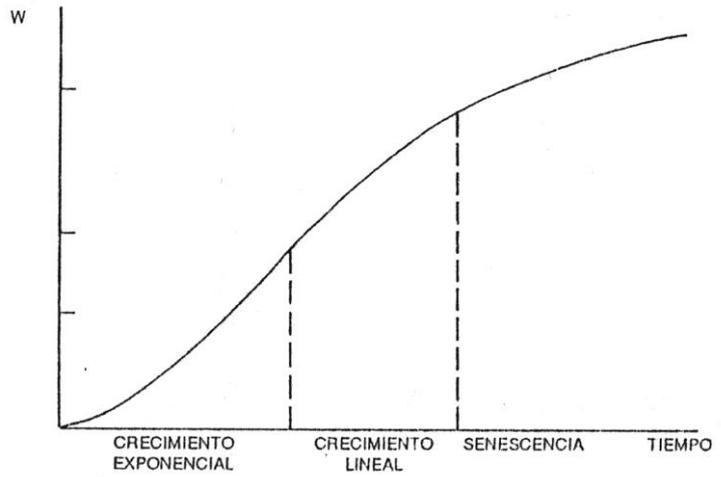


Figura 29. Curva sigmoidea de crecimiento y relación con el desarrollo

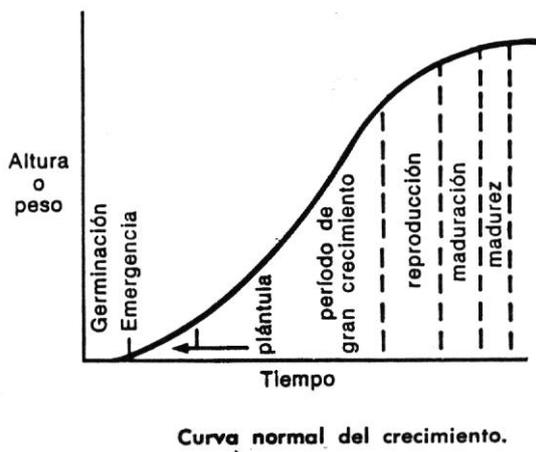


Figura 30. Tasa absoluta de crecimiento ( $R$ )

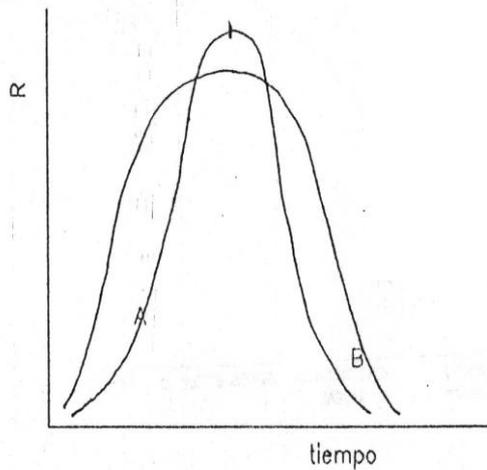


Figura 31. Tasa relativa de crecimiento ( $r$ )

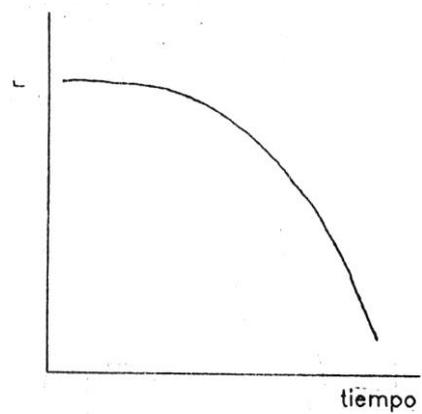


Figura 32

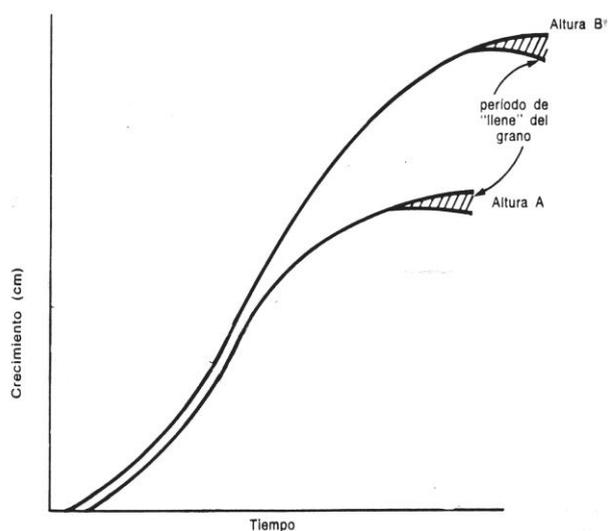
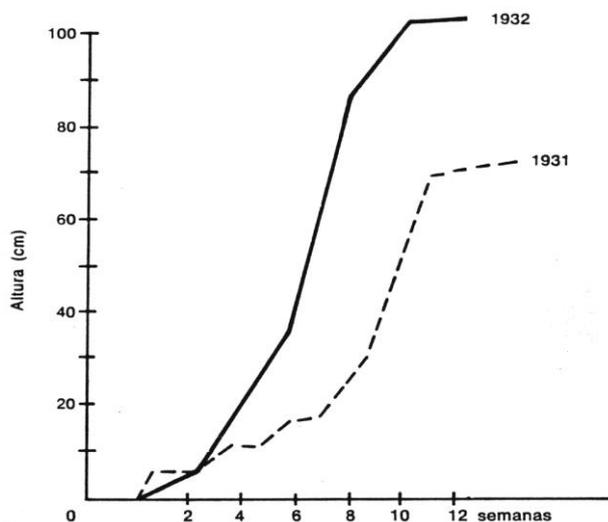


Figura 33



### NUTRICION MINERAL

Aproximadamente del 60 al 90% del peso vegetal está representado por agua, por eso luego del secado a 60-80°C el remanente es llamado materia seca (MS), que contiene todos los constituyentes inorgánicos en la misma proporción que en la materia fresca o sin secar. La materia seca está principalmente constituida por material de las paredes celulares, tales como carbohidratos y lignina, además de algunos componentes citoplasmáticos, tales como proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, etc. Un análisis de los principales elementos presentes en la materia seca del vástago de maíz se representa en la siguiente tabla.

ELEMENTO	PESO (g)	% TOTAL DE LA MS
Carbono	364.19	43.569
Oxígeno	371.42	44.431
Hidrógeno	52.17	6.244
Nitrógeno	12.19	1.459
Azufre	1.416	0.167
Fósforo	1.697	0.203
Calcio	1.897	0.227
Potasio	7.679	0.921
Magnesio	1.525	0.179
Hierro	0.714	0.083
Manganeso	0.269	0.035
Silicio	9.756	1.172
Aluminio	0.894	0.107
Cloro	1.216	0.143
Fracción Indeterminada	7.8	0.933

Los elementos **O, C e H** se llevan más del 94% del total. Una proporción muy aproximada se encuentra en la celulosa, el mayor componente de la madera del vástago.

Además de los elementos citados en la tabla pueden hallarse cantidades traza de otros elementos, algunos de los cuales pueden resultar esenciales para ciertas plantas. Por otro lado, en la tabla aparecen el **aluminio** y el **silicio**, considera dos no esenciales para el crecimiento vegetal, pero existen varios elementos que las plantas pueden absorber y acumular a pesar de no necesitarlos. Así se han encontrado más de 60 elementos distintos, entre ellos el **oro, mercurio, arsénico, uranio**, y aún elementos fabricados por el hombre tales como el **plutonio**, que en condiciones naturales puede ser absorbido.

El suelo está principalmente formado por altas cantidades de silicio, oxígeno (O<sub>2</sub>) y aluminio, pero las plantas no reflejan dicha constitución edáfica. Esto se debe, por un lado, a que la mayor parte del C y el O se absorben del aire. Por otro lado el O<sub>2</sub>, el aluminio y el silicio presentes en el suelo como minerales no se encuentran en la llamada solución del suelo, desde donde las plantas absorben los elementos disueltos. Por último las raíces son altamente selectivas al tipo de elementos que absorben.

### METODOS PARA EL ESTUDIO DE LA NUTRICION VEGETAL: Hidroponia

Alrededor de 1840 dos investigadores, Sachs y Knop, independientemente identificaron problemas causados por cantidades variables de determinados elementos esenciales en las plantas que crecían en un medio complejo como el suelo.

Hicieron crecer plantas en una solución acuosa con una determinada concentración de elementos puros en forma disponible para las plantas. Este método se conoce como **cultivo hidropónico**. Posteriormente se demostró que el cultivo en estas condiciones se mejoraba cuando se aireaba la solución en la cual crecían las raíces. Además otro problema consiste en que es necesario hacer un frecuente recambio de la solución cada 2 a 7 días, o cada 1 ó 2 días para lograr máximo crecimiento. Esto se debe a que la solución cambia de concentración permanentemente debido a que algunos iones de absorben más rápidamente que otros, causando no sólo un empobrecimiento iónico sino también variaciones considerables en el pH de la solución. Muchas veces se obvian problemas causados por el medio líquido utilizando arena de río lavada o un mineral llamado perlita o agroliar (piedra pómez expandida) que resultan inertes a los fines del cultivo. Este tipo de cultivo hidropónico no permite hacer estudios muy finos, pero es muy conveniente, sin embargo, para realizar cultivos comerciales, como tomates, berro y otros cultivos fuera de la estación de crecimiento en invernaderos.

Una de las formulaciones más conocidas para realizar estudios en hidroponia es la llamada **Solución de Hoagland**, pionero en las investigaciones de la nutrición mineral. Otra muy utilizada es la de Evans, ambas se muestran en la siguiente tabla:

SOLUCION DE HOAGLAND			SOLUCION DE EVANS		
SAL	Molaridad	ppm	SAL	Molaridad	ppm
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.003		Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.0050	
KNO <sub>3</sub>	0.010		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.0025	
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.230		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0005	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.490		MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0020	
Mezcla al 0.5% de FeSO <sub>4</sub> y 0.4% de ácido tartárico: 0.6ml/l (3 veces/semana)			Fe-versenato		0.5 Fe
			Kcl		9.0 Cl
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O		0.5 Mn/6.5 Cl	MnSO <sub>4</sub>		0.25 Mn
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		0.5 B	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		0.25 B
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		0.05 Zn	ZnSO <sub>4</sub>		0.25 Zn
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O		0.02 Cu	CuSO <sub>4</sub>		0.02 Cu
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O		0.05 Mo	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>		0.02 Mo

En ambas soluciones todos los elementos se encuentran en concentración adecuada para permitir un buen crecimiento vegetal de la mayoría de las plantas superiores, pero la solución ideal para cada especie podría ser ajustada en base a las distintas necesidades.

La disponibilidad de los diferentes elementos en las soluciones nutritivas respecto de cómo se hallan en un suelo cultivable son bastante diferentes. Así por ejemplo la mayor parte de los elementos se encuentran más concentrados en las soluciones que en el suelo, como ocurre por ejemplo con el P y el  $K^+$ . Por otro lado, no todos los elementos que se encuentran en el suelo están disponibles en la solución que rodea a las raíces, muchos están adsorbidos a las arcillas y a la materia orgánica del suelo, otros están precipitados como sales insolubles y pasan muy lentamente a la solución del suelo.

La pregunta es entonces: por qué se emplean concentraciones tan elevadas en las soluciones nutritivas?; y la respuesta, sencillamente, es porque dichas concentraciones no son dañinas sino similares a las óptimas para el crecimiento vegetal y no se hace tan tedioso el trabajo de recambio diario, como debiera hacerse a menores concentraciones.

Los potenciales osmóticos de las soluciones nutritivas deben ser aproximadamente iguales a -1 bar, ya que podrían causar plasmólisis de las células radicales con concentraciones iónicas más altas que las de los tejidos.

## ELEMENTOS ESENCIALES

El CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O junto con los 13 elementos considerados esenciales (tabla) y la luz solar serían suficientes para que cualquier planta pudiera crecer en perfectas condiciones y sintetizar todos los compuestos que necesita. Esto puede afirmarse debido a la comprobación del real comportamiento autotrófico de los vegetales, haciéndolos crecer en un medio estéril, donde no les pueden ser provistas vitaminas ni otras sustancias que producen los microorganismos del suelo.

Hay dos criterios para juzgar la esencialidad de un elemento:

- \* un elemento es esencial si la planta no puede completar su ciclo de vida en ausencia del mismo,
- \* un elemento es esencial si se puede demostrar que forma parte de moléculas esenciales, como el N en las proteínas, el Mg en la clorofila, etc.

En la siguiente tabla pueden verse todos los elementos considerados esenciales para las plantas superiores, la forma química en que realmente están disponibles y la concentración en que se consideran necesarios, así como el número de átomos comparados con el molibdeno, que es el de menor concentración.

(En la tabla se muestran las concentraciones de los elementos esenciales en el tejido vegetal, por debajo de las cuales se observarían síntomas de deficiencia).

ELEMENTO	Forma Disponible	CONCENTRACION EN LA M.S.		N° relat de áts. comparados con Mo
		ppm	porcentaje	
Molibdeno	MoO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0.1	0.00001	1
Cobre	Cu <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	6	0.0006	100
Cinc	Zn <sup>2+</sup>	20	0.0020	300
Manganeso	Mn <sup>2+</sup>	50	0.0050	1000
Boro	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	20	0.0020	2000
Hierro	Fe <sup>+3</sup> , Fe <sup>+2</sup>	100	0.01	2000
Cloro	Cl <sup>-</sup>	100	0.01	3000
Azufre	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	1000	0.1	30000
Fósforo	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , HPO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	2000	0.2	60000
Magnesio	Mg <sup>+2</sup>	2000	0.2	80000
Calcio	Ca <sup>+2</sup>	5000	0.5	125000
Potasio	K <sup>+</sup>	10000	1.0	250000
Nitrógeno	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	15000	1.5	1000000
Oxígeno	O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O	450000	45	30000000
Carbono	CO <sub>2</sub>	450000	45	35000000
Hidrógeno	H <sub>2</sub> O	60000	6	60000000

(Las formas que aparecen en letras negritas corresponden a las formas químicas más frecuentemente halladas de cada elemento).

Los primeros siete elementos de la tabla se llaman elementos traza o micronutrientes: necesarios en cantidades menores de 100 µg/g MS. Los otros nueve elementos, llamados elementos mayores o macronutrientes, son necesarios en concentraciones superiores a 1000 µg/g MS.

Existen plantas que requieren, además de estos 16 elementos, otros específicos:

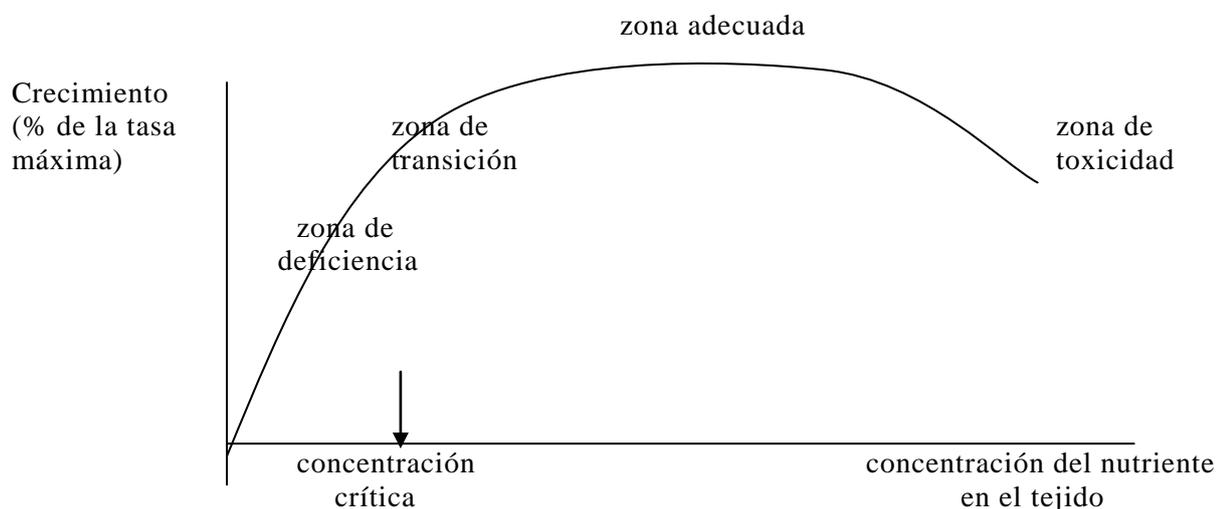
- así por ejemplo el Na, considerado nocivo para el crecimiento de la mayoría de los vegetales, es indispensable para algunas plantas del desierto (Ej: *Atriplex vesicaria* y *Halogeton glomeratus*). Se ha establecido, como regla general, que la gran mayoría de las C4 (muy frecuentes en zonas desérticas y tropicales) necesitan sodio, al igual que muchas crasuláceas (como las cactáceas).
- otro ejemplo lo constituye el silicio, que a pesar de seguir siendo considerado no esencial, muchas gramíneas (como el maíz) lo acumulan en cantidades que varían del 1 al 4% en la MS, y en arroz y *Equisetum* supera el 16%. Para algas como las diatomeas y crisofíceas es esencial, ya que sus cubiertas están formadas por sílice.

- el cobalto no es necesario para el crecimiento de la planta misma, pero es indispensable para la fijación del  $N_2$  por microorganismos en plantas leguminosas y no leguminosas; de todas maneras muchas plantas lo acumulan en bajas concentraciones y dichas especies deben ser ingeridas por los animales y el hombre para la síntesis de la vitamina B12 (cianocobalamina).

## REQUERIMIENTOS CUANTITATIVOS Y ANALISIS VEGETAL

En la siguiente figura se grafica la tasa de crecimiento en función de la concentración de un elemento cualquiera en el tejido.

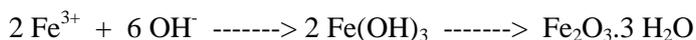
En el rango de concentración llamado **zona de deficiencia** la tasa de crecimiento aumenta abruptamente a medida que se aumenta la concentración del elemento en el tejido. Por encima de la concentración crítica, mínima concentración del elemento con la que se obtiene crecimiento cercano al máximo (aproximadamente 90 %), los incrementos en la concentración no provocan variaciones apreciables en el crecimiento, y ese rango se conoce como zona adecuada. Esta zona se conoce también como **zona de consumo lujurioso** o por exceso, ya que por más que aumente el consumo del elemento no se incrementa el crecimiento. Esta zona es bastante amplia para la mayoría de los nutrientes pero más estrecha para micronutrientes como el boro, cinc, cobre, manganeso y molibdeno. El continuo aumento en la concentración de dichos elementos provoca toxicidad y reducción en la tasa de crecimiento, correspondiendo a la llamada **zona de toxicidad**.



Con el aumento de los niveles de contaminación ambiental actuales, los efectos tóxicos de elementos esenciales y no esenciales están recibiendo actualmente mayor atención que en el pasado.

## AGENTES QUELANTES

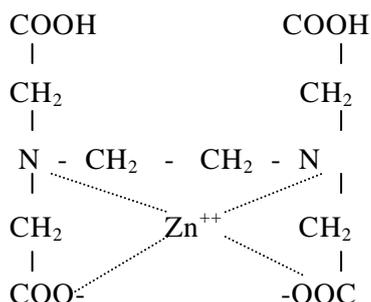
Varios micronutrientes como el hierro, el cinc, el manganeso y el cobre son relativamente insolubles en las soluciones nutritivas cuando aparecen como sales inorgánicas, y también suelen ser insolubles en la solución del suelo. Dicha insolubilidad es más marcada a  $pH > 5$ , ya que los mismos micronutrientes catiónicos reaccionan con iones  $OH^-$ , precipitando como hidróxidos o como óxidos metálicos hidratados. Un ejemplo del ión férrico se muestra en la siguiente reacción:



Dado que estas reacciones provocan la insolubilidad de los micronutrientes, muchas plantas no pueden absorber suficientes metales, especialmente Fe y Zn. Una forma de salvar esta deficiencia es mediante el uso de elementos como los quelantes (del griego "pinza") o ligandos.

Los quelatos son productos estables y solubles que se forman cuando ciertos átomos de una molécula orgánica, el quelante, le dona electrones a un catión metálico. Los grupo carboxilo y los átomos de N cargados negativamente tienen electrones que se comparten para dar este tipo de uniones y de compuestos.

El EDTA (ácido etilendiamino tetracético) es uno de los quelantes mejor conocidos, y permite la unión con el catión mediante grupos carboxilos y átomos de N, como se puede observar:



Los quelantes, aplicados sobre el follaje, han sido usados desde hace mucho tiempo para corregir los síntomas de deficiencia de Fe en suelos calcáreos de elevado pH. También suelos extremadamente ácidos muestran deficiencia de este nutriente, ya que forma asociaciones complejas con el Ca y el Al, y los quelantes también se utilizan en dichos casos.

Un buen quelante debe tener dos cualidades:

- ser resistente al ataque de los microorganismos del suelo,
- formar quelatos estables con los micronutrientes pero no con los cationes más abundantes en el suelo como el Ca y el Mg.

El EDTA tiene gran afinidad por el Ca y ésto lo hace poco deseable en suelos calcáreos, y se los reemplaza por el EDDHA (ácido etilendiamino di[o-hidroxifenil acético]) o por otros ligandos.

Se cree que muchas sustancias de la materia orgánica actúan como quelantes: compuestos fenólicos, proteínas, aminoácidos y ácidos orgánicos. Actúan fundamentalmente como fuente de micronutrientes para las plantas, ya que los mantienen en solución. A menudo estas sustancias (quelante + micronutriente) son absorbidos "enteros" por la planta y luego se rompe la unión mediante enzimas citoplasmáticas. Una vez absorbidos por la planta los metales divalentes se mantienen solubles ya que forman quelatos con ciertos constituyentes celulares. El más conocido de los quelantes aniónicos es el ácido cítrico que permite el transporte por xilema al igual que los aminoácidos. Las proteínas ligan hierro, cinc, manganeso, cobre y molibdeno. Los cationes monovalentes como el sodio y el potasio no forman quelatos estables.

## **FUNCIONES DE LOS ELEMENTOS ESENCIALES**

Las funciones de los elementos esenciales han sido clasificadas en dos grupos:

- rol en la estructura de compuestos importantes
- rol en la activación enzimática

Estas dos funciones, a menudo, no son tan fácilmente separables ya que muchos elementos cumplen ambos roles (C, O, Mg, N, S, etc).

Algunos elementos cumplen incluso otro rol distinto de los anteriores, como resulta es la participación en el mantenimiento de la presión de turgencia necesario para movimientos presión-dependientes, como son el movimiento estomático, los movimientos de sueño de las hojas. El potasio es fundamental en el cumplimiento de esta función, y junto con el cloro son dos buenos ejemplos de la necesidad funcional y no estructural de dos elementos esenciales.

## **SINTOMAS DE DEFICIENCIAS DE NUTRIENTES**

Las plantas responden a un inadecuado aporte de elementos esenciales presentando síntomas característicos. Estos síntomas pueden ser visualmente observados y permiten determinar la necesidad funcional del elemento, además de tener importancia práctica ya que se puede decidir cuándo y cómo fertilizar los cultivos.

Es obvio que la mayoría de los síntomas descriptos aparecen en el vástago de la planta, y que si bien las raíces son también afectadas no resulta tan fácilmente observable el daño en ellas.

Los síntomas, por otro lado, dependen en buena medida de la especie y de la severidad del problema. Los síntomas de deficiencia de cada elemento dependen primeramente de dos factores:

- la/las función/es del elemento
- la facilidad de traslocación desde zonas viejas hacia zonas nuevas

Un buen ejemplo a este respecto es la clorosis: amarillamiento causado por la restricción en la síntesis de clorofila, resultado de una deficiencia en magnesio. La clorosis es siempre más severa en las hojas más viejas respecto de las jóvenes. Esto ilustra un principio muy importante: las partes jóvenes de la planta tienen una marcada capacidad para movilizar nutrientes desde las partes viejas y esto estaría regido por hormonas (citocininas).

Los elementos realmente móviles se traslocan desde una hoja a otra por floema: N, P, K, Mg, Cl, y algo de S. Otros elementos son más inmóviles, tales como: B, Fe y Ca; y finalmente otros son intermedios, por ejemplo: Zn, Mn, Cu y Mo.

En los elementos móviles los síntomas aparecen primero y más pronunciadamente en las hojas viejas, mientras que las deficiencias en elementos inmóviles son más notorios en las hojas jóvenes.

### CLAVE PARA DETERMINAR SINTOMAS DE DEFICIENCIA DE NUTRIENTES

(McMurtrey, 1950. Diagnostic Techniques for Soils and Crops, American Potash Inst., p.243)

SINTOMAS	Elemento deficiente
<b>A-</b> Las hojas más viejas de la planta (inferiores) son las más afectadas; efectos localizados o generales.	
<b>B-</b> Efectos casi siempre generales; desecamiento más o menos marcado de las hojas inferiores; planta de color verde claro u oscuro.	
<b>C-</b> Planta de color verde claro; hojas inferiores amarillas, que pasan, al secarse, a un color pardo claro; si el elemento escasea en las fases más avanzadas del crecimiento; los tallos son cortos y finos	<b>nitrógeno</b>
<b>CC-</b> Planta de color verde oscuro; con frecuencia aparecen coloraciones rojas o purpúreas; hojas inferiores amarillas a veces, pasando al secarse a un color pardo verdoso o negro; tallos cortos y finos si el elemento escasea en las fases avanzadas del crecimiento	<b>fósforo</b>
<b>BB-</b> Efectos casi siempre localizados; moteados o clorosis en las hojas bajas, con o sin zonas de tejido muerto; escaso o nulo desecamiento de estas hojas.	
<b>C-</b> Las hojas moteadas o cloróticas pueden enrojecer típicamente, como sucede en el algodónero; a veces aparecen zonas muertas; ápice y bordes foliares retorcidos con la concavidad hacia arriba; tallos finos	<b>magnesio</b>
<b>CC-</b> Hojas cloróticas o moteadas, con áreas grandes o pequeñas de tejido muerto.	
<b>D-</b> Areas de tejido muerto pequeñas, generalmente en el ápice y entrenervios, más señaladas en el borde de las hojas; tallos finos	<b>potasio</b>
<b>DD-</b> Manchas generalizadas de crecimiento rápido, generalmente ocupando los entrenervios y eventualmente invadiendo los nervios secundarios y aún los principales; hojas gruesas; tallos con acortamiento de los entrenudos	<b>zinc</b>
<b>AA-</b> Las hojas más jóvenes, incluso las de las yemas, se hallan afectadas; síntomas localizados.	
<b>B-</b> La yema terminal muere y aparecen distorsiones en el ápice o en la base de las hojas jóvenes.	
<b>C-</b> Las hojas jóvenes de la yema terminal, típicamente encorvadas al principio, mueren finalmente por el ápice y bordes, por lo cual el crecimiento ulterior se caracteriza por su aspecto discontinuo en esos puntos; el tallo muere por la yema terminal	<b>calcio</b>
<b>CC-</b> La hojas jóvenes de la yema terminal se vuelven de color verde claro en la base, desprendiéndose finalmente por esta zona; el crecimiento ulterior origina hojas retorcidas; por último, el tallo muere junto a la yema terminal	<b>boro</b>
<b>BB-</b> La yema terminal permanece viva por lo general; clorosis o blanqueamiento de las hojas más jóvenes o gemulares, con o sin zonas de tejido muerto; nervios de color verde claro u oscuro.	

- C-** Las hojas jóvenes blanqueadas de modo permanente (blanqueo apical) sin manchas ni clorosis marcada; el brote seminal, así como las ramas y el tallo (en la zona inmediatamente situada bajo el ápice) son con frecuencia incapaces de permanecer erguidos en las fases avanzadas en las que se agudiza la carencia del elemento ..... **cobre**
- CC-** Las hojas jóvenes no blanquean; clorosis con o sin manchas de tejido muerto esparcidos por las hojas
- D-** Zonas de tejido muerto esparcidas por la hoja; los nervios más finos tienden a permanecer verdes, dando lugar a un aspecto de cuadrícula o retículo ..... **manganeso**
- DD-** Sin zonas muertas en general; la clorosis puede atacar o no a los nervios, dándoles un color respectivamente claro u oscuro.
- E-** Hojas jóvenes con los nervios y el tejido interneural de color verde claro ..... **azufre**
- EE-** Hojas jóvenes cloróticas; nervios principales típicamente verdes; tallos cortos y delgados ..... **hierro**